



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl.³: C 07 G
A 61 K

7/00
7/48

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

635 109

⑳① Gesuchsnummer: 14460/77

⑳② Anmeldungsdatum: 25.11.1977

⑳③ Priorität(en): 11.02.1977 DE 2705670

⑳④ Patent erteilt: 15.03.1983

⑳⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.03.1983

⑳⑦ Inhaber:
Carl Freudenberg, Weinheim/Bergstrasse (DE)
Röhm GmbH, Darmstadt (DE)

⑳⑦ Erfinder:
Dr. Dipl.-Chem. Klaus Bräumer,
Weinheim/Bergstrasse (DE)
Dipl.-Chem. Zdenek Eckmayer, Heidelberg (DE)
Dr. Dipl.-Chem. Alexander Berg,
Hirschberg/Bergstrasse (DE)
Dr.-Chem. Rolf Monsheimer,
Darmstadt-Eberstadt (DE)
Dipl.-Chem. Ernst Pfeiderer,
Darmstadt-Arheilgen (DE)

⑳⑦ Vertreter:
Hepatex-Ryffel AG, Zürich

⑤④ **Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen Elastin-Hydrolysaten.**

⑤⑦ Elastin enthaltende Rohstoffe, z.B. Hautabfälle oder Sehnen, werden zunächst bei erhöhter Temperatur in Gegenwart von Säure aufgeschlossen. Dann erfolgt eine Befreiung von Verunreinigungen und Zerkleinerung. Anschliessend wird das Material in Gegenwart von Harnstoff und Alkalien enzymatisch durch alkalische Proteinasen hydrolysiert. Nach beendeter Hydrolyse werden die Enzymreste thermisch inaktiviert und das Material gereinigt und durch Sprühtrocknen pulverisiert.

Das Verfahren gestattet die Herstellung eines als kosmetischer Wirkstoff geeigneten Elastinhydrolysates aus bisher nicht verwertbaren Rohstoffen.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen Elastinhydrolysaten aus Elastin enthaltenden Rohstoffen, dadurch gekennzeichnet, dass die Rohstoffe zunächst bei erhöhter Temperatur oberhalb 80°C und bei pH-Werten unterhalb von 4 einer Säurebehandlung unterworfen werden, dann zerkleinert und in Gegenwart von Harnstoff und Alkalien bei einem pH-Wert von wenigstens 8,5 durch alkalische Proteinase mit einem Wirkungsoptimum zwischen pH 9 bis 13 in dem für das verwendete Enzym optimalen pH-Bereich hydrolytisch aufgeschlossen werden, wobei nach beendeter Hydrolyse die Enzymreste durch Erwärmen auf eine Temperatur von etwas 90°C inaktiviert werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der enzymatische Abbau bei einer Harnstoffkonzentration zwischen 0,01 und 1,0 mol/Liter durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 bis 2, dadurch gekennzeichnet, dass alkalische Proteinase aus Bazillusstämmen verwendet werden, wie z.B. *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alcalophilus* und/oder Proteinase aus *Streptomyces speciae*, wie z.B. *Streptomyces griseus*.

4. Als kosmetischer Wirkstoff geeignetes Elastinhydrolysat, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Elastinhydrolysat ein mittleres Molekulargewicht von etwa 2000 aufweist.

5. Elastinhydrolysat nach Anspruch 4, hergestellt nach dem Verfahren gemäss Anspruch 3.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen Elastin-Hydrolysaten aus Elastin enthaltenden Rohstoffen. Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf ein als kosmetischer Wirkstoff geeignetes Elastin-Hydrolysat, welches nach dem beanspruchten Verfahren hergestellt ist und Eiweissstoffe mit einem bestimmten mittleren Molekulargewicht enthält.

Elastin ist in Rohstoffen wie beispielsweise Hautabfällen und Sehnen enthalten. Insbesondere die Nackenbänder (Ligamentum nuchae) von Schlachtvieh, wie Rindern oder Schweinen, enthalten hohe Elastin-Anteile. Diese Schlachtabfälle fallen bei der fleischverarbeitenden Industrie und in Schlachthöfen und Metzgereien an und mussten bisher als lästiger, schnellverderblicher Abfall beseitigt werden, nachdem keine Möglichkeit der Aufarbeitung bzw. Verwendung, auch nicht als Tierfutter, bekannt war.

Elastin befindet sich grundsätzlich in Bindegewebssteilen neben Kollagen. Die elastischen Fasern erhielten ihren Namen wegen der Gummielastizität, einer Eigenschaft, die den Kollagenfasern vollständig fehlt. Elastinfasern sind von entscheidender Bedeutung für die Elastizität von Gefässwänden und Sehnen. Der Elastinzustand z.B. der Gefässe ist deshalb mitbestimmend z.B. bei Arteriosklerose, einer der gefährlichsten Gefässkrankheiten. In der Haut spielen Elastinfasern eine grosse Rolle. Sie durchziehen spinnwebartig die Papillar- und den oberen Rand der Retikularschicht und obgleich ihre Menge nur etwa 1/10 der Kollagenfasern beträgt, sind sie für die Elastizität der Haut voll verantwortlich.

