

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **206813**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **362811**

(51) Int.Cl.
C08H 1/06 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **13.10.2003**

(54)

Sposób wytwarzania kolagenu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

18.04.2005 BUP 08/05

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.09.2010 WUP 09/10

(73) Uprawniony z patentu:

FRYDRYCHOWSKI ANDRZEJ, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANDRZEJ FRYDRYCHOWSKI, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Jacek Czabajski
Biuro Patentowe TRASET

PL 206813 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kolagenu, zwłaszcza kolagenu dla celów kosmetycznych, przy wykorzystaniu jako surowca skór ryb słodkowodnych i słonowodnych.

Termin kolagen określa grupę białek prostych (białka kolagenowe) fibrylarnych występujących powszechnie w organizmie człowieka i w organizmach zwierząt. Białko kolagenowe należące do grupy skleroproteidów tworzy włókna jednorodnej tkanki łącznej, z której zbudowane są kości, chrząstki, ścięgna i inne substancje szkieletowe organizmów zwierzęcych. Kolagen jest najważniejszym białkiem w organizmie człowieka, ponieważ stanowi według niektórych źródeł 30% całkowitej masy białka ludzkiego i 70% masy białek skóry. Cechą charakterystyczną kolagenów jest ich budowa, gdzie znaczna część cząsteczki tego białka ma postać podłużnej struktury zestawionej z trzech łańcuchów polipeptydowych skręconych jeden wokół drugiego, przy czym taka struktura przestrzenna o charakterze potrójnej helisy, jest wynikiem składu aminokwasowego łańcuchów polipeptydowych. Te trzy skręcone spiralnie łańcuchy polipeptydowe stanowią podstawę i jednocześnie element wyróżniający kolagen spośród innych białek. Kolagen typu I występujący w kości jest produktem tych samych genów, co kolagen typu I skóry, czy innych narządów. Kolagen z kości można wyekstrahować w ilości od 0,5% do 1% całej zawartości kolagenu. Analogiczne ilości możliwego do wyekstrahowania kolagenu dla innego surowca, jakim jest skóra, są znacznie wyższe. Jest to wynikiem wytwarzania w kolagenie kości licznych wiązań poprzecznych, które wykazywać mogą budowę odmienną niż w kolagenie innych narządów.

Znane są liczne sposoby otrzymywania roztworów kolagenu, gdzie między innymi wykorzystuje się jako surowiec skóry zwierzęce i skóry ryb. Ze względu na możliwość wystąpienia infekcji związanych z użyciem jako surowca materiału zwierzęcego, w wielu rozwiązaniach zwraca się uwagę na użycie materiału pozbawionego tego ryzyka. Materiałem takim są ryby, a w szczególności skóry ryb zawierające największą ilość kolagenu.

Znany jest z opisu patentowego polskiego nr 114584 sposób wytwarzania roztworu kolagenu ze wstępnie obrobionych mechanicznie, zneutralizowanych skór ryb, po usunięciu substancji tłuszczowych i mięsnych. Tak przygotowane skóry ryb dezynfekuje się 0,3% roztworem wody utlenionej lub 0,8% roztworem aldehydu mrówkowego, użytym w proporcji 1:1 w stosunku do skór rybich. Następnie odwadnia się skóry do zawartości wody w przedziale od 55% do 65% wagowych. Tak odwodnione skóry poddaje się ekstrakcji roztworem kwasu cytrynowego przy utrzymaniu zawartości pH od 2,2 do 2,4. Roztwór kwasu cytrynowego używa się według tego znanego sposobu w ilości 4 części wagowe na 1 część wagową skór rybich. Otrzymuje się roztwór kolagenu o pH około 2,8. Otrzymany roztwór konserwuje się Aseptyną.

