



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0043659

(51)⁷ C12N 1/16; C12P 13/24; A23L 33/14; (13) B
A23L 33/175; A61K 31/401; A61K
36/06; A61K 8/44; A61K 8/9728; A61P
17/16; A61P 43/00; A61Q 19/00; A61Q
19/10; A61Q 5/02; A61Q 5/06; A61Q
5/12; A23L 31/10; A23L 31/15

(21) 1-2018-05618

(22) 11/05/2017

(86) PCT/JP2017/017932 11/05/2017

(87) WO 2017/195870 16/11/2017

(30) 2016-096566 12/05/2016 JP

(45) 25/02/2025 443

(43) 25/04/2019 373A

(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)

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

(72) NARITA, Yukihiro (JP); FUKUI, Yuko (JP); MATSUOKA, Tatsuo (JP).

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

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

(21) 1-2018-05618

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó là tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, chứa L-hydroxyprolin, trong đó tỷ lệ giữa lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin với tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định bằng công thức $(100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào nấm men 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, chứa tế bào nấm men 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 được gắn vào nguyên tử cacbon ở vị trí 4. Các tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin bao gồm thúc đẩy sự sản sinh collagen trong nguyên bào sợi, thúc đẩy sự sinh trưởng của tế bào biểu bì, tác dụng cấp ẩm cao hơn hoặc bằng với tác dụng cấp ẩm của collagen, chống lão hóa da, hấp thụ qua da lớn hơn mức hấp thụ của tripeptit, tác dụng làm giảm nếp nhăn, và tác dụng làm dịu chứng viêm da dị ứng. L-hydroxyprolin an toàn đối với cơ thể người và có thể được sử dụng trong thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm, thuốc, và các sản phẩm khác. Vì thế mà L-hydroxyprolin có lợi ích cao.

Mặc dù L-hydroxyprolin có thể được sản xuất bằng phương pháp tổng hợp hữu cơ, phương pháp sản xuất sử dụng vi sinh vật cũng đã được nghiên cứu. Ví dụ, Tài liệu patent 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 sinh ra và tích lũy cis-4-hydroxy-L-prolin trong môi trường nuôi cấy, và thu hồi cis-4-hydroxy-L-prolin từ môi trường nuôi cấy này.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu patent

Tài liệu patent 1: JP 5506668 B

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Nấm men là vi sinh vật vẫn thường được sử dụng trong các ứng dụng công nghiệp khác nhau trong lĩnh vực thực phẩm và đồ uống. Tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin hữu ích để làm nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, và các sản phẩm khác mà được mong chờ là đem lại 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 chưa được báo cáo.

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

Giải pháp cho vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết vấn đề nêu trên để tìm ra rằng, một số nấm men, bao gồm *Kodamaea ohmeri*, tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào của chúng khi được nuôi cấy hiếu khí. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng, trong tế bào nấm men thu được hoặc giống cấy tế bào hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, tỷ lệ giữa lượng L-hydroxyprolin với tổng lượng L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định bằng công thức $(100 \times \text{Hyp} / (\text{Pro} + \text{Hyp}))$ có thể nằm trong một khoảng cụ thể. Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu khác nữa dựa trên các kết quả này để hoàn thành sáng chế.

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế là tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng: chứa L-hydroxyprolin, trong đó tỷ lệ giữa lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin với tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định bằng công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100.

Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế, lượng L-hydroxyprolin tốt hơn là bằng $10\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn. Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế, lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin chia cho OD660 ($\mu\text{g/mL}/\text{OD660}$) tốt hơn là bằng 20 hoặc cao hơn.

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo một khía cạnh khác của sáng chế là tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, chứa: L-hydroxyprolin với lượng bằng $10\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ, trong đó nguồn nitơ này chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Trong phương pháp sản xuất theo 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.

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

Sáng chế bao gồm việc sử dụng ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* để sản xuất ra L-hydroxyprolin.

Việc sử dụng theo sáng chế tốt hơn là bao gồm việc tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ, trong đó nguồn nitơ tốt hơn là chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

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

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

Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế chứa tế bào nấm men hoặc giống cấy 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 nấm men hoặc giống cấy 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 tốt hơn là được sử dụng trong ứng dụng được chọn từ việc thúc đẩy sự sản sinh collagen, thúc đẩy sự sinh trưởng tế bào biểu bì, cấp ẩm cho da, chống lão hóa da, ngăn ngừa hoặc làm giảm sự chùng da, cải thiện độ săn chắc da, ngăn ngừa hoặc làm giảm nếp nhăn, và làm dịu chứng viêm da 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 này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 300 phần triệu (ppm).

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 này tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20 phần triệu. Phần triệu ở đây nghĩa là phần triệu theo trọng lượng.

Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế chứa tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, chứa L-hydroxyprolin.

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

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế có thể tạo ra tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, sử dụng chúng, và phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế được sử dụng một cách thích hợp dưới dạng 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 các kết quả của phép đo lượng L-hydroxyprolin trong mẫu nuôi cấy bằng HPLC.

Fig.2 thể hiện biểu đồ HPLC thu được bằng cách phân tích dung dịch chuẩn của hỗn hợp các axit amin, Typ H chứa dung dịch axit clohydric 0,1N và L-hydroxyprolin (nồng độ của mỗi axit amin: 20 μ mol/L) ((a): được phát hiện bằng Ch1 ở bước sóng kích thích bằng 350nm và bước sóng huỳnh quang bằng 450nm, (b): được phát hiện bằng Ch2 ở bước sóng kích thích bằng 266nm và bước sóng huỳnh quang bằng 305nm).

Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không nên bị giới hạn ở các phương án sau, và các cải biến thích hợp có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi phạm vi của sáng chế.

Chi và loài nấm men được mô tả trong bản mô tả này bằng các tên chi và loài trong "The Yeasts, A Taxonomic Study", 5th Edition (Elsevier, 2011).

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế là tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, chứa L-hydroxyprolin, trong đó tỷ lệ giữa lượng (μ g/mL) L-hydroxyprolin với tổng lượng (μ g/mL) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định bằng công thức ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$) là nằm trong khoảng từ 35 đến 100.

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế là tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae*

hoặc chiết phẩm của chúng, chứa: L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 μ g/mL hoặc lớn hơn.

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

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế là tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng.

Nấm men theo sáng chế không bị giới hạn miễn là nó là một trong các loài nêu trên. Một hoặc hai hoặc nhiều nấm men có thể được sử dụng.

Các nấm men là sẵn có từ các kho lưu trữ khác nhau. Các ví dụ về kho lưu trữ bao gồm Viện Công nghệ và Đánh giá Quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation, 2-5-8 Kazusa-kamatari, Kisarazu, Chiba, Japan). Chúng có thể được phân lập từ tự nhiên.

Cụ thể, *Kodamaea ohmeri* được ưu tiên làm nấm men theo sáng chế do lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào của nó hoặc chiết phẩm của nó lớn. Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế tốt hơn là tế bào hoặc giống cây tế bào của *Kodamaea ohmeri* hoặc chiết phẩm của nó.

Tế bào nấm men hoặc giống cây 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. L-hydroxyprolin chứa trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men

hoặc chiết phẩm của nó trong bản mô tả này dùng để chỉ L-hydroxyprolin tự do. Lượng L-hydroxyprolin hoặc lượng tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó dùng để chỉ lượng L-hydroxyprolin tự do. Nấm men tích lũy L-hydroxyprolin tự do trong tế bào hoặc giống cây tế bào của nó vẫn chưa được báo cáo.

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

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

Tỷ lệ $\text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 40 đến 100, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50 đến 100, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 60 đến 100, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 70 đến 100, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 80 đến 100, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 90 đến 100. Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó có tỷ lệ $\text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$ như vậy có hàm lượng Hyp cao và vì thế đặc biệt thích hợp để làm nguyên liệu thô dùng cho thực

phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm, và các sản phẩm khác mà được mong đợi là có các tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin.

Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, lượng L-hydroxyprolin là bằng $10\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn. Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, lượng L-hydroxyprolin tốt hơn là bằng $10\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn. Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin ở lượng nằm trong khoảng nêu trên thích hợp để làm nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm, và các sản phẩm khác mà được mong đợi là có các tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin. Lượng L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế tốt hơn nữa là bằng $15\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là bằng $17\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là bằng $20\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là bằng $30\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là bằng $40\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là bằng $50\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là bằng $100\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, còn tốt hơn nữa là bằng $150\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là bằng $200\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là bằng $250\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là bằng $300\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Cận trên của lượng L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó không bị giới hạn. Lượng này tốt hơn là lớn nhất có thể, nhưng lượng này 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 có thể tạo ra tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó trong đó lượng L-hydroxyprolin có nguồn gốc từ tế bào nấm men 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 nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó có thể được đo bằng sắc

ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Trong các trường hợp mà tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa tế bào, tế bào này được phá vỡ bằng cách, ví dụ, tự phân trong điều kiện nhiệt hoặc phân hủy do enzym, và các thành phần tế bào đã được giải phóng được sử dụng để đo lượng L-prolin và L-hydroxyprolin. Ví dụ, L-prolin và L-hydroxyprolin có thể được định lượng bằng phương pháp bao gồm việc tạo dẫn xuất nhóm amin bậc một bằng axit mercaptopropionic và o-phthalaldehyt (OPA), sau đó tạo dẫn xuất axit amin bậc hai bằng 9-florenylmetyl cloformat (FMOC), và tiến hành phân tích HPLC (phát hiện ở bước sóng kích thích bằng 266nm và bước sóng huỳnh quang bằng 305nm). Đối với phép đo các lượng L-prolin và L-hydroxyprolin và phép phân tích HPLC, các phương pháp và điều kiện được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế có thể được sử dụng.

Tế bào nấm men 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 ít nhất một nấm men trong môi trường lỏng và tùy ý tiến hành bước xử lý như phá vỡ tế bào.

Giống cấy tế bào nấm men tốt hơn là chứa tế bào nấm men và/hoặc phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy, và có thể chứa các thành phần tế bào nấm men. Tế bào nấm men có thể là tế bào sống hoặc tế bào chết. Các ví dụ về giống cấy tế bào chứa tế bào nấm men và/hoặc phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy bao gồm: dịch nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men (tế bào được nuôi cấy) và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men; các tế bào nấm men được gom từ dịch nuôi cấy tế bào; và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ các tế bào khỏi dịch nuôi cấy tế bào. Phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy của dịch nuôi cấy tế bào được đề cập đến một cách đơn giản là phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy. Giống cấy tế bào tốt hơn là dịch nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy, hoặc phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy.

Chiết phẩm của tế bào hoặc giống cấy tế bào thường chứa các thành phần tế bào,

tốt hơn là chứa các thành phần tế bào và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy. Các 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 đưa tế bào hoặc giống cây tế bào (tốt hơn là dịch nuôi cấy tế bào) chứa các tế bào qua bước xử lý phá vỡ tế bào (ví dụ, xử lý tự phân hoặc xử lý phân hủy do enzym) để giải phóng các thành phần tế bào nấm men trong dịch nuôi cấy hoặc dịch tương tự; và chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ phần cặn tế bào khỏi tế bào hoặc giống cây tế bào đã được đưa qua bước xử lý phá vỡ tế bào (sản phẩm phá vỡ tế bào). Được ưu tiên là dịch nuôi cấy tế bào được đưa vào xử lý phá vỡ tế bào (sản phẩm phá vỡ tế bào), hoặc chiết phẩm chứa các thành phần tế bào và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ phần cặn tế bào khỏi sản phẩm phá vỡ tế bào.

Như được mô tả trên đây, tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế thường thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men trong môi trường lỏng và tùy ý đưa dịch nuôi cấy tế bào thu được chứa tế bào nấm men và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy qua bước xử lý như thu gom tế bào và phá vỡ tế bào.

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

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

Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế, lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin chia cho OD660 ($\mu\text{g/mL}/\text{OD660}$) tốt hơn là bằng 20 hoặc cao hơn. Lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin chia cho OD660

($\mu\text{g/mL/OD660}$) sau đây cũng có thể được đề cập đến là giá trị Hyp/OD660. Giá trị Hyp/OD660 càng cao biểu thị lượng L-hydroxyprolin trong mỗi tế bào càng lớn. Vì vậy, Hyp/OD660 càng cao sẽ càng tốt. Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó, cận trên của giá trị Hyp/OD660 không bị giới hạn. Giá trị này tốt hơn là càng cao càng tốt, nhưng nó thường bằng 300 hoặc thấp hơn. Giá trị Hyp/OD660 tốt hơn nữa là bằng 25 hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bằng 30 hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bằng 40 hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn là bằng 50 hoặc cao hơn, đặc biệt tốt hơn là bằng 60 hoặc cao hơn, tốt nhất là bằng 80 hoặc cao hơn.