Im Gegensatz zu Kollagen sind Elastinfasern sehr widerstandsfähig und konnten bisher nicht abgebaut werden. Bei der Aufarbeitung von Haut und Hautabfällen fielen die Elastinfasern stets als nicht verwertbarer Rückstand an. Die Fasern sind hoch resistent selbst gegen heisse Säuren, Alkalien und sogar gegen Enzyme. Ihre grosse Widerstandsfähigkeit kann zwar zur Isolierung des Elastins von anderen Eiweissstoffen der Bindegewebe dienen, und so wird z.B.

Kollagen durch Überführen in Gelatine und Auswaschen mit heissem Wasser von Elastin getrennt, jedoch ist es gerade diese Widerstandsfähigkeit, welche die praktische Ausnutzung der an sich bekannten ausgezeichneten Eigenschaften von Elastinfasern z.B. in der Hautbehandlung verhindert hat.

Elastinfasern sind genau wie andere z.B. durch Hydrolyse verarbeitbare Hautabfälle Eiweissprodukte, die an sich als brauchbarer kosmetischer Wirkstoff geeignet erscheinen, weil ihre Fähigkeit, die Elastizität von Haut und Gefässen zu steigern ebenfalls an sich bekannt ist. Während jedoch andere Hautproteine, z.B. kollagener Herkunft, durch chemische, alkalische oder saure Hydrolyse, gewonnen werden können, erwiesen sich die Elastine als resistent. Hydrolyseprodukte aus Hautabfällen werden bekanntlich in grossem Umfange in der Haut- und Haarkosmetik eingesetzt. Insbesondere in der Haarkosmetik ist es aber denkbar, dass die Geschmeidigkeit und Festigkeit der Haare durch Elastin gesteigert werden könnten. Vergleichbares gilt für die Hautkosmetik, insbesondere bei der Behandlung von physiologisch älterer Haut, deren Elastizität nachlässt bzw. verlorengegangen ist, durch Kollagenhydrolysate.

Die Wirkung von Kollagenhydrolysaten beruht im wesentlichen darauf, dass die Hydrolysate die Hautfeuchtigkeit erhalten helfen bzw. dafür sorgen, dass trockene Haut auf natürliche Weise wieder mit Feuchtigkeit beladen wird. Viel wichtiger erscheint es aber, dass die Wirkung der Kollagenhydrolysate nicht nur auf die Oberfläche der Haut begrenzt wird. Es ist denkbar, dass bestimmte Molekularfraktionen von Eiweisshydrolysaten die Oberschicht der Haut durchdringen und somit eine Verbesserung des Hautzustandes durch vermehrten Kollagengehalt bewirken.

Der Erfindung liegt nun die Aufgabe zugrunde, ein Aufschlussverfahren für Elastinfasern zu entwickeln, wobei die Herstellung von wasserlöslichen Hydrolysaten angestrebt wird.

Das Verfahren soll auch die Hydrolyse von bisher nicht verwertbaren Rohstoffen, wie z.B. den Nackenbändern und Sehnen von Schlachtvieh, ermöglichen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung liegt darin, ein für die kosmetische Industrie als Wirkstoff besonders geeignetes Hydrolysat aus Elastin zu entwickeln, das im Gegensatz zu den bisher bekannten Hydrolyseprodukten eine verbesserte Durchdringung und ein verbessertes Geschmeidigmachen der Haut gewährleistet.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung von wasserlöslichen Elastinhydrolysaten aus Elastin enthaltenden Rohstoffen ist dadurch gekennzeichnet, dass die Rohstoffe zunächst bei erhöhter Temperatur oberhalb 80°C und bei pH-Werten unterhalb von 4 einer Säurebehandlung unterworfen werden, dann zerkleinert und in Gegenwart von Harnstoff und Alkalien bei einem pH-Wert von wenigstens 8,5 durch alkalische Proteinase mit einem Wirkungsoptimum zwischen pH 9 und 13 in dem für das verwendete Enzym optimalen pH-Bereich hydrolytisch aufgeschlossen werden, wobei nach beendeter Hydrolyse die Enzymreste durch Erwärmen auf eine Temperatur von etwa 90°C inaktiviert werden.

Die enzymatische Reaktion findet vorzugsweise bei einer Harnstoffkonzentration zwischen 0,01 und 1,0 mol/Liter statt. Als alkalische Proteinase kommen solche aus *Bacillus*-stämmen, wie z.B. *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alcalophilus*, und die aus *Streptomyces speciae*, wie z.B. *Streptomyces griseus*, in Betracht.