Według innego rozwiązania, znanego z polskiego opisu zgłoszeniowego wynalazku nr P 312122, sposób otrzymywania kolagenu ze skór ryb słonowodnych i słodkowodnych polega we wstępnym etapie na przeprowadzeniu znanej i opisanej wyżej wstępnej obróbki mechanicznej polegającej na oczyszczeniu skór rybich oraz na usunięciu z nich nadmiaru wody. Ten znany sposób polega na tym, że skóry ryb zawierające nie więcej niż 45% wody traktuje się wodnym roztworem kwasu askorbinowego o stężeniu od 1% do 5% w temperaturze 283 K w stosunku wagowym w przedziale wagowym od 1:3,5 do 1:5. Następnie prowadzi się ekstrakcję rozpuszczalnikową w temperaturze od 283 K do 293 K przez okres czasu nie krótszy niż 18 godzin, najkorzystniej wynoszący od 24 do 36 godzin. Następnie ekstrakt oddziela się od wyekstrahowanych skór, poddaje się podciśnieniowej filtracji pod ciśnieniem nie niższym niż 18 mm Hg i dekantacji, otrzymując wodny roztwór kolagenu o pH od 4,0 do 4,5. Roztwór ten zawiera wielkocząsteczkowe białko w ilości od 4% do 3% wagowych.

Według innej odmiany sposobu otrzymywania kolagenu znanej z tego samego polskiego opisu zgłoszeniowego wynalazku, w przedstawionym sposobie postępowania kwas askorbinowy zastępuje się kwasem bursztynowym. Według tej znanej odmiany wyżej opisanego sposobu wytwarzania kolagenu, otrzymuje się białko wielkocząsteczkowe z wydajnością od 1% do 3% wagowych.

Jeszcze inną odmianę znanego sposobu otrzymywania kolagenu przedstawiono w tym samym polskim rozwiązaniu zgłoszonym do ochrony za numerem P 312122. Według tego rozwiązania, skóry ryb zadaje się roztworem wodnym kwasu octowego o stężeniu od 1% do 5% wagowych. Uzyskany roztwór kolagenu o pH od 4,0 do 4,2 zawiera rozpuszczone białko wielkocząsteczkowe w ilości od 1% do 3% wagowych.

W innym rozwiązaniu opisanym w Food Chemistry 81 (2003) str. 257 - 262 (M. Sadowska, I. Kołodziejska, C. Niecikowska, „Isolation of collagen from the Baltic cod”) skóra dorsza bałtyckiego,

zawierająca około 22% kolagenu poddana została jednoetapowej 24-godzinnej ekstrakcji kwasem octowym lub kwasem cytrynowym w proporcji do skór 1:6 i 1:4, i w tych warunkach około 20% kolagenu może być wyekstrahowane. W przypadku kwasu cytrynowego, uzysk kolagenu nie może być zwiększony przez proste zwiększenie proporcji kwasu do skór, lecz może to być uzyskane w przypadku ekstrakcji kwasem octowym. Jednakże roztwory kolagenu w kwasie octowym są wówczas bardziej rozcieńczone i mają charakterystyczny zapach kwasu octowego. Dlatego z punktu widzenia technicznego są mniej użyteczne.

W rozwiązaniu znanym z opisu patentowego USA nr 5,420,248 jako surowca do pozyskiwania kolagenu używa się bezpigmentowych skór ryb. Używa się więc części białych skór rybich, korzystnie skór mrożonych po pozyskaniu. Proces prowadzi się w środowisku kwaśnym dla wyekstrahowania kwaśnego roztworu kolagenu i odzyskuje się ten kwaśny roztwór kolagenu w rodzimej formie przez wydzielenie go z tego roztworu na drodze zebrania go z powierzchni.

Celem wynalazku jest opracowanie nowej technologii wytwarzania kolagenu ze skór ryb, w ich części bezpigmentowej jak i w części pigmentowej. Celem jest opracowanie technologii z użyciem surowców i produktów organicznych, oraz części urządzeń takich jak filtry, wykonanych z materiałów organicznych. Celem wynalazku jest zaproponowanie technologii pozwalającej na zachowanie w maksymalnym stopniu niezmięionej struktury kolagenu w postaci potrójnej helisy.