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

OD660 được sử dụng để tính giá trị Hyp/OD660 là mức hấp thụ ở 660nm của dịch nuôi cấy tế bào chứa tế bào và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy (giống cây tế bào chứa tế bào và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy) được sử dụng để thu được tế bào hoặc giống cây tế bào hoặc chiết phẩm của nó.

Cụ thể, trong các trường hợp mà dịch nuôi cấy tế bào nấm men thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí, ít nhất một nấm men trong môi trường lỏng được lấy dưới dạng giống cây tế bào không có xử lý bất kỳ, OD660 là mức hấp thụ OD660 của dịch nuôi cấy tế bào này (giống cây tế bào). Trong các trường hợp mà tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó là chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào thu được bằng cách giải phóng các thành phần tế bào bởi sự phá vỡ tế bào nấm men, OD660 là mức hấp thụ OD660 của dịch nuôi cấy tế bào (dịch nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men không bị phá vỡ và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy) được sử dụng để tạo ra chiết phẩm. OD660 có thể được đo bằng, ví dụ quang phổ kế.

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

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

Tế bào nấm men 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 ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ và tùy ý tiến hành bước xử lý như phá vỡ tế bào. Cụ thể, nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Khi ít nhất một nấm men được nuôi cấy hiếu khí trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin, L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cấy tế bào của ít nhất một nấm men, thu được tế bào

nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin. Phương pháp được ưu tiên để sản xuất tế bào nấm men 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 nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này 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 nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ (sau đây được đề cập đến là bước tích lũy Hyp). Nguồn nitơ này chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể bao gồm bước khác với bước tích lũy Hyp, nếu muốn. 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 dưới đây).

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

Bước tích lũy Hyp tạo ra tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin. Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men thu được, tỷ lệ Hyp/(Pro+Hyp) thường nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Lượng L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men thu được nhờ bước tích lũy Hyp thường là bằng 10 μ g/mL hoặc lớn hơn. Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men như vậy có thể được sử dụng dưới dạng tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men theo sáng chế. Tế bào hoặc giống cây tế bào thu được còn có thể được đưa qua bước xử

lý như xử lý phá vỡ tế bào, nếu muốn, để tạo ra chiết phẩm của tế bào nấm men hoặc giống cấy 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 nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế. Trong trường hợp sản xuất tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế, bước tích lũy Hyp và các phương án được ưu tiên của nó là giống như bước tích lũy Hyp trong phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin và các phương án được ưu tiên của nó.

Như đối với phương pháp bổ sung ít nhất một nấm men vào môi trường lỏng trong bước tích lũy Hyp, lượng nhỏ các tế bào có thể được cấy truyền trực tiếp và sinh trưởng trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ. Để gia tăng nồng độ tế bào một cách nhanh chóng, tốt hơn là cấy truyền dịch nuôi cấy sơ bộ. Môi trường để nuôi cấy sơ bộ không bị giới hạn, và có thể là môi trường giống như môi trường lỏng được sử dụng trong bước tích lũy Hyp (thường trong môi trường nuôi cấy chính), hoặc môi trường đã biết sử dụng được cho nấm men. Thời gian nuôi cấy sơ bộ thường là từ 10 đến 72 giờ, tốt hơn là từ 12 đến 48 giờ. Nhiệt độ nuôi cấy sơ bộ tốt hơn là từ 15°C đến 40°C. Lượng dịch nuôi cấy sơ bộ cần được cấy truyền thường là 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, còn tốt hơn nữa là từ 1/200 đến 1/20 lượng môi trường được sử dụng trong bước tích lũy Hyp. Lượng cấy truyền nằm trong khoảng nêu trên cho phép nấm men sinh trưởng nhanh trong bước tích lũy Hyp và vì thế cho phép tích lũy hiệu quả L-hydroxyprolin.

Nguồn nitơ của môi trường lỏng được sử dụng trong bước tích lũy Hyp chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Khi ít nhất một nấm men được nuôi cấy hiếu khí với nguồn nitơ này, L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cấy tế bào. Một hoặc hai hoặc nhiều nguồn nitơ như vậy có thể được sử dụng. Một hoặc hai hoặc nhiều peptit chứa L-hydroxyprolin có thể được sử dụng.

Peptit chứa L-hydroxyprolin có thể là peptit bất kỳ chứa L-hydroxyprolin dưới dạng axit amin cấu thành. Tốt hơn là, peptit này là peptit trong đó L-hydroxyprolin chiếm 10% trọng lượng của axit amin cấu thành hoặc lớn hơn. Theo một phương án, nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn 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 cấu thành. Tốt hơn là, nó là protein trong đó L-hydroxyprolin chiếm 10% trọng lượng của axit amin cấu thành hoặc lớn hơn. Protein chứa L-hydroxyprolin được ưu tiên bao gồm protein collagen. Các ví dụ về protein collagen bao gồm protein được điều chế từ mô chứa collagen như các cơ quan, da, vảy cá, và xương; collagen; và gelatin. Protein collagen có thể thu được từ nguồn bất kỳ. Ví dụ, protein collagen có nguồn gốc từ động vật, như protein collagen có nguồn gốc từ bò, có nguồn gốc từ lợn, hoặc có nguồn gốc từ cá, có thể được sử dụng một cách thích hợp. Protein collagen có thể là sản phẩm có bán trên thị trường. Bước thủy phân protein chứa L-hydroxyprolin có thể được thực hiện với enzyme bằng phương pháp đã biết.

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

Các nguồn nitơ có bán trên thị trường chứa peptit chứa L-hydroxyprolin sử dụng được trong sáng chế bao gồm sản phẩm có tên Peptone (#211677) (Bacto).

Theo một phương án, peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là peptit collagen. Peptit collagen là collagen được thủy phân, và có thể là peptit collagen bất kỳ được tạo ra bằng cách thủy phân gelatin thu được bằng cách cải biến collagen tự nhiên trong điều kiện nhiệt, peptit collagen được tạo ra bằng cách thủy phân collagen tự nhiên, và sản

phẩm được cải biến bằng phương pháp hóa học hoặc enzym hóa của nó. Quy trình thủy phân có thể được thực hiện bằng, ví dụ, enzym, axit, hoặc kiềm, và tốt hơn là được thực hiện bằng enzym. Peptit collagen tốt hơn là peptit collagen được tạo ra bằng cách thủy phân gelatin thu được bằng cách cải biến collagen tự nhiên trong điều kiện nhiệt, hoặc peptit collagen thu được bằng cách thủy phân collagen tự nhiên. Peptit collagen có thể có nguồn gốc từ nguồn bất kỳ. Ví dụ, peptit collagen có nguồn gốc từ động vật, như peptit collagen có nguồn gốc từ bò, có nguồn gốc từ lợn, hoặc có nguồn gốc từ cá, có thể được sử dụng một cách thích hợp. Được ưu tiên là peptit collagen có nguồn gốc từ cá. Peptit collagen có thể là sản phẩm có bán trên thị trường.

Các ví dụ về peptit collagen bán trên thị trường sử dụng được trong 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 các sản phẩm này đều có sẵn 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) có sẵn từ Yasu Chemical Inc., và "Marine Collagen Oligo CF" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình từ 900 đến 1100) và "Marine Collagen Oligo MF" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình từ 900 đến 1500) có sẵn 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 số các sản phẩm này, ví dụ, "Collagen Peptide IXOS HDL-50SP", "Collagen Peptide Type S", "Collagen Peptide F-5000", "Marine Collagen Oligo CF", và "Marine Collagen Oligo MF" có nguồn gốc từ cá. "Collagen Peptide P-5000" và "Super Collagen Peptide SCP-2000" có nguồn gốc từ lợn.

Theo một phương án được ưu tiên của sáng chế, nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là peptit collagen (tốt hơn nữa là peptit collagen có nguồn gốc từ

cá) và/hoặc pepton (tốt hơn là pepton có nguồn gốc từ động vật, tốt hơn nữa là pepton có nguồn gốc từ bò, có nguồn gốc từ lợn, hoặc có nguồn gốc từ cá, còn tốt hơn nữa là pepton có nguồn gốc từ bò hoặc có nguồn gốc từ cá), đặc biệt tốt hơn là peptit collagen. Việc sử dụng nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin như vậy làm gia tăng mức độ tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men. Pepton có thể là pepton từ thịt, pepton từ cơ tim, hoặc pepton từ gelatin.

Một phương án được ưu tiên của phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này 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. 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. Peptit chứa L-hydroxyprolin cũng tốt hơn là có phân tử lượng bằng 10000 hoặc nhỏ hơn.

Peptit collagen tốt hơn là 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 này làm nguồn nitơ làm gia tăng mức độ 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, ví dụ sắc ký lọc gel. Phân tử lượng trung bình của peptit collagen thường là giá trị được tính bằng phương pháp được chỉ rõ trong "20-2 Average Molecular Weight" trong "PAGI method: methods for testing photographic gelatin", 10th edition. Phân tử lượng trung bình của peptit dùng để chỉ phân tử lượng trung bình theo trọng lượng.

Phân tử lượng trung bình của peptit collagen tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ

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

Trong môi trường lỏng, nồng độ của nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin thường tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5% trọng lượng, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 5% trọng lượng. Khi nồng độ của nguồn nitơ nằm trong khoảng này, L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cây tế bào. Điều này khiến cho có thể tạo ra tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng, ví dụ, 10 μ g/mL hoặc lớn hơn, và cũng khiến cho có thể tạo ra tế bào nấm men 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. Nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường lỏng tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,5 đến 4,5% trọng lượng, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 4% trọng lượng. Thích hợp là nồng độ của nguồn nitơ nằm trong khoảng này ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Theo một phương án, nồng độ của peptit collagen hoặc pepton trong môi trường lỏng tốt hơn là nằm trong khoảng nêu trên.

Nguồn cacbon không bị giới hạn. Các ví dụ về chúng bao gồm hydrat cacbon hoặc rượu đường như glucoza, fructoza, sucroza, raffinosa, mannoza, maltoza, galactoza, mannitol, trehaloza, melezitosa, xenlobioza, tinh bột, ri đường, sorbitol, L-sorboza, glyxerol, etanol, và gluxitol; và các 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 có thể được sử dụng kết hợp. Nguồn cacbon tốt hơn là sacarit như glucoza, fructoza, hoặc sucroza, đặc biệt tốt hơn là glucoza.

Nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường lỏng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 15% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1 đến 5% trọng lượng, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 2 đến 5% trọng lượng. Khi nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường lỏng bằng 1% trọng lượng hoặc lớn hơn, các tế bào sinh trưởng nhanh chóng một cách thuận lợi. Thích hợp là nồng độ của nguồn cacbon nằm trong khoảng này ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, tỷ lệ trọng lượng (C/N) giữa nguồn cacbon (C) với nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin (N) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 20. Tỷ lệ trọng lượng C/N nằm trong khoảng này thuận lợi mang lại mức độ tích lũy gia tăng của L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào. Tỷ lệ trọng lượng C/N tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,3 đến 3, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 1,5. Tỷ lệ trọng lượng C/N nằm trong khoảng này mang lại mức độ tích lũy gia tăng hơn nữa của L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy 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 sử dụng làm nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin (N), tỷ lệ trọng lượng C/N tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,3 đến 3, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 1,5, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 1,3. Theo một phương án được ưu tiên khác, tỷ lệ trọng lượng C/N cũng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20. Thích hợp là tỷ lệ trọng lượng C/N nằm trong khoảng nêu trên ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

Môi trường lỏng có thể chứa thành phần khác với nguồn cacbon và nguồn nitơ

chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Ví dụ, môi trường lỏng tốt hơn là chứa chiết phẩm nấm men. Chiết phẩm nấm men này thường là không có peptit chứa L-hydroxyprolin, và không được bao gồm trong nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Chiết phẩm nấm men có thể là chiết phẩm nấm men bất kỳ mà có thể được sử dụng để nuôi cấy nấm men, và có thể là sản phẩm có bán trên thị trường. Ví dụ, tên sản phẩm chiết phẩm nấm men 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% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 3% trọng lượng. Thích hợp là 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 là từ 4 đến 9, tốt hơn nữa là cao hơn 4 và không cao hơn 9, còn tốt hơn nữa là từ 4,5 đến 8,8, đặc biệt tốt hơn là từ 5 đến 8,7. Độ pH của môi trường lỏng có thể được điều chỉnh một cách thích hợp. Độ pH có thể được điều chỉnh bằng axit hoặc chất kiềm đã biết. Các 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, dung dịch amoniac, và natri glutamat.

Nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là từ 15°C đến 45°C, tốt hơn nữa là từ 20°C đến 40°C, tốt hơn nữa là từ 25°C đến 35°C. Nhiệt độ nuôi cấy trong khoảng nhiệt độ này cho phép nấm men sinh trưởng nhanh, gia tăng sự tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào.

Quy trình nuôi cấy hiếu khí có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ. Ví dụ, môi trường lỏng được cấy truyền với tế bào có thể được nuôi cấy kết hợp 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, tốc độ lắc hoặc khuấy tốt hơn nữa là nằm

trong khoảng từ 30 đến 500 vòng/phút, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50 đến 500 vòng/phút, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 300 vòng/phút, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 100 vòng/phút. Theo một phương án được ưu tiên khác, tốc độ lắc hoặc khuấy cũng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 50 đến 600 vòng/phút, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 100 đến 600 vòng/phút. Việc nuôi cấy kết hợp lắc hoặc khuấy ở tốc độ như vậy thuận lợi làm gia tăng mức độ tích lũy L-hydroxyprolin. Việc nuôi cấy kết hợp lắc ở tốc độ nêu trên được ưu tiên hơn. Nếu muốn, bước sục khí có thể được thực hiện với không khí hoặc oxy vô trùng. Phương pháp nuôi cấy có thể là phương pháp nuôi cấy bất kỳ trong số nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy theo mẻ nạp liệu, và nuôi cấy liên tục, nhưng tốt hơn là nuôi cấy theo mẻ. Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, kỹ thuật nuôi cấy tĩnh có thể được thực hiện.

Thời gian nuôi cấy không bị giới hạn và có thể được thiết lập một cách thích hợp. Ví dụ, quy trình nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong từ 10 đến 100 giờ. Khi thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng này, L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men. Ngoài ra, thông thường, có thể tạo ra tế bào nấm men 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 và tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 μ g/mL hoặc lớn hơn. Cũng có thể tạo ra tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó có hàm lượng etanol thấp (ví dụ, 1% thể tích/thể tích hoặc nhỏ hơn). Thời gian nuôi cấy ngắn hơn 10 giờ có thể dẫn đến việc tích lũy L-hydroxyprolin ở mức thấp hoặc tỷ lệ Hyp/(Pro+Hyp) nhỏ hơn 35 trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men thu được hoặc chiết phẩm của nó. Thời gian nuôi cấy dài hơn 100 giờ có thể dẫn đến việc hàm lượng etanol cao hơn 1% thể tích/thể tích trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men thu được hoặc chiết phẩm của nó. Ngoài ra, với thời gian nuôi cấy như vậy, sự nhiễm tạp có nhiều khả năng xảy ra hơn, hoặc sự nhuộm màu do

sự tự phân có thể xảy ra sau sự chết nấm men. Thời gian nuôi cấy tốt hơn nữa là từ 10 đến 80 giờ, tốt hơn nữa là từ 12 đến 72 giờ, còn 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, quy trình nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện cho đến khi lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào đạt 10 μ g/mL hoặc lớn hơn.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, quy trình nuôi cấy hiếu khí thường được thực hiện dưới dạng nuôi cấy chính, nhưng có thể được thực hiện dưới dạng nuôi cấy sơ bộ. Quy trình nuôi cấy hiếu khí có thể được thực hiện trong cả nuôi cấy sơ bộ và nuôi cấy chính.

Trong quy trình nuôi cấy hiếu khí, L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men. Giống cấy tế bào có thể là bất kỳ trong số dịch nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy, tế bào nấm men, và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy của dịch nuôi cấy tế bào. Bước tích lũy Hyp có thể tạo ra tế bào hoặc giống cấy tế bào chứa L-hydroxyprolin và có tỷ lệ Hyp/(Pro+Hyp) nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Bước này cũng có thể tạo ra tế bào hoặc giống cấy tế bào chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 μ g/mL hoặc lớn hơn. Chiết phẩm của tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men có thể thu được bằng cách, ví dụ, đưa tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men qua bước xử lý phá vỡ tế bào.

Theo sáng chế, khi tạo ra tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, ví dụ, dịch nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men và phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy thu được trong bước tích lũy Hyp có thể được lấy làm giống cấy tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin, mà không có bước xử lý thêm bất kỳ. Theo một cách khác, các tế bào được gom từ dịch nuôi cấy tế bào có thể được lấy làm tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men, hoặc phần dịch nổi trên bề mặt

nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ tế bào từ dịch nuôi cấy tế bào có thể được lấy làm giống cấy tế bào. Ngoài ra, các tế bào hoặc dịch nuôi cấy tế bào có thể tùy ý được đưa qua bước xử lý phá vỡ tế bào để giải phóng các thành phần tế bào trong dịch nuôi cấy và từ đó tạo ra chiết phẩm của tế bào hoặc giống cấy tế bào. Trong quá trình tạo ra chiết phẩm của tế bào hoặc giống cấy tế bào, bước loại bỏ phần cận tế bào có thể được thực hiện sau khi phá vỡ tế bào. Tế bào hoặc giống cấy tế bào hoặc chiết phẩm của nó có thể tùy ý được đưa qua bước xử lý như tiệt 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 phần cận tế bào, và bước tiệt trùng.

Các tế bào có thể được gom từ dịch nuôi cấy tế bào bằng phương pháp bất kỳ. Phương pháp thông thường như ly tâm có thể được sử dụng.

Bước 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 phân, phương pháp phân hủy do enzym, hoặc phương pháp chiết bằng kiềm. Cụ thể, phương pháp tự phân được ưu tiên. Trong phương pháp tự phân, ví dụ, tế bào hoặc giống cấy tế bào có thể được gia nhiệt trong từ 60 đến 180 phút ở nhiệt độ từ 40°C đến 60°C. Trong phương pháp tự phân, tế bào hoặc giống cấy tế bào có thể được gia nhiệt ở nhiệt độ từ 95°C đến 100°C trong từ 5 đến 15 phút, chẳng hạn.

Phần cận tế bào có thể được loại bỏ bằng phương pháp bất kỳ. Ví dụ, phần này được loại bỏ bằng phương pháp đã biết như lọc hoặc ly tâm.

Trong trường hợp tiến hành tiệt trùng, tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó tốt hơn là được gia nhiệt ở nhiệt độ từ 75°C đến 90°C (tốt hơn nữa là 80°C) trong từ 45 đến 90 phút (tốt hơn nữa là 60 phút). Trong trường hợp mà bước loại bỏ phần cận tế bào và bước tiệt trùng đều được thực hiện, một trong hai bước này có thể được thực hiện trước.

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó thu được theo sáng chế và các phương án được ưu tiên của nó là giống như tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế và phương án được ưu tiên của nó. Phương pháp sản xuất theo sáng chế khiến cho có thể sản xuất ra tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men 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 μ g/mL.

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

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin thu được theo 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 nấm men thu được hoặc giống cây tế bào hoặc chiết phẩm của nó. L-hydroxyprolin có thể được tinh chế bằng, ví dụ, phương pháp đã biết như sắc ký cột.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* để sản xuất ra L-hydroxyprolin.

Nấm men cũng được sử dụng một cách thích hợp để sản xuất tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin. Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-

hydroxyprolin, tỷ lệ Hyp/(Pro+Hyp) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Tương tự, trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, lượng L-hydroxyprolin tốt hơn là bằng 10 μ g/mL hoặc lớn hơn. Trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, giá trị Hyp/OD660 tốt hơn là bằng 20 hoặc cao hơn. Phương án được ưu tiên của tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin là giống như phương án được ưu tiên của tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế.

Việc sử dụng theo sáng chế tốt hơn là bao gồm việc tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ. Nguồn nitơ tốt hơn là chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Khi sử dụng theo 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 sử dụng theo sáng chế, nồng độ của nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin trong môi trường lỏng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 5% trọng lượng. Tỷ lệ trọng lượng (C/N) giữa 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, tỷ lệ C/N này cũng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20. Khi sử dụng theo sáng chế, quy trình nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong từ 10 đến 100 giờ, tốt hơn nữa là từ 10 đến 80 giờ.

Khi sử dụng theo sáng chế, môi trường lỏng, nguồn cacbon, và nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin và các phương án được ưu tiên của nó là giống như các phương án được ưu tiên về phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Các điều kiện nuôi cấy hiếu khí và các phương án được ưu tiên của chúng cũng giống như các điều kiện

trong phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Việc sử dụng 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 tế bào, và bước tiệt trùng nêu trên.

Tế bào nấm men hoặc giống cây 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 nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế cũng được bao gồm trong sáng chế.

Chế phẩm theo sáng chế chỉ cần chứa tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế hoặc tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, và có thể chứa cả hai. Chế phẩm này chứa tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế chứa L-hydroxyprolin có nguồn gốc từ tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó. Các 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), và thuốc không cần kê đơn (chế phẩm thuốc có tác dụng nhẹ). Chế phẩm này có thể là nguyên liệu thô dùng cho chúng. Theo một phương án, chế phẩm này tốt hơn là mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, hoặc nguyên liệu thô dùng cho chúng.

Trong chế phẩm theo sáng chế, lượng tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó không bị giới hạn, và có thể được thiết lập thích hợp theo kiểu chế phẩm và ứng dụng của chế phẩm. Ví dụ, lượng tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,00001 đến 50% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,00005 đến 20% trọng lượng, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10% trọng lượng, đối với chất rắn, so với chế phẩm.

Trong các trường hợp mà chế phẩm theo sáng chế là mỹ phẩm hoặc dược phẩm,

chế phẩm này có thể ở dạng liều lượng 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, sản phẩm rửa mặt, kem dưỡng ẩm dạng lỏng, sữa dưỡng ẩm, kem, tinh chất, thuốc mọc tóc, dầu, gel, dầu gội đầu, dầu dưỡng tóc, dầu xả tóc, son bóng, phấn nền, son môi, phấn phủ dạng bột, mặt nạ dưỡng da, tinh chất thơm, phấn, nước hoa, xà phòng tắm, xà phòng, sản phẩm phụ khi tắm, kem chống nắng, hoặc dạng tương tự.

Mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế là một phương án được ưu tiên của sáng chế. Mỹ phẩm và nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm có thể chứa thành phần khác với tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó. Chúng có thể chứa các thành phần khác nhau thường được trộn trong mỹ phẩm. Ví dụ, chúng có thể theo cách thích hợp chứa dầu, tinh chất thơm, chất hoạt động bề mặt, chất cấp 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 lọc một cách thích hợp. Nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế được sử dụng một cách thích hợp để sản xuất mỹ phẩm theo sáng chế.

Liều lượng của mỹ phẩm có thể được xác định một cách 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 thế thích hợp cho ứng dụng được chọn từ, ví dụ, thúc đẩy sự sản sinh collagen, thúc đẩy sự sinh trưởng tế bào biểu bì, cấp ẩm cho da, chống lão hóa da, ngăn ngừa hoặc làm giảm sự chùng da, cải thiện độ săn chắc da, ngăn ngừa hoặc làm giảm nếp nhăn, và làm dịu chứng viêm da dị ứng, thích hợp hơn cho ứng dụng được chọn từ ứng dụng cải thiện độ săn chắc da và ngăn ngừa hoặc làm giảm nếp nhăn.

Lượng tế bào nấm men 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% trọng lượng, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 5% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 5% trọng lượng, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 3% trọng lượng, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 2% trọng lượng, đối với chất rắn, so với mỹ phẩm. Theo một phương án được ưu tiên khác, lượng tế bào nấm men 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% trọng lượng, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 0,5% trọng lượng, đối với chất rắn, so với mỹ phẩm.