Das erfindungsgemässe Verfahren kann zu Elastin-Hydrolysaten führen, welche bei Verwendung als kosmetischer Wirkstoff insbesondere die an sich bekannten günstigen Eigenschaften der Kollagenhydrolyste ergänzen. Dies rührt daher, dass die Aminosäure-Zusammensetzung des Pro-

duktes in der Regel genau der Zusammensetzung der elastischen Hautfasern entspricht. Auch die elastintypischen Aminosäuren Desmosin und Iso-Desmosin sind in aller Regel in dem erfindungsgemäss hergestellten Hydrolyseprodukt vorhanden. Das Produkt enthält weiterhin Lipoproteine, Proteoglycane, Glycosaminoglycane und andere in natürlichem Elastin vorhandene Stoffe. Diese Zusammensetzung bewirkt die guten Eigenschaften des Produktes als Nährstoff für die Haut, deren Elastizität durch eine infolge der Hydrolyseprodukte beschleunigte Elastinsynthese noch wesentlich verbessert werden kann.

Durch die Kombination der sauren Behandlung mit der alkalischen Hydrolyse in Gegenwart spezieller Enzyme ist es möglich, niedrige und bei jedem Ansatz reproduzierbare Molekulargewichte der Eiweissfraktionen zu erreichen. Die Hydrolysate sind in der Regel bis zu hohen Konzentrationen wasserlöslich. Hierdurch ist eine besonders gute Einarbeitung in Kosmetikprodukte gewährleistet. Durch geeignete Reaktionsführung bzw. die Auswahl der Enzyme bzw. Enzymmischungen ist es möglich, die Molekulargewichte jeweils dem Verwendungszweck entsprechend einzustellen. Als kosmetischer Wirkstoff wurde hierbei ein besonders geeignetes Elastinhydrolysat gefunden, welches nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellt ist und ein mittleres Molekulargewicht von etwa 2000 aufweist. Dieses Hydrolysat ist in ganz besonderem Masse als Wirkstoff für Hautpflegemittel geeignet.

Der technische Aufwand des erfindungsgemässen Verfahrens ist gering. So kann eine Zerkleinerung des Ausgangsmaterials in üblicher Weise mit Hilfe einer fleischwolfartigen Vorrichtung erfolgen, wobei das Material gleichzeitig homogenisiert werden kann. In dieser Weise homogenisierte Hautabfälle und aus Schlachtabfällen, z.B. von Rindern oder Schweinen, gewonnene Nackenbänder (Ligamentum nuchae) werden, vorzugsweise nach mechanischer Reinigung und Zerkleinerung, zunächst bei erhöhter Temperatur oberhalb 80°C mit Säuren behandelt. Hierzu eignen sich anorganische Säuren, wie Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure. In diesem Falle sollte der pH-Wert vorzugsweise unter 2 liegen. Es ist jedoch ebenfalls möglich, das Material mit organischen Säuren, wie z.B. Essigsäure oder Ameisensäure, zu behandeln, wobei der pH-Wert unter 4 liegen muss. Die Temperatur liegt oberhalb 80°C, zweckmässig im Bereich zwischen 80 und 100°C. Eine bevorzugte Ausführung liegt darin, das angesäuerte Material mehrere Stunden zu kochen, wobei im allgemeinen die Behandlungsdauer 3 Stunden nicht unterschreiten sollte. In den Hautabfällen bzw. Sehnen oder Nackenbändern vorhandenes begleitendes Kollagen wird hierbei in Gelatine überführt, welche durch Auswaschen beseitigt werden kann. Verunreinigungen und Nebenprodukte können durch Schichtenfiltration entfernt werden.

Nach der Säurebehandlung ist das Material für den enzymatischen Abbau zugänglich. Fleisch- und Fettreste werden gegebenenfalls entfernt und das zerkleinerte, säurevorbehandelte Material in dem Hydrolysemedium suspendiert. Hierzu ist die Zugabe von genügend Wasser und soviel Alkalien, z.B. KOH, NaOH, Ca(OH)₂ oder dergleichen, erforderlich, dass der pH-Wert wenigstens etwa 8,5 beträgt. Zweckmässiger sind pH-Werte über 9,5. Das Hydrolysemedium enthält zuzüglich Harnstoff, zweckmässig in einer Konzentration von 0,01 bis 1,0 mol/Liter. Der eigentliche Abbau wird vorzugsweise bei erhöhten Temperaturen zwischen etwa 30 und 70°C durchgeführt, zweckmässig zwischen etwa 40 und 65°C. Optimale Ergebnisse erhält man bei Temperaturen über 55°C.