Według wynalazku, sposób otrzymywania kolagenu, ze skór ryb słodkowodnych i/lub słonowodnych, polegający na tym, że skóry ryb oddziela się od tusz, oczyszcza się mechanicznie z nadmiaru tłuszczu oraz poddaje się dezynfekcji, a następnie, zalewa się skóry roztworem wodnym kwasu w stężeniu od 0,05% do 10% wagowych i po czasie reakcji prowadzi się proces filtracji zawiesiny na sitach z jedwabiu, charakteryzuje się tym, że do zalania skór stosuje się roztwór kwasu glikolowego lub mieszaniny kwasu glikolowego z kwasem mlekowym w wodzie heksagonalnej, w stężeniu od 0,4% wagowego do 10% wagowych, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze od 2°C do 20°C przez czas co najmniej 12 godzin. Nie wyklucza to jednak zastosowania innych sit, a także prowadzenia procesu filtracji bezciśnieniowo lub przy małym podciśnieniu. Według wynalazku, proces ekstrakcji kolagenu prowadzi się w roztworze o pH od 1,8 do 3,8. Stwierdzono jednak, że proces ekstrakcji kolagenu najkorzystniej przebiega w roztworze o pH 2,2. Zaproponowano stosowanie roztworu wodnego kwasu lub mieszaniny kwasów o stężeniu 2%, jako najkorzystniejsze dla przebiegu procesu ekstrakcji kolagenu ze skór rybich. Szczególnie korzystne okazało się zastosowanie do sporządzenia roztworu kwasu lub kwasów wody heksagonalnej, występującej jako produkt topnienia lodowców, lecz możliwej do uzyskania na drodze magnetycznej obróbki wody. Nie wyklucza to jednak zastosowania zwykłej wody do sporządzenia roztworu. W rozwiązaniu według wynalazku zastosowano z dobrym skutkiem jako surowiec nie tylko bezpigmentowe części skór ryb, ale także części tych skór zawierające pigment. Nie wyklucza to jednak zastosowania jako surowca wyłącznie bezpigmentowych, lub wyłącznie pigmentowych części skór ryb.

W rozwiązaniu według wynalazku zaproponowano zastosowanie w procesie roztworu kwasu glikolowego lub roztworu kwasu glikolowego z kwasem mlekowym, będących środkami chemicznymi organicznymi, a więc dobrze tolerowanymi w wyrobach kosmetycznych. Jak to stwierdzono doświadczalnie kwas glikolowy jak i jego mieszanina z kwasem mlekowym wykazują podobną skuteczność w ekstrakcji kolagenu, i co ważne nie dają odczynu lub zapachu który byłby trudno tolerowany przez użytkownika gotowego produktu. Kwas glikolowy dodatkowo rozmiękcza naskórek powodując lepszą penetrację kolagenu i aminokwasów w głąb skóry. Pobudza on również wytwarzanie własnego kolagenu w skórze. Nieoczekiwanie okazało się również, że zastosowana do procesu woda heksagonalna, w naturze uzyskiwana z roztopienia lodu z lodowca a która sztucznie może być uzyskana na drodze obróbki magnetycznej, spowodowała wzrost wydajności procesu i wzrost jakości uzyskanego kolagenu, co wyraźnie zobrazowano na przedstawionych niżej wykresach HPLC. Podobnie zastosowane w procesie materiały filtracyjne nie powodują wprowadzenia w trakcie operacji technologicznych niepożądanych domieszek do kolagenu. Bezciśnieniowa technologia filtracji pozwoliła uzyskać kolagen o większym stopniu jednorodności materiału jak również zapobiega uszkodzeniu delikatnej jego struktury. Nie wyklucza się alternatywnego prowadzenia procesu filtracji przy małym podciśnieniu, co może znacząco przyspiesza filtrację. Uzyskany sposobem według wynalazku kolagen może być co do składu uzupełniony korzystnymi kosmetycznie dodatkami takimi jak witamina A, kwas liponowy, cukry jak na przykład glicerydina, co nie wyklucza uzupełnienia składu znanymi dodatkami. Uzyskany opisanym sposobem według wynalazku kolagen, otrzymany szczególnie przy użyciu kwasu glikolowego

lub jego mieszaniny z kwasem mlekowym znajduje zastosowanie także do celów kosmetycznych twarzy i okolic odsłoniętych.

Przedmiot wynalazku pokazany został w przykładach wykonania, przedstawiających różne warianty prowadzenia sposobu wytwarzania kolagenu według wynalazku.