Lượng tế bào nấm men 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% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10% trọng lượng, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5% trọng lượng, đặc biệt tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2% trọng lượng, đối với 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 nằm trong khoảng từ 10 đến 200 phần triệu, còn tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 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 nằm trong khoảng từ 0,03 đến 15 phần triệu, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,05 đến 10 phần triệu. Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó tốt hơn là được bổ sung sao cho lượng L-hydroxyprolin nằm trong khoảng nêu trên.

Trong trường hợp mà chế phẩm theo sáng chế là thực phẩm hoặc đồ uống (chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống), thực phẩm hoặc đồ uống này không bị giới hạn. Thực phẩm hoặc đồ uống này có thể ở dạng 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 dụng, thực phẩm tốt cho sức khỏe, và thực phẩm chức năng.

Thực phẩm hoặc đồ uống thông dụng không bị giới hạn, và bao gồm đồ uống chứa cồn. Thực phẩm tốt cho sức khỏe dùng để chỉ thực phẩm được tin là lành mạnh hoặc có lợi cho sức khỏe, và bao gồm chế phẩm bổ sung dinh dưỡng và thực phẩm tự nhiên. Chế phẩm bổ sung dinh dưỡng dùng để chỉ thực phẩm giàu dưỡng chất đặc hiệu. Thực phẩm chức năng dùng để chỉ thực phẩm cung cấp dưỡng chất mà điều hòa chức năng của cơ thể, và bao gồm thực phẩm để sử dụng nhằm mục đích chăm sóc sức khỏe theo chỉ định và thực phẩm có yêu cầu về chức năng dưỡng chất.

Chế phẩm bổ sung dinh dưỡng bao gồm thức uống làm đẹp, và sản phẩm bổ sung. Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể ở dạng viên nang hoặc các 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 phê chuẩn để sử dụng trong thực phẩm hoặc đồ uống. Ví dụ về các thành phần như vậy bao gồm chất liên kết, chất làm đặc, chất tạo màu, chất ổn định, chất nhũ hóa, chất phân tán, chất phân rã, chất tạo hỗn dịch, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất làm ngọt, và chất tạo chua.

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

Lượng tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó trong thực phẩm hoặc đồ uống là, ví dụ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,001 đến 5% trọng lượng, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1% trọng lượng, đối với 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% trọng lượng. Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào

nấm men hoặc chiết phẩm của nó tốt hơn là được bổ sung sao 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. L-hydroxyprolin tốt hơn là có nguồn gốc từ tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó.

Chế phẩm như mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống, hoặc các nguyên liệu thô của chúng chứa tế bào nấm men 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, chế phẩm có thể được sản xuất bằng cách chọn lọc và trộn, theo dạng của chúng, các nguyên liệu thô, chất phụ gia, và thành phần tương tự thường được sử dụng cho chúng và bổ sung tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế vào hỗn hợp này.

Sáng chế cũng bao gồm mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng.

Tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó tốt hơn là tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men chiết phẩm của chúng theo sáng chế.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp sản xuất nguyên liệu thô chứa L-hydroxyprolin dùng cho mỹ phẩm, bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít

nhất một nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ (bước tích lũy Hyp). Nguồn nitơ này chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Các phương án được ưu tiên của phương pháp sản xuất nguyên liệu thô chứa L-hydroxyprolin dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế là giống như các phương án được ưu tiên của phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Phương pháp sản xuất nguyên liệu thô chứa L-hydroxyprolin dùng cho mỹ phẩm được ưu tiên là phương pháp sản xuất nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế.

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

Sáng chế còn bao gồm chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin chứa tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, chứa L-hydroxyprolin.

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

Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế chỉ cần chứa tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, và lượng tế bào hoặc giống cây tế bào hoặc chiết phẩm của nó trong chế phẩm này có thể bằng 100% trọng lượng. Nếu muốn, chế phẩm có thể chứa (các) thành phần khác. Ví dụ,

trong trường hợp sử dụng chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin làm phụ gia thực phẩm, chế phẩm này có thể chứa một hoặc hai hoặc nhiều chất phụ gia đã biết được sử dụng trong thực phẩm.

Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế được sử dụng một cách thích hợp cả làm, ví dụ, phụ gia mỹ phẩm. Trong trường hợp sử dụng chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin làm phụ gia mỹ phẩm, chế phẩm này chỉ cần chứa tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó. Lượng tế bào hoặc giống cấy tế bào hoặc chiết phẩm của nó trong chế phẩm có thể bằng 100% trọng lượng. Nếu muốn, chế phẩm có thể chứa một hoặc hai hoặc nhiều chất phụ gia đã biết được sử dụng trong mỹ phẩm.

Phương pháp sản xuất chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế tốt hơn là bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ. Phương pháp sản xuất chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin bao gồm bước như vậy cũng được bao gồm trong sáng chế. Nguồn nitơ này chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Phương pháp sản xuất chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế và các phương án được ưu tiên của nó là giống như phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin và các phương án được 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 phụ gia thực phẩm đã biết hoặc phụ gia mỹ phẩm đã biết, vào tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó, nếu muốn.

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

nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ.

Trong phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, nguồn nitơ tốt hơn là chứa protein chứa L-hydroxyprolin hoặc peptit chứa L-hydroxyprolin. Trong phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, protein chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là protein collagen, và peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là peptit collagen. Trong phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, protein collagen và peptit collagen tốt hơn là có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 100000. Trong phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường lỏng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 5% trọng lượng, và tỷ lệ trọng lượng (C/N) giữa nguồn cacbon (C) với nguồn nitơ (N) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20. Quy trình nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong từ 10 đến 100 giờ, tốt hơn nữa là từ 10 đến 80 giờ.

Việc sử dụng theo một phương án khác của sáng chế là sử dụng ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* để sản xuất L-hydroxyprolin. Việc sử dụng tốt hơn là bao gồm việc tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này 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.

Khi sử dụng theo một phương án khác của sáng chế, protein chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là protein collagen, và peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là peptit collagen. Khi sử dụng theo một phương án khác của sáng chế, protein collagen và

peptit collagen tốt hơn là có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 100000. Khi sử dụng theo một phương án khác của sáng chế, nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường lỏng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1 đến 5% trọng lượng, và tỷ lệ trọng lượng (C/N) giữa nguồn cacbon (C) với nguồn nitơ (N) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20. Quy trình nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong từ 10 đến 100 giờ, tốt hơn nữa là từ 10 đến 80 giờ.

Các ví dụ về protein chứa L-hydroxyprolin bao gồm các protein collagen được mô tả trên đây. Protein chứa L-hydroxyprolin như protein collagen tốt hơn là có phân tử lượng trung bình cao hơn 10000 và không cao hơn 100000. Phân tử lượng trung bình của protein dùng để chỉ phân tử lượng trung bình theo trọng lượng. Phân tử lượng trung bình của protein chứa L-hydroxyprolin như protein collagen được tính bằng sắc ký lọc gel, chẳng hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ thử nghiệm giải thích sáng chế một cách cụ thể hơn sẽ được thể hiện dưới đây. Sáng chế không nên bị giới hạn ở các ví dụ thử nghiệm này.

Trong các ví dụ thử nghiệm, dung dịch tiêu chuẩn L-hydroxyprolin (Hyp) để tạo ra đường cong hiệu chỉnh được điều chế bằng cách sử dụng L-4-hydroxyprolin có sẵn từ Nacalai Tesque, Inc. Dung dịch tiêu chuẩn L-prolin (Pro) được điều chế bằng cách sử dụng L-prolin có sẵn 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.

Ví dụ thử nghiệm 1

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

Thử nghiệm sàng lọc từ thứ nhất đến thứ ba được thực hiện theo các chỉ tiêu sau đây để sàng lọc các loài tích lũy Hyp trong dịch nuôi cấy tế bào của chúng.

Chỉ tiêu thử nghiệm sàng lọc thứ nhất: sản xuất etanol và tốc độ sinh trưởng

Chỉ tiêu thử nghiệm sàng lọc thứ hai: tích lũy Hyp (phép đo màu)

Chỉ tiêu thử nghiệm sàng lọc thứ ba: tích lũy Hyp (HPLC)

Khả năng tái sản xuất: tích lũy Hyp (HPLC)

Các chủng từ các loài khác nhau được thể hiện trong các bảng từ 1 đến 3 được thử nghiệm.

Bảng 1

Chi	Loài	EtOH (%)
<i>Pichia</i>	<i>kudriavzevii</i>	0,03
<i>Candida</i>	<i>zemplanina</i>	0,22
<i>Issatchenkia</i>	<i>siamensis</i>	0,02
<i>Millerozyma</i>	<i>farinosa</i>	0,10
<i>Kodamaea</i>	<i>ohmeri</i>	0,03
<i>Candida</i>	<i>apicola</i>	0,20
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>rouxii</i>	0,24
<i>Candida</i>	<i>lactis-condensi</i>	0,62
<i>Candida</i>	<i>rugosa</i>	0,03
<i>Hyphopichia</i>	<i>burtonii</i>	0,04
<i>Candida</i>	<i>intermedia</i>	0,02
<i>Pichia</i>	<i>sp</i>	0,02
<i>Trigonopsis</i>	<i>variabilis</i>	0,01
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>pseudorouxii</i>	0,11
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>siamensis</i>	0,08
<i>Citeromyces</i>	<i>siamensis</i>	0,15
<i>Pichia</i>	<i>fermentans</i>	0,01
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>pijperi</i>	0,01
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>sydowiorum</i>	0,00
<i>Candida</i>	<i>morakotiae</i>	0,02
<i>Candida</i>	<i>etchellsii</i>	0,04
<i>Candida</i>	<i>pararugosa</i>	0,02
<i>Dipodascus</i>	<i>magnusii</i>	0,00
<i>Hanseniaspora</i>	<i>vineae</i>	0,00
<i>Candida</i>	<i>colliculosa</i>	0,06
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>sp</i>	0,24

<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	0,05
<i>Hanseniaspora</i>	<i>osmophila</i>	0,00
<i>Kloeckera</i>	<i>apiculata</i>	0,00
<i>Candida</i>	<i>glabrata</i>	0,18
<i>Pichia</i>	<i>barkeri</i>	0,00
<i>Metschnikowia</i>	<i>koreensis</i>	0,78
<i>Candida</i>	<i>homilentoma</i>	0,82
<i>Candida</i>	<i>corydali</i>	0,77
<i>Zygorhynchus</i>	<i>florentina</i>	0,93
<i>Meyerozyma</i>	<i>guilliermondii</i>	0,56
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>	0,17
<i>Starmerella</i>	<i>bombicola</i>	0,02
<i>Lachancea</i>	<i>meyersii</i>	0,11
<i>Saccharomyces</i>	<i>mikatae</i>	0,21
<i>Candida</i>	<i>pelliculosa</i>	0,00
<i>Candida</i>	<i>pulcherrima</i>	0,13
<i>Metschnikowia</i>	<i>reukaufii</i>	0,17

Bảng 2

Chi	Loài	EtOH(%)
<i>Kazachstania</i>	<i>africana</i>	0,56
<i>Kazachstania</i>	<i>unispora</i>	0,41
<i>Kazachstania</i>	<i>aerobia</i>	0,51
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>japonicus</i>	0,74
<i>Pichia</i>	<i>kluyveri</i>	0,00
<i>Candida</i>	<i>zemplanina</i>	0,36
<i>Hanseniaspora</i>	<i>opuntiae</i>	0,02
<i>Starmerella</i>	<i>sp</i>	0,50
<i>Kazachstania</i>	<i>exigua</i>	0,68
<i>Saccharomyces</i>	<i>exiguus</i>	0,55
<i>Candida</i>	<i>holmii</i>	0,43
<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>	0,04
<i>Candida</i>	<i>railenensis</i>	0,33
<i>Candida</i>	<i>ernobii</i>	0,35
<i>Debaryomyces</i>	<i>nepalensis</i>	0,07
<i>Candida</i>	<i>sake</i>	0,04
<i>Saccharomyces</i>	<i>kudriavzevii</i>	0,52

<i>Candida</i>	<i>sorbosivorans</i>	0,06
<i>Peterozyma</i>	<i>toletana</i>	0,04
<i>Nakazawaea</i>	<i>holstii</i>	0,23
<i>Candida</i>	<i>succiphila</i>	0,39
<i>Candida</i>	<i>lessepsii</i>	0,32
<i>Staphylococcus</i>	<i>haemolyticus</i>	0,18
<i>Pichia</i>	<i>scolyti</i>	0,18
<i>Lachancea</i>	<i>kluyveri</i>	0,05
<i>Candida</i>	<i>pomicola</i>	0,04
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bailii</i>	0,23
<i>Pichia</i>	<i>manshurica</i>	0,16
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>bisporus</i>	0,30
<i>Meyerozyma</i>	<i>guilliermondii</i>	0,17
<i>Meyerozyma</i>	<i>caribbica</i>	0,10
<i>Candida</i>	<i>bombi</i>	0,25
<i>Metschnikowia</i>	<i>reukaufii</i>	0,33
<i>Pichia</i>	<i>silvicola</i>	0,38
<i>Kazachstania</i>	<i>ichnusae</i>	0,74
<i>Candida</i>	<i>salmanticensis</i>	0,33
<i>Candida</i>	<i>xestbii</i>	0,13
<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>	0,00
<i>Hanseniaspora</i>	<i>thailandica</i>	0,00

Bảng 3

Chi	Loài	EtOH(%)
<i>Saccharomycodes</i>	<i>ludwigii</i>	0,24
<i>Candida</i>	<i>nivariensis</i>	0,02
<i>Candida</i>	<i>tolerans</i>	0,18
<i>Hanseniaspora</i>	<i>hailandica</i>	0,00
<i>Candida</i>	<i>peltata</i>	0,11
<i>Candida</i>	<i>floricola</i>	0,24
<i>Issatchenkia</i>	<i>terricola</i>	0,04
<i>Clavispora</i>	<i>lusitaniae</i>	0,05
<i>Candida</i>	<i>carpophila</i>	0,19
<i>Trigonopsis</i>	<i>cantarellii</i>	0,16
<i>Candida</i>	<i>valida</i>	0,01
<i>Candida</i>	<i>californica</i>	0,03
<i>Candida</i>	<i>inconspicua</i>	0,02
<i>Brettanomyces</i>	<i>bruxellensis</i>	0,28

<i>Kluyveromyces</i>	<i>thermotolerans</i>	0,85
<i>Pichia</i>	<i>nakasei</i>	0,30
<i>Starmerella</i>	<i>bacillaris</i>	0,50
<i>Zygorhizula</i>	<i>sp</i>	0,39
<i>Pichia</i>	<i>occidentalis</i>	0,05
<i>Candida</i>	<i>natalesensis</i>	0,11
<i>Candida</i>	<i>blatta</i>	0,17
<i>Candida</i>	<i>saopaulonensis</i>	0,17
<i>Kloeckera</i>	<i>hatyaiensis</i>	0,24
<i>Candida</i>	<i>dendronema</i>	0,36
<i>Metschnikowia</i>	<i>pulcherrima</i>	0,34
<i>Tetrapisispora</i>	<i>iriomotensis</i>	0,33
<i>Torulaspora</i>	<i>pretoriensis</i>	0,16
<i>Candida</i>	<i>lambica</i>	0,02
<i>Tetrapisispora</i>	<i>nanseiensis</i>	0,55
<i>Candida</i>	<i>quercitrusa</i>	0,10
<i>Candida</i>	<i>chrysomelidarum</i>	0,06
<i>Meyerozyma</i>	<i>caribbica</i>	0,06
<i>Metschnikowia</i>	<i>fructicola</i>	0,71
<i>Candida</i>	<i>oleophila</i>	0,11

Trong thử nghiệm sàng lọc từ thứ nhất đến thứ ba, bước nuôi cấy sơ bộ và nuôi cấy chính được thực hiện trong các điều kiện dưới đây. Môi trường lỏng YPD được sử dụng trong quá trình nuôi cấy sơ bộ và nuôi cấy chính có tỷ lệ Y:P:D bằng 1:2:2 (tỷ lệ trọng lượng) (Y: chiết phẩm nấm men (tên sản phẩm Yeast Extract (#212750) (Bacto)) 1,0% trọng lượng, P: pepton (tên sản phẩm Peptone (#211677) (Bacto), thu được bằng cách phân hủy tế bào của bò bằng enzym có nguồn gốc từ tụy lợn) 2,0% trọng lượng, D: glucoza 2,0% trọng lượng).

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng ủ của mỗi chủng được cấy vào 3mL môi trường lỏng YPD và được nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 30°C trong một ngày để thu được dịch nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Dịch nuôi cấy sơ bộ (100μL) được cấy vào 5mL môi trường lỏng YPD, sau đó

nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C kết hợp lắc (60 vòng/phút) trong một ngày để thu được dịch nuôi cấy tế bào nấm men (giống cấy tế bào).

Các mẫu nuôi cấy được sử dụng để đo lượng Hyp trong thử nghiệm sàng lọc thứ hai và thứ ba được tạo ra bằng cách đưa dịch nuôi cấy tế bào nấm men thu được trong quá trình nuôi cấy chính qua bước tự phân và bước tiệt trùng sau đây.

Bước tự phân

Dịch nuôi cấy tế bào nấm men được ủ ở nhiệt độ 50°C trong hai giờ, để các thành phần tế bào được giải phóng trong dịch nuôi cấy bằng cách tự phân.

Bước tiệt trùng

Dịch nuôi cấy sau khi tự phân được ủ ở nhiệt độ 80°C trong một giờ.

Chiết phẩm thu được được ly tâm (3000 vòng/phút, 5 phút, 1°C) để loại bỏ phần cặn tế bào, từ đó tạo ra mẫu nuôi cấy để đo mức độ tích lũy Hyp.

1. Thử nghiệm sàng lọc thứ nhất

(1) Sản xuất ethanol

Đối với 116 chủng nấm men được thể hiện trong các bảng từ 1 đến 3, nồng độ ethanol được đo trong phần dịch nổi trên bề mặt của dịch nuôi cấy tế bào thu được bằng cách nuôi cấy chính (30°C, một ngày, nuôi cấy lắc). Nồng độ ethanol được đo bằng Bio Sensor BF5 (Oji Scientific Instruments).

Các bảng từ 1 đến 3 thể hiện nồng độ ethanol trong phần dịch nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy của nấm men được sử dụng trong thử nghiệm.

Phần dịch nổi trên bề mặt dịch nuôi cấy tế bào của tất cả các nấm men (116 chủng) được sử dụng trong thử nghiệm có nồng độ ethanol bằng 1% thể tích/thể tích hoặc thấp hơn.

(2) Tốc độ sinh trưởng

Tiếp theo, đường cong sinh trưởng của nấm men được xác định. Đường cong này được xác định bằng cách đo mức độ hấp thụ (660nm) của dịch nuôi cấy tế bào với TVS 062CA (Advantec). Trong số các chủng, 100 chủng (các chủng khác với 16 chủng dưới đây) có tốc độ sinh trưởng cao được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc thứ hai và thứ ba.

Các chủng không được sử dụng trong thử nghiệm sàng lọc thứ hai và thứ ba

Zygosaccharomyces rouxii, *Zygosaccharomyces pseudorouxii*, *Zygosaccharomyces siamensis*, *Candida etchellsii*, *Starmerella bombicola*, *Starmerella* sp, *Candida holmii*, *Rahnella aquatilis*, *Candida railenensis*, *Candida ernobii*, *Debaryomyces nepalensis*, *Candida sake*, *Peterozyma toletana*, *Trigonopsis cantarellii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida oleophila*

2. Thử nghiệm sàng lọc thứ hai

Các mức tích lũy Hyp của 100 chủng được chọn lọc trong thử nghiệm sàng lọc thứ nhất được so sánh bằng phép đo màu như được mô tả dưới đây.

Ống Eppendorf dung tích 2mL được nạp 0,2mL chất đệm borat 0,5M và 0,4mL mẫu nuôi cấy (hoặc dung dịch tiêu chuẩn Hyp) và hỗn hợp này được khuấy đến mức độ thích hợp. Sau khi giữ yên ở nhiệt độ trong phòng trong năm phút, ống này được giữ yên trong bể đá (0°C) trong năm phút. Tiếp theo, bổ sung 0,2mL dung dịch cloramin-T 0,2M, và ống này được đặt trong bể đá (0°C) trong 120 phút kết hợp khuấy ngắt quãng (phản ứng oxy hóa). Dung dịch sau phản ứng oxy hóa được bổ sung 0,4mL dung dịch nước natri thiosulfat 3,6M. Ống này được bịt chặt và được gia nhiệt trong bể nước sôi trong 30 phút (phản ứng khử carboxyl hóa). Dung dịch sau phản ứng khử carboxyl được làm mát xuống nhiệt độ trong phòng trong nước máy. Sau đó, 0,6mL etyl axetat được bổ sung, và ống được lắc mạnh trong thiết bị lắc trong 20 phút. Ống được đập bằng nắp trong quá trình khử carboxyl và chiết etyl axetat để ngăn chặn sự hở ống.

Dung dịch thu được được ly tâm (1500 vòng/phút, 5 phút). Phần phân ước 0,4mL của lớp etyl axetat (lớp trên: không màu) sau đó được đưa vào trong ống Eppendorf dung tích 1,5mL, và bổ sung vào đó 0,16mL chất phản ứng Ehrlich (màu vàng). Hỗn hợp này được giữ yên ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút, từ đó mẫu được tạo ra (phản ứng màu: mẫu chuyển sang màu đỏ nếu Hyp có mặt). Mẫu trong ống được tạo ra bằng cách bổ sung 0,16mL chất phản ứng Ehrlich vào 0,4mL etyl axetat và để yên hỗn hợp ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút.

Mẫu này được phân tán trong phần phân ước 200 μ L trong đĩa thủy tinh (96 giếng, trong suốt, đáy phẳng). Đường cơ sở ở 650nm được thiết lập đến không trong thiết bị đọc đĩa (Tecan, Infinite M200 Pro), và sau đó mức hấp thụ ở 560nm được đo (màng phim được áp dụng vào đĩa để ngăn chặn hiện tượng bay hơi và ăn mòn do axit của thiết bị).

Đường cong hiệu chỉnh được tạo ra bằng cách sử dụng dung dịch tiêu chuẩn Hyp (nồng độ Hyp từ 2,5 đến 0,25 μ g/mL), và nồng độ Hyp trong mẫu nuôi cấy được xác định. Hai mươi hai chủng có mẫu nuôi cấy được thể hiện là có hàm lượng Hyp cao bằng phép đo màu được chọn từ các chủng được thử nghiệm.

3. Thử nghiệm sàng lọc thứ ba

Mức độ tích lũy Hyp được đo bằng HPLC, mà chính xác hơn so với phương pháp đo màu, với các mẫu nuôi cấy của các chủng giống như các chủng trong thử nghiệm sàng lọc thứ hai.

Đối với HPLC, axit amin bậc một (nhóm amin bậc một) và axit amin bậc hai (nhóm amin bậc hai) được đánh dấu huỳnh quang trong thiết bị lấy mẫu tự động. Hệ thống phân tích HPLC pha đảo được sử dụng. Bước đánh dấu huỳnh quang của nhóm amin bậc một được thực hiện bằng o-phthalaldehyt (OPA), và bước đánh dấu huỳnh quang của nhóm amin bậc hai được thực hiện bằng 9-florenylmetyl cloformat (FMOC).

Mỗi mẫu nuôi cấy được pha loãng trong HCl 0,1N để thu được mẫu. Mẫu này được lọc qua thiết bị lọc 0,45 μ m vào lọ mẫu, và thiết lập trong thiết bị lấy mẫu tự động. Lọ rỗng được nạp 30 μ L chất phản ứng axit mercaptopropionic (MPA), 15 μ L chất phản ứng OPA, và 5 μ L mẫu và được giữ yên trong một phút. Sau đó, 5 μ L chất phản ứng FMOC được bổ sung. Các thành phần được cho phản ứng trong hai phút, và 1 μ L dung dịch thu được được đưa 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 ra các bước sóng huỳnh quang tương ứng với hai kênh, tất cả các axit amin có thể được phát hiện ra đồng thời.

Các thiết bị và điều kiện được sử dụng trong phép phân tích HPLC được liệt kê dưới đây.

Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao High Performance Liquid Chromatograph Nexera X2 system (tên sản phẩm), Shimadzu Corp.

Thiết bị kiểm soát hệ thống: CBM-20A, bộ phân phối dung môi: LC-30AD (hai bộ), bộ khử khí: DGU-20A5R, bộ trộn: MR 180 μ L II, thiết bị lấy mẫu tự động: SIL-30AC, lò dạng cột: CTO-20AC, thiết bị 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 μ m (GL Sciences Inc.)