Przykład I

Oczyszczone częściowo skóry tołpygi w ilości 30 g zadano 6 litrami roztworu kwasu glikolowego w wodzie heksagonalnej o stężeniu 0,5% wagowych. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 3°C w czasie 10 godzin. Utrzymywano pH roztworu 1,8. Następnie przeprowadzono proces filtracji roztworu w filtrze o sitach z jedwabiu naturalnego. Filtracja trwała jedną godzinę. Uzyskano 75% masy kolagenu zawartego teoretycznie w skórze, jako produkt na sicie.

Przykład II

W procesie opisanym w przykładzie I zastosowano 0,5% roztwór mieszaniny kwasu glikolowego z kwasem mlekowym w stosunku 1:1. Po przeprowadzeniu operacji wskazanych w przykładzie I uzyskano 80% masy kolagenu zawartego teoretycznie w skórze, jako produkt na sicie.

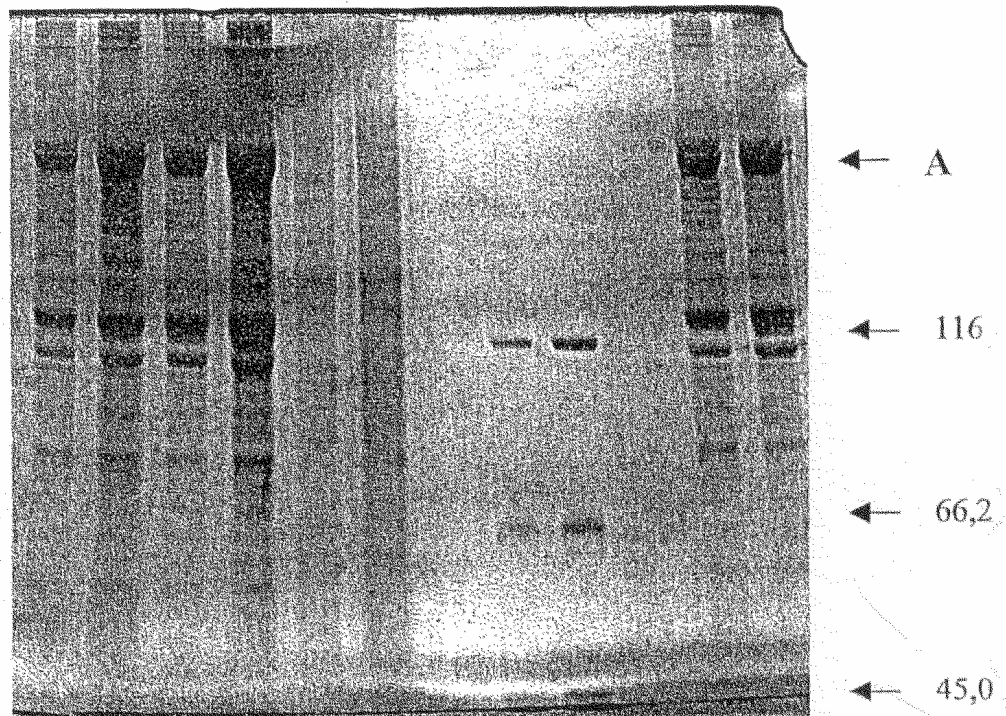
Przykład III

W procesie opisanym w przykładzie III zastosowano 2% roztwór mieszaniny kwasu glikolowego z kwasem mlekowym. Ten przykład wykonania zobrazowano przykładowymi wynikami przeprowadzonego rozkładu elektroforetycznego uzyskanego produktu, gdzie jako główny składnik oznaczono kolagen. Pozostałe prążki reprezentują towarzyszące polipeptydy i aminokwasy.