Cột chắn: UHPLC Fitting (tên sản phẩm, GL Sciences Inc.) (áp suất tối đa: 130MPa)

Pha động

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

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

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

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

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

Tốc độ dòng chảy: 0,8 mL/phút

Nhiệt độ lò dạng cột: 35°C

Thể tích phun: 1 μ L

Phát hiện:

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

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

Nhiệt độ tế bào: 25°C, hệ số tăng: $\times 4$, độ nhạy: trung bình

Chương trình gradien (nồng độ (%) của dung dịch B là theo thể tích/thể tích (%))

0 đến 1,5 phút: nồng độ B 10%

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

6 đến 11 phút: nồng độ B 30% $\rightarrow$ 40%

11 đến 15 phút: nồng độ B 100%

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

25 phút: dừng thiết bị kiểm soát

Đường cong hiệu chỉnh: 6,25 μ mol/L, 25 μ mol/L, 50 μ mol/L, và 100 μ mol/L dung dịch chứa từng axit amin trong HCl 0,1N được điều chế. Mỗi một trong các dung dịch được cho phản ứng với các 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 tiêu chuẩn của hỗn hợp các axit amin, Typ H chứa dung dịch axit clohydric 0,1N và L-hydroxyprolin được cho phản ứng với các chất phản ứng theo cách

tương tự như được mô tả trên đây, và được phân tích bằng HPLC với các thiết bị và điều kiện trên đây.

Fig.2 thể hiện biểu đồ HPLC thu được bằng cách phân tích dung dịch tiêu chuẩn của hỗn hợp các axit amin, Typ H chứa dung dịch axit clohydric 0,1N và L-hydroxyprolin (nồng độ của mỗi axit amin: 20 μ mol/L) ((a): được phát hiện ra với Ch1 ở bước sóng kích thích bằng 350nm và bước sóng huỳnh quang bằng 450nm, (b): được phát hiện ra với Ch2 ở bước sóng kích thích bằng 266nm và bước sóng huỳnh quang bằng 305nm). Dung dịch tiêu chuẩn của hỗn hợp các axit amin, Typ H thu được từ Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Phép đo HPLC cũng cho thấy rằng lượng Hyp là lớn trong giống cây tế bào của 22 chủng mà thể hiện mức tích lũy Hyp cao trong thử nghiệm sàng lọc thứ hai. Fig.1 thể hiện các kết quả của phép đo HPLC của lượng Hyp trong các mẫu nuôi cấy được tạo ra từ giống cây tế bào của 22 chủng. Không phát hiện ra Hyp tự do trong môi trường lỏng trước khi bắt đầu nuôi cấy.

Fig.1 thể hiện các kết quả của phép đo HPLC của lượng Hyp trong các mẫu nuôi cấy.

Khả năng tái sản xuất từ các kết quả được xác nhận đối với 11 chủng có mẫu nuôi cấy chứa 90 μ g/mL Hyp hoặc lớn hơn sau đây như được đo bằng HPLC.

Meyerozyma caribbica (hai chủng), *Candida chrysomelidarum*, *Candida saopaulonensis*, *Candida blattae*, *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia reukaufii* (hai chủng), *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida morakotiae*, *Kodamaea ohmeri*.

4. Xác nhận khả năng tái sản xuất

Khả năng tái sản xuất từ các kết quả được xác nhận đối với 11 chủng.

Bước nuôi cấy sơ bộ và nuôi cấy chính của mỗi chủng được thực hiện như trong thử nghiệm sàng lọc thứ ba. Dịch nuôi cấy tế bào thu được trong bước nuôi cấy chính

được đưa qua bước tự phân nấm men, từ đó mẫu nuôi cấy được tạo ra. Lượng Hyp trong mẫu nuôi cấy được đo bằng HPLC như trong thử nghiệm sàng lọc thứ ba. Tất cả 11 chủng đều cho thấy các kết quả tương tự với các kết quả thu được bằng thử nghiệm sàng lọc thứ ba, xác nhận khả năng tái sản xuất.

Ví dụ thử nghiệm 2

Theo mức tích lũy Hyp từ các kết quả của Ví dụ thử nghiệm 1 và độ an toàn để sử dụng trong thực phẩm, mỹ phẩm, và các sản phẩm khác, sáu chủng sau đây có triển vọng để tạo ra tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa Hyp: *Meyerozyma caribbica* (hai chủng), *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Kodamaea ohmeri*. Các thử nghiệm tiếp theo được thực hiện trên sáu chủng này.

Quy trình nuôi cấy chính của mỗi một trong sáu chủng được thực hiện kết hợp thay đổi hợp phần môi trường YPD (tỷ lệ Y:P:D và kiểu P) và thời gian nuôi cấy. Lượng Hyp và Pro trong giống cấy tế bào được đo.

Nuôi cấy sơ bộ

Môi trường lỏng YPD có tỷ lệ Y:P:D bằng 1:2:2 (tỷ lệ trọng lượng) (Y: chiết phẩm nấm men 1,0% trọng lượng, P: pepton 2,0% trọng lượng, D: glucoza 2,0% trọng lượng) được sử dụng. Chiết phẩm nấm men và pepton là giống như chiết phẩm nấm men và pepton được sử dụng trong Ví dụ thử nghiệm 1.

Quy trình nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong các điều kiện giống như trong thử nghiệm sàng lọc thứ nhất trong Ví dụ thử nghiệm 1.

Nuôi cấy chính

Dịch nuôi cấy sơ bộ thu được (100 μ L) được cấy vào 5mL môi trường lỏng YPD dưới đây, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C kết hợp lắc (60 vòng/phút). Thời gian nuôi cấy là một hoặc hai ngày. Vì vậy, thu được dịch nuôi cấy tế bào (giống cấy tế bào).

Trong quy trình nuôi cấy chính, P trong môi trường lỏng YPD là pepton hoặc peptit collagen (CP). Peptit collagen là Collagen Peptide IXOS HDL-50SP (tên sản phẩm, Nitta Gelatin Inc., phân tử lượng trung bình 5000) (sau đây được đề cập đến là peptit collagen (CP1)) hoặc Collagen Peptide Type S (tên sản phẩm, Nitta Gelatin Inc., phân tử lượng trung bình 1200) (sau đây được đề cập đến là peptit collagen (CP2)). Môi trường YPD trong đó pepton được thay thế bằng peptit collagen còn được đề cập đến là môi trường cải biến YPD.

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

Bảng 4

Điều kiện nuôi cấy	Hợp 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

Mẫu nuôi cấy để đo lượng Hyp được tạo ra bằng cách đưa dịch nuôi cấy tế bào nấm men thu được trong quy trình nuôi cấy chính qua quá trình tự phân, tiệt trùng, và

loại bỏ phần cận tế bào như trong Ví dụ thử nghiệm 1. Mẫu nuôi cấy thu được được pha loãng trong dung dịch axit clohydric 0,1N để tạo ra mẫu HPLC. Các mẫu nuôi cấy đã được tạo ra từ dịch nuôi cấy tế bào thu được bằng cách nuôi cấy một ngày được pha loãng 10 lần. Các mẫu nuôi cấy đã được tạo ra từ dịch nuôi cấy tế bào thu được bằng cách nuôi cấy hai ngày được pha loãng 40 lần. Mỗi một trong các mẫu này được cho phản ứng với các chất phản ứng MPA, OPA, và FMOC và được phân tích bằng HPLC như trong Ví dụ thử nghiệm 1.

Các thiết bị và điều kiện được sử dụng trong HPLC là giống như các thiết bị và điều kiện trong thử nghiệm sàng lọc thứ ba.

Các đường cong hiệu chỉnh được tạo ra như sau: đối với mỗi trong số Hyp và Pro, các dung dịch 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 HCl 0,1N được điều chế. Mỗi một trong các dung dịch này được cho phản ứng với các chất phản ứng MPA, OPA, và FMOC và được phân tích bằng HPLC như trong Ví dụ thử nghiệm từ 1 để xây dựng đường cong hiệu chỉnh.

Bảng 5 thể hiện các kết quả của quá trình định lượng Hyp trong các mẫu nuôi cấy. Trong bảng này, CP1 là peptit collagen (CP1) (tên sản phẩm Collagen Peptide IXOS HDL-50SP) và CP2 là peptit collagen (CP2) (tên sản phẩm Collagen Peptide Type S). Bảng 6 thể hiện các kết quả của quá trình định lượng Pro trong các mẫu nuôi cấy. Các điều kiện nuôi cấy trong bảng này là giống như các điều kiện nuôi cấy đối với quy trình nuôi cấy chính. Môi trường lỏng trước nuôi cấy hầu như không chứa Hyp tự do.

Bảng 5

		Hyp ($\mu\text{g/mL}$)											
Điều kiện nuôi cấy	Hợp phần môi trường	Y:P:D = 1:2:2						Y:P:D = 1:4:5					
	P	Pepton		CP1		CP2		Pepton		CP1		CP2	
	Thời gian	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	88,27	97,45	27,59	24,67	144,89	170,13	109,59	141,52	48,69	68,53	220,03	295,40
	<i>Clavispora lusitaniae</i>	93,47	103,45	35,86	33,90	113,94	128,61	72,28	98,97	65,92	89,24	129,33	182,37
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	63,54	53,62	20,81	17,61	124,28	118,13	80,43	72,44	28,73	40,81	196,34	203,93
	<i>Metschnikowia reukaufii</i>	95,80	143,44	68,52	94,48	148,11	203,79	186,71	436,23	103,04	160,17	267,40	615,83
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	58,30	54,12	21,37	21,10	133,90	134,39	77,66	68,69	44,47	55,81	223,92	195,01
	<i>Kodamaea ohmeri</i>	287,51	389,84	158,28	220,34	304,68	436,88	280,75	595,08	232,09	460,01	390,67	711,91

Bảng 6

		Pro (µg/mL)											
Điều kiện nuôi cấy	Hợp phần môi trường	Y:P:D=1:2:2						Y:P:D=1:4:5					
	P	Pepton		CP1		CP2		Pepton		CP1		CP2	
	Thời gian	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày
<i>Meyerozyma caribbica</i>		18,51	0,00	10,03	0,00	9,41	0,00	83,61	4,39	19,81	0,00	46,65	0,00
<i>Clavispora lusitaniae</i>		8,43	0,00	5,51	0,00	15,06	0,00	37,94	0,00	23,10	0,00	124,51	4,36
<i>Meyerozyma caribbica</i>		13,87	0,00	9,72	0,00	12,11	0,00	147,70	19,64	10,48	13,76	115,42	17,56
<i>Metschnikowia reukaufii</i>		55,44	17,95	36,87	53,08	81,41	116,72	35,28	10,18	28,54	48,81	54,69	11,69
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>		18,69	0,00	11,07	0,00	13,65	0,00	127,41	17,82	22,09	0,00	64,34	4,37
<i>Kodamaea ohmeri</i>		217,53	231,14	112,41	76,83	178,68	203,80	261,55	310,08	154,11	36,62	266,25	262,17

Tỷ lệ ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$) giữa lượng ($\mu\text{g/mL}$) Hyp với tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) Pro và Hyp trong mỗi mẫu nuôi cấy được tính từ các kết quả được thể hiện trong bảng 5 và 6. Bảng 7 thể hiện các kết quả.

Bảng 7

		100 x Hyp/(Pro+Hyp)											
Điều kiện nuôi cấy	Hợp phần môi trường	Y:P:D = 1:2:2						Y:P:D = 1:4:5					
	P	Pepton		CP1		CP2		Pepton		CP1		CP2	
	Thời gian	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	82,7	100,0	73,3	100,0	93,9	100,0	56,7	97,0	71,1	100,0	82,5	100,0
	<i>Clavispora lusitanae</i>	91,7	100,0	86,7	100,0	88,3	100,0	65,6	100,0	74,1	100,0	50,9	97,7
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	82,1	100,0	68,2	100,0	91,1	100,0	35,3	78,7	73,3	74,8	63,0	92,1
	<i>Metschnikowia reukauffii</i>	63,3	88,9	65,0	64,0	64,5	63,6	84,1	97,7	78,3	76,6	83,0	98,1
	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	75,7	100,0	65,9	100,0	90,7	100,0	37,9	79,4	66,8	100,0	77,7	97,8
	<i>Kodamaea ohmeri</i>	56,9	62,8	58,5	74,1	63,0	68,2	51,8	65,7	60,1	92,6	59,5	73,1

Tất cả sáu chủng nấm men được thử nghiệm tích lũy L-hydroxyprolin khi được nuôi cấy hiếu khí. Tất cả các giống cấy tế bào thu được có tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) bằng 35 hoặc cao hơn.

Ví dụ thử nghiệm 3

Meyerozyma caribbica, *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Kodamaea ohmeri* được thể hiện trong Bảng 8 được sử dụng. Nấm men được nhận diện bằng số NBRC được thể hiện trong Bảng 8 thu được từ Viện Công nghệ và Đánh giá Quốc gia (National Institute of Technology and Evaluation, 2-5-8 Kazusa-kamatari, Kisarazu, Chiba, Nhật Bản).

Bảng 8

Chủng	Số đăng ký
<i>Kodamaea ohmeri</i>	NBRC 1271 T
	NBRC 1484
	NBRC 1483
	NBRC 1482
	NBRC 0158
<i>Clavispora lusitaniae</i>	NBRC 10059 T
	NBRC 1019
	NBRC 10058
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	NBRC 1679 T
	NBRC 1405
	NBRC 10798
	NBRC 10799
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NBRC 10279 T
	NBRC 0454
	NBRC 0837
	NBRC 0838
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NBRC 1913
	NBRC 0679 T

Nuôi cấy sơ bộ

Quy trình nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong các điều kiện giống như trong Ví dụ thử nghiệm 2 ngoại trừ việc các nấm men được thể hiện trong Bảng 8 được sử dụng.

Nuôi cấy chính

Dịch nuôi cấy sơ bộ thu được (100 μ L) được cấy vào 5mL môi trường lỏng YPD dưới đây, sau đó nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C kết hợp lắc (60 vòng/phút). Thời gian nuôi cấy là một hoặc hai ngày. Vì vậy, thu được dịch nuôi cấy tế bào.

Quy trình nuôi cấy chính được thực hiện trong điều kiện nuôi cấy 11 hoặc 12 của Ví dụ thử nghiệm 2. Cụ thể, Collagen Peptide Type S (tên sản phẩm, Nitta Gelatin Inc., phân tử lượng trung bình 1200) (peptit collagen (CP2) trong Ví dụ thử nghiệm 2) được sử dụng làm P trong môi trường lỏng YPD. Tỷ lệ Y:P:D trong môi trường lỏng YPD là như sau: Y:P:D = 1:4:5 (tỷ lệ trọng lượng) (Y: chiết phẩm nấm men 1,0% trọng lượng, P: Collagen Peptide Type S 4,0% trọng lượng, D: glucoza 5,0% trọng lượng).

Mẫu nuôi cấy được điều chế từ dịch nuôi cấy tế bào như trong Ví dụ thử nghiệm 2. Mẫu nuôi cấy thu được được pha loãng trong dung dịch axit clohydric 0,1N để tạo ra mẫu HPLC. Các mẫu nuôi cấy đã được tạo ra từ dịch nuôi cấy tế bào thu được bằng cách nuôi cấy một ngày được pha loãng 20 lần. Các mẫu nuôi cấy được điều chế từ dịch nuôi cấy tế bào thu được bằng cách nuôi cấy hai ngày được pha loãng 50 lần. Mỗi một trong các mẫu này được cho phản ứng với các chất phản ứng MPA, OPA, và FMOC như trong Ví dụ thử nghiệm 2. Lượng axit amin trong các mẫu nuôi cấy được xác định bằng phép phân tích HPLC trong các điều kiện giống như trong Ví dụ thử nghiệm 2. Bảng 9 thể hiện các kết quả. Bảng 9 thể hiện tổng hàm lượng axit amin (Tổng AA) cùng với lượng Hyp và lượng Pro. Tất cả các nấm men thử nghiệm đều tích lũy L-hydroxyprolin trong môi trường nuôi cấy chúng khi được nuôi cấy hiếu khí. Bảng 9 cũng thể hiện mức hấp thụ (OD660) ở 660nm của dịch nuôi cấy tế bào (thời gian nuôi cấy: một ngày). Mức hấp thụ được đo bằng TVS 062CA (Advantec).

Tỷ lệ ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$) của lượng ($\mu\text{g/mL}$) Hyp với tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) của Pro và Hyp trong mỗi mẫu nuôi cấy được tính từ các kết quả được thể hiện trong Bảng 9. Bảng 10 thể hiện các kết quả tính toán. Bảng 10 còn thể hiện lượng Hyp ($\mu\text{g/mL}$) trong môi trường nuôi cấy một ngày chia cho mức hấp thụ OD660 của dịch nuôi cấy tế bào ($\mu\text{g/mL}/\text{OD660}$) (giá trị Hyp/OD660).

Bảng 9

Chủng	Số đăng ký	Hyp (µg/mL)		Pro (µg/mL)		Tổng AA (µg/mL)		O.D. 660nm
		1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	
<i>Kodamaea ohmeri</i>	NBRC 1271 T	250,94	337,65	132,71	170,66	5063,16	3766,39	1 ngày 3,603
	NBRC 1484	256,36	425,24	179,28	217,76	4543,08	4110,72	4,032
	NBRC 1483	149,16	277,14	183,26	233,07	4965,25	5644,90	4,024
	NBRC 1482	237,03	371,25	187,52	213,45	5487,91	5337,12	4,028
	NBRC 0158	341,31	575,90	155,77	196,94	4696,37	3641,03	3,692
<i>Clavispora lusitaniae</i>	NBRC 10059 T	155,56	325,05	149,36	2,75	2666,37	2417,88	3,802
	NBRC 1019	146,64	248,49	132,15	0,67	3183,28	2140,81	3,956
	NBRC 10058	142,08	332,73	134,95	40,60	2232,51	2524,33	3,676
	NBRC 1679 T	112,43	167,20	126,98	12,73	4217,98	1199,33	3,948
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	NBRC 1405	163,56	328,15	130,25	39,15	5232,67	2049,49	3,799
	NBRC 10798	199,89	380,43	77,26	21,79	5083,03	2003,28	4,013
	NBRC 10799	115,23	208,32	142,42	178,64	5151,73	5359,63	3,619
	NBRC 10279 T	118,29	147,63	116,76	147,59	5304,08	4601,69	3,699
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NBRC 0454	183,18	144,18	55,61	11,24	5230,71	3002,32	4,025
	NBRC 0837	194,00	111,02	31,88	1,52	4003,94	2169,68	4,021
	NBRC 0838	191,46	94,61	34,83	1,64	3779,62	1892,21	3,494
	NBRC 1913	129,93	130,36	94,96	9,48	3734,19	1132,65	4,033
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NBRC 0679 T	167,37	228,04	32,86	3,49	3999,69	1753,72	3,680

Bảng 10

Chủng	Số đăng ký	100 x Hyp/(Hyp+Pro)		Hyp/OD660
		1 ngày	2 ngày	1 ngày
<i>Kodamaea ohmeri</i>	NBRC 1271 T	65,4	66,4	69,6
	NBRC 1484	58,8	66,1	63,6
	NBRC 1483	44,9	54,3	37,1
	NBRC 1482	55,8	63,5	58,8
	NBRC 0158	68,7	74,5	92,4
<i>Clavispora lusitaniae</i>	NBRC 10059 T	51,0	99,2	40,9
	NBRC 1019	52,6	99,7	37,1
	NBRC 10058	51,3	89,1	38,7
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	NBRC 1679 T	47,0	92,9	28,5
	NBRC 1405	55,7	89,3	43,1
	NBRC 10798	72,1	94,6	49,8
	NBRC 10799	44,7	53,8	31,8
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	NBRC 10279 T	50,3	50,0	32,0
	NBRC 0454	76,7	92,8	45,5
	NBRC 0837	85,9	98,6	48,2
	NBRC 0838	84,6	98,3	54,8
	NBRC 1913	57,8	93,2	32,2
<i>Meyerozyma caribbica</i>	NBRC 0679 T	83,6	98,5	45,5

Ví dụ thử nghiệm 4

Nấm men được sử dụng trong Ví dụ thử nghiệm 2 và 3 được nuôi cấy như trong Ví dụ thử nghiệm 2 và 3 để tạo ra dịch nuôi cấy tế bào. Mỗi dịch nuôi cấy tế bào được ủ ở nhiệt độ 50°C trong hai giờ, sao cho các thành phần tế bào được giải phóng trong dịch nuôi cấy bằng cách tự phân, và sau đó được ủ ở nhiệt độ 80°C trong một giờ. Sau đó, dịch này được ly tâm (3000 vòng/phút, 5 phút) ở nhiệt độ 1°C để thu được chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa L-hydroxyprolin (chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp) có phần cặn tế bào được loại bỏ. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp này có thể được pha loãng một cách thích hợp trước khi sử dụng.

Phần dưới đây sẽ mô tả các ví dụ sản xuất 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 4.

Ví dụ sản xuất 1. Xà phòng

Lượng nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 11.

Phôi xà phòng được khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được trộn đồng đều với phôi này, sau đó đúc khuôn.

Bảng 11

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

Ví dụ sản xuất 2. Dầu gội đầu

Lượng nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 12.

Chất bảo quản đã được hòa tan trong một phần 1,3-butylen glycol được bổ sung vào nước tinh khiết. Hỗn hợp này được khuấy đều, và sau đó natri lauryl sulfat và monoetanolamit axit béo dầu dừa được bổ sung, sau đó bổ sung thuốc nhuộm, tinh chất thơm, 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 12

Nguyên liệu thô	Lượng (phần trọng lượng)
Natri lauryl sulfat	16
Monoetanolamit axit béo dầu dừa	4
1,3-Butylen glycol	1,9
Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp	0,1
Chất bảo quản, thuốc nhuộm, tinh chất thơm	Lượng thích hợp
Nước tinh khiết	78
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 3. Dầu xả

Lượng nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 13.

(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 xetostearylic, 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) bằng thiết bị đồng nhất hóa. Hỗn hợp này được khuấy sơ bộ trong năm phút sau khi bổ sung.

(4) Sau khi kết thúc việc khuấy sơ bộ, hỗn hợp này được làm mát xuống 50°C kết hợp khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được làm mát hơn nữa xuống 35°C kết hợp khuấy để tạo ra dầu xả.

Bảng 13

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

Ví dụ sản xuất 4. Sản phẩm dưỡng tóc

Lượng nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 14.

Axit salixylic, glyxerin, và vitamin E và L-mentol đều đã được hòa tan trong etanol được bổ sung vào nước tinh khiết. Ngoài ra, dikali glyxyrhizat đã được hòa tan

trong một phần khác của nước tinh khiết được bổ sung. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp sau đó được bổ sung vào hỗn hợp, và các thành phần được trộn đều để tạo ra sản phẩm dưỡng tóc.

Bảng 14

Nguyên liệu thô	Lượng (phần trọng lượng)
Etanol	70
Vitamin E	0,4
L-mentol	0,4
Dikali glyxyrhizat	0,1
Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp	0,1
Axit salixylic	0,5
Glyxerin	0,5
Nước tinh khiết	28
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 5. Sản phẩm xịt dưỡng

Lượng nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 15.

Axit xitric và natri xitrat được hòa tan trong nước tinh khiết. Sau đó, cả chất bảo quản và polysorbat 80 đều đã hòa tan trong etanol được bổ sung. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp sau đó được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được khuấy đều để tạo ra sản phẩm xịt dưỡng.

Bảng 15

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

Ví dụ sản xuất 6. Kem dưỡng ẩm dạng lỏng

Lượng nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 16.

Axit xitric và natri xitrat được hòa tan trong nước tinh khiết. Tiếp theo, glycerin, 1,3-butylen glycol, và trinatri etylendiamintetraaxetat được bổ sung tuần tự, sau đó ete của rượu oleylic polyoxyetylen (18), vitamin E, và methyl paraben tất cả đều đã hòa tan trong etanol được bổ sung, sau đó khuấy đến khi đều. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp sau đó được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được khuấy đều để tạo ra kem dưỡng ẩm dạng lỏng.