Tablica I

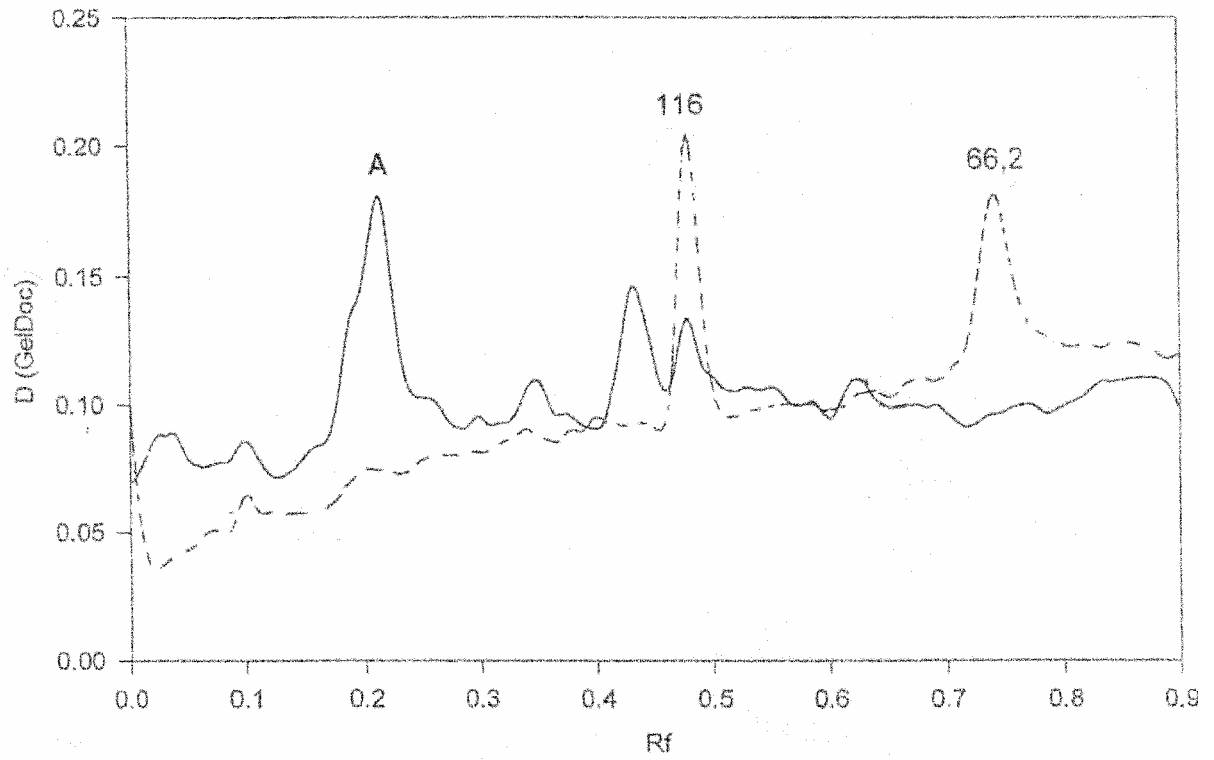
Rozkład elektroforetyczny produktu otrzymanego według przykładu IV

Elektroforeza
poliakrylamidowa
SDS
10%



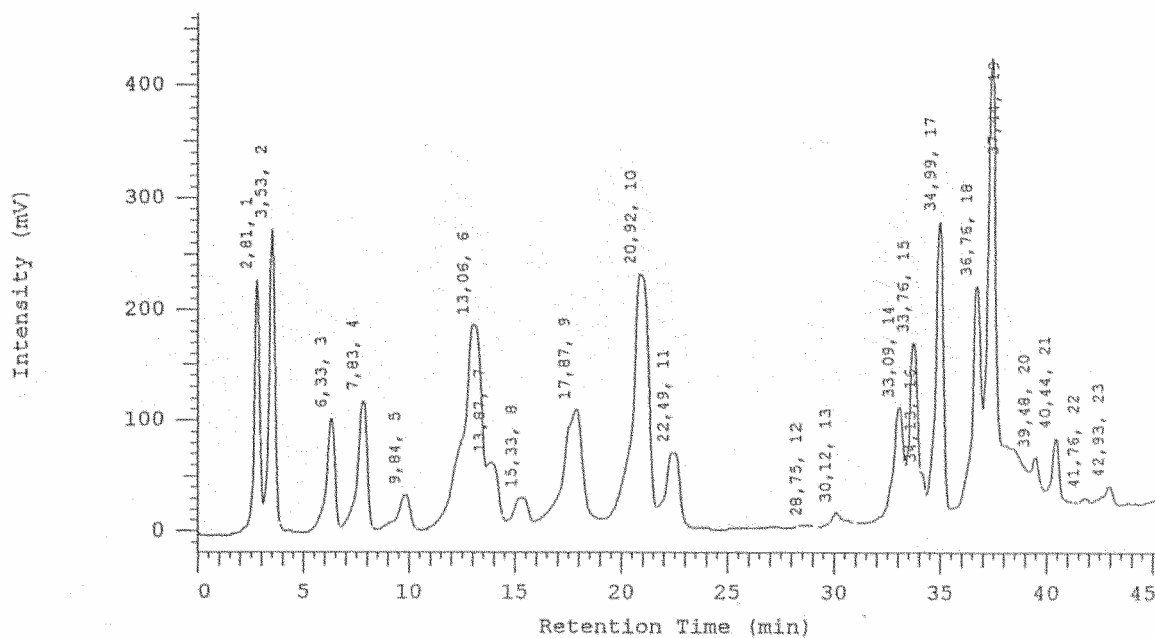
Tablica II

Otrzymany produkt według przykładu IV w odniesieniu do wzorca masy cząsteczkowej z pikiem 116 oraz 66,2 i z uwidocznionym pikiem otrzymanego kolagenu oznaczonym jako A



Tablica III

Rozkład metodą HPLC uzyskanego produktu. Zawarto analizę aminokwasów produktu, to znaczy kolagenu i towarzyszących polipeptydów i wolnych aminokwasów



Stężenia aminokwasów w kolagenie po tygodniowym przechowywaniu w temperaturze 4°C. Aminokwasy w $\mu\text{mol/l}$.

1. Asp 19,78
2. Glu 38,17
3. Asn 25,20
4. Ser 8,61
5. His 18,55
6. Gln 124,78 zawyżone
7. -----
8. -----
9. Arg 38,75
10. Ala 108,26
11. Tyr 28,56
12. -----
13. -----
14. Met 40,07
15. Val 28,48
16. -----
17. Phe 58,68
18. Ile 33,31
19. Leu 121,05
20. -----
21. Lys 129,45

gdzie poszczególne symbole oznaczają:

- D - wysokość pików
- Gel./Doc - typ urządzenia rejestrującego,
- R_f - częstotliwość wzorcowa,
- Intensity - wielkość różnicy potencjałów,
- Retention time - czas rozdzielania.

Przykład IV

Oczyszczone dokładnie skóry tołpygi w ilości 40 g zadano 6 litrami roztworu kwasu glikolowego w wodzie heksagonalnej o stężeniu 10% wagowych. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze 18°C w czasie 7 dni. Utrzymywano pH roztworu 3,8. Następnie przeprowadzono proces filtracji roztworu w filtrze o sitach z jedwabiu naturalnego. Filtracja trwała 2 godziny. Uzyskano 70% masy kolagenu zawartego teoretycznie w skórze, jako produkt na sicie.

Przykład V

W procesie opisanym w przykładzie V zastosowano 10% roztwór mieszaniny kwasu glikolowego z kwasem mlekowym w stosunku 1:1. Po przeprowadzeniu operacji wskazanych w przykładzie I uzyskano 80% masy kolagenu zawartego teoretycznie w skórze, jako produkt na sicie. Czas ekstrakcji wyniósł 3 tygodnie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kolagenu, ze skór ryb słodkowodnych i/lub słonowodnych, polegający na tym, że skóry ryb oddziela się od tusz, oczyszcza się mechanicznie z nadmiaru tłuszczu oraz poddaje się dezynfekcji, a następnie, zalewa się skóry roztworem wodnym kwasu w stężeniu od 0,05% do 10% wagowych i po czasie reakcji prowadzi się proces filtracji zawiesiny na sitach z jedwabiu, **znamienny tym**, że do zalania skór stosuje się roztwór kwasu glikolowego lub mieszaniny kwasu glikolowego z kwasem mlekowym w wodzie heksagonalnej w stężeniu od 0,4% wagowych do 10% wagowych, przy czym ekstrakcję prowadzi się przez czas co najmniej 12 godzin w temperaturze od 2°C do 20°C.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że proces ekstrakcji kolagenu prowadzi się w roztworze o pH od 1,8 do 3,8.

3. Sposób według zastrz. 1, albo 2, **znamienny tym**, że proces ekstrakcji kolagenu prowadzi się w roztworze o pH 2,2.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się roztwór wodny kwasu lub mieszaniny kwasów o stężeniu 2%.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako surowca stosuje się skóry ryb zawierających pigment.