Bảng 16

Nguyên liệu thô	Lượng (phần trọng lượng)
Glycerin	4
1,3-Butylen glycol	4
Etanol	7
Ete của rượu oleylic polyoxyetylen (18)	0,5
Axit xitric	0,05
Natri xitrat	0,1
Trinatri etylendiamintetraaxetat	0,02
Vitamin E	0,5
Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp	1
Methyl paraben	0,1
Nước tinh khiết	82,7
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 7. Sữa dưỡng ẩm

Lượng nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 17.

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

(2) Trietanolamin, natri hyaluronat, glycerin, 1,3-butylen glycol, polyoxyetylen (10) monooleat, và natri etylendiaminhydroxy triaxetat được bổ sung vào nước tinh

khuyết và được làm ấm đến 80°C.

(3) Dung dịch (2) được bổ sung vào dung dịch (1) trong khi khuấy dung dịch (1) bằng thiết bị đồng nhất hóa. Hỗn hợp được khuấy sơ bộ trong năm phút sau khi bổ sung.

(4) Sau khi kết thúc việc khuấy sơ bộ, hỗn hợp được làm mát xuống 50°C kết hợp khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được làm mát hơn nữa xuống 35°C kết hợp khuấy để tạo ra sữa dưỡng ẩm.

Bảng 17

Nguyên liệu thô	Lượng (phần trọng lượng)
Axit stearic	1,5
Rượu xetylic	0,5
Octyldodexyl myristat	5
Polyoxyetylen (10) monooleat	1
Parafin lỏng	5
Trietanolamin	0,5
Chiết phẩm nuôi cấy 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 nguyên liệu thô được trộn được thể hiện trong Bảng 18.

(1) Axit stearic, glyxeryl monostearat, sorbitan sesquistearat, polyoxyetylen sorbitan monostearat, rượu xetostearylic, squalan, dipentaerythrityl hexahydroxystearat/hexastearat/hexarosinat, dầu ô liu, octyldodexyl myristat, và metylpolysiloxan được làm ấm 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 ấm đến 80°C để hòa tan.

(3) Dung dịch (2) được bổ sung vào dung dịch (1) trong khi khuấy dung dịch (1) bằng thiết bị đồng nhất hóa. Hỗn hợp được khuấy sơ bộ trong năm phút sau khi bổ sung.

(4) Sau khi kết thúc việc khuấy sơ bộ, hỗn hợp được làm mát xuống 50°C kết hợp khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp được làm mát hơn nữa xuống 35°C kết hợp khuấy để tạo ra kem.

Bảng 18

Nguyên liệu thô	Lượng (phần trọng lượng)
Axit stearic	2,5
Glyxeryl monostearat	0,8
Sorbitan sesquistearat	0,6
Polyoxyetylen sorbitan monostearat	0,4
Rượu xetostearylic	2
Squalan	12
Dipentaerythrylhexahydroxystearat/hexastearat/hexarosinat	2
Dầu ô liu	5
Octyldodexyl myristat	15
Metylpolysiloxan	0,5
Glyxerin	10
1,3-Butylen glycol	8
Natri hydroxit	0,1
Metyl paraben	0,1
Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp	0,3
Nước tinh khiết	40,7
Tổng	100

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin theo sáng chế hữu ích 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 nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, loại trừ *Clavispora lusitaniae* CCTCC No. M205116 và *Clavispora lusitaniae* CGMCC No. 6414, chứa:

L-hydroxyprolin,

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

tế bào nấm men là tế bào nấm men được nuôi cấy, và

chiết phẩm của tế bào hoặc giống cấy tế bào là sản phẩm phân hủy tế bào thu được bằng cách đưa tế bào hoặc giống cấy tế bào chứa tế bào nấm men qua bước phân hủy tế bào hoặc

chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi sản phẩm phân hủy tế bào, chiết phẩm này chứa các thành phần tế bào.

2. Tế bào nấm men hoặc giống cấy 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 nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm 1 hoặc 2,

trong đó lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin chia cho OD660 ($\mu\text{g/mL}/\text{OD660}$) bằng 20 hoặc lớn hơn.

4. Tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn

từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, loại trừ *Clavispora lusitaniae* CCTCC No. M205116 và *Clavispora lusitaniae* CGMCC No. 6414, chứa:

L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 μ g/mL hoặc lớn hơn,

trong đó tế bào nấm men là tế bào nấm men được nuôi cấy, và

chiết phẩm của tế bào hoặc giống cấy tế bào là sản phẩm phân hủy tế bào thu được bằng cách đưa tế bào hoặc giống cấy tế bào chứa tế bào nấm men qua bước phân hủy tế bào hoặc

chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi sản phẩm phân hủy tế bào, chiết phẩm này chứa các thành phần tế bào.

5. Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin, phương pháp này bao gồm bước:

tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* bằng cách nuôi cấy hiếu khí ít nhất một nấm men này trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ,

trong đó nguồn nitơ nêu trên chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

6. Phương pháp sản xuất theo điểm 5,

trong đó peptit chứa L-hydroxyprolin là peptit collagen.

7. Phương pháp sản xuất theo điểm 6,

trong đó peptit collagen có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 10000.

8. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7,

trong đó bước nuôi cấy hiếu khí được thực hiện trong thời gian từ 10 đến 100 giờ.

9. Dược phẩm chứa:

tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

10. Thực phẩm chứa:

tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

11. Đồ uống chứa:

tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

12. Nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa:

tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

13. Mỹ phẩm chứa:

tế bào nấm men hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.

14. Nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo điểm 12,

trong đó lượng L-hydroxyprolin trong nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 300 phần triệu.

15. Mỹ phẩm theo điểm 13,

trong đó lượng L-hydroxyprolin trong mỹ phẩm nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20 phần triệu.

16. Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin chứa:

tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men của ít nhất một nấm men được chọn từ nhóm bao gồm *Kodamaea ohmeri*, *Metschnikowia reukaufii*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, và *Clavispora lusitaniae* hoặc chiết phẩm của chúng, chứa L-hydroxyprolin,

trong đó tế bào nấm men là tế bào nấm men được nuôi cấy, và

chiết phẩm của tế bào hoặc giống cấy tế bào là sản phẩm phân hủy tế bào thu được bằng cách đưa tế bào hoặc giống cấy tế bào chứa tế bào nấm men qua bước phân hủy tế bào hoặc

chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi sản phẩm phân hủy tế bào, chiết phẩm này chứa các thành phần tế bào,

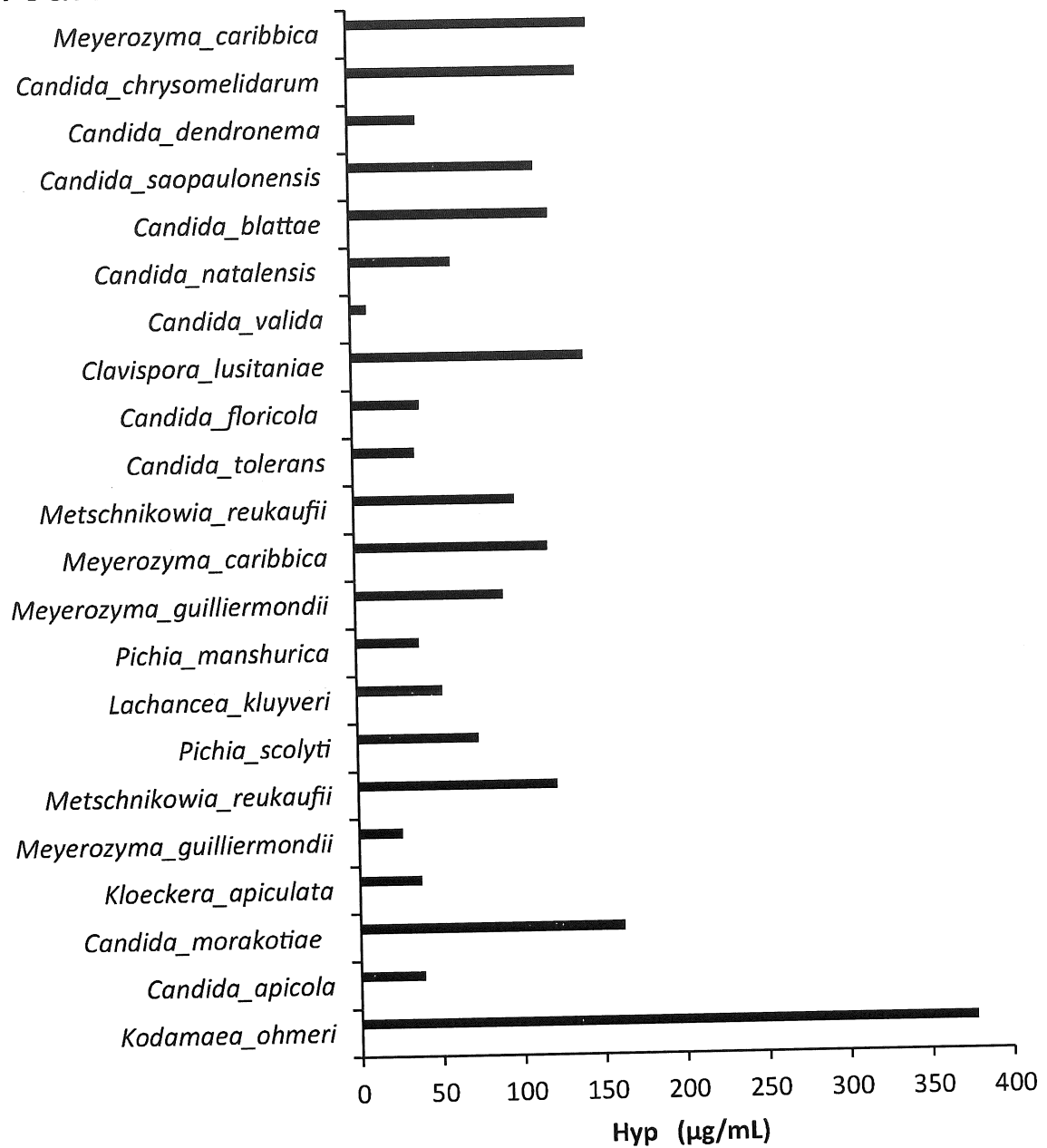
tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của chúng thỏa mãn điều kiện (1) và/hoặc (2) sau đây:

(1) trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó, tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin với 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;

(2) lượng L-hydroxyprolin trong tế bào nấm men hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó lớn hơn hoặc bằng $10 \mu\text{g/mL}$.

1/2

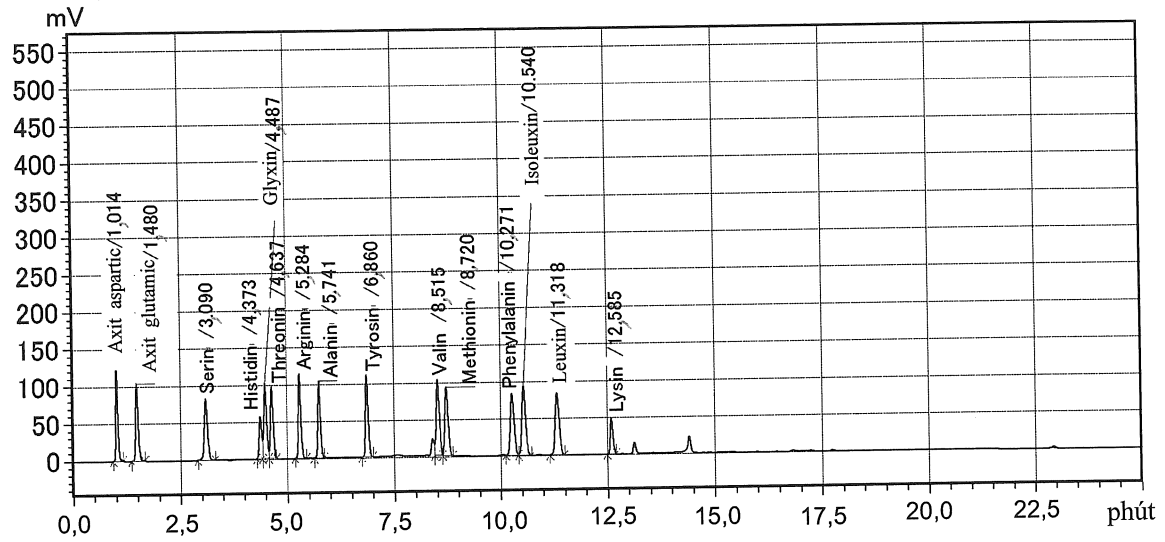
FIG.1



2/2

FIG.2

(a)



(b)