Für den enzymatischen Abbau werden alkalische Proteinase aus *Bacillus*-stämmen bevorzugt, insbesondere Proteinase aus *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*

alcalophilus, *Bacillus subtilis* oder *Bacillus mesentericus*. Gut geeignet sind auch *Streptomyces speciae*, wie z.B. *Streptomyces griseus*.

Im sauren Bereich spaltende Enzyme, sowie tierische und pflanzliche Proteinase sind für das erfindungsgemässe Verfahren nicht so geeignet, weil sie selbst im alkalischen Bereich zu langsam aufspalten.

Bei der Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens können an sich bekannte Zusätze für enzymatische Reaktionen, wie z.B. Aktivatoren, Stabilisatoren oder dergleichen, verwendet werden. Die proteolytische Wirksamkeit von Enzymen kann nach der Anson-Hämoglobin-Methode (M.L. Anson: «Journal of General Physiology, 22, 79 [1939]» bzw. nach der Löhnlein-Volhard-Methode («Die Löhnlein-Volhard'sche Methode zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität: «Gerbereichemisches Taschenbuch», Dresden Leipzig, 1955) als «LVE» (Löhnlein-Volhard-Einheit) bestimmt werden. Unter der LVE-Einheit ist diejenige Enzymmenge zu verstehen, welche unter den spezifischen Bedingungen der Methode 1,725 mg Casein verdaut.

Die Art des Enzyms, die Konzentration, die Einwirkzeit und Temperatur beeinflussen den Abbau des Produktes. Es ist deshalb in vielen Fällen erforderlich, durch geeignete Vorversuche unter Zugrundelegung der erfindungsgemässen Lehre die optimalen Verfahrensbedingungen zu ermitteln. Bei der Durchführung des Verfahrens ist die saure Vorbehandlung sehr wesentlich, denn der enzymatische Abbau in alkalischem Milieu ist ohne diese saure Behandlung nicht möglich.

Nach beendetem Aufschluss wird die Hydrolysatlösung durch kurzfristiges Erwärmen auf Temperaturen von etwa 90°C behandelt, wobei die noch wirksamen Enzyme inaktiviert werden. Die Mischung kann dann durch Filtration gereinigt und auf die gewünschte Konzentration eingeeengt oder aber zu einem Pulver getrocknet werden. Das Hydrolysat findet Anwendung nicht nur in der Kosmetik, sondern auch auf weiteren an sich bekannten Einsatzgebieten für Eiweissstoffe.

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung des erfindungsgemässen Verfahrens, ohne dass die Erfindung auf diese Beispiele beschränkt sein soll.

Beispiel 1

100 kg gefrorene Rindernackenbänder werden zusammen mit 200 kg Brunnenwasser in einen beheizbaren Behälter gefüllt. Der pH-Wert der Mischung wird durch verdünnte Schwefelsäure auf 1,8 eingestellt und die Mischung eine Stunde gekocht. Nach dem Kochen wird die Flüssigkeit abgossen, 200 Liter Brunnenwasser zugegeben und der pH-Wert mit Schwefelsäure wieder auf 1,8 eingestellt. Nach einer weiteren Stunde Kochen wird die Flüssigkeit abgossen und der Kochvorgang nochmals mit angesäuertem Wasser in genau der gleichen Weise durchgeführt. Der Kochvorgang ist somit insgesamt dreimal wiederholt worden. Das Material wird nun mehrmals mit destilliertem Wasser ausgewaschen, von Fett- und Fleischresten gereinigt und fein gemahlen. Das Trockengewicht des Materials beträgt etwa 30%.

Zu dem nun folgenden enzymatischen Abbau werden 100 kg der vorstehend beschriebenen Mischung zusammen mit 200 kg destilliertem Wasser in einen Heizkessel gefüllt. Der pH-Wert wird mit Natronlauge auf 10,1 eingestellt. Die Mischung wird bei 55°C mit 30 g alkalischer Bakterienproteinase aus *Bacillus alcalophilus* mit 9000 LVE, 100 g Harnstoff und 125 g (NH₄)₂ SO₄ versetzt. Der Abbau erfolgt bei 55°C innerhalb von sechs Stunden, wobei die Mischung stark gerührt wird. Während dieser Zeit löst sich das Elastin vollständig auf. Nach dem Abbau wird das Material auf 95°C

erhitzt um restliche Enzyme zu zerstören und anschliessend abgekühlt.

Das Hydrolysat wird nun durch Schichtenfiltration gereinigt. Die Ausbeute nach dem Filtrieren besteht in 270 kg einer schwach trüben, opalisierenden Flüssigkeit mit einem Trockengewicht von 10,8% und einem pH-Wert von 8,2.

Der pH-Wert der Flüssigkeit wird auf 7,0 eingestellt und die Flüssigkeit auf 30% eingeeengt. Sie ist für kosmetische Zwecke in diesem Zustand geeignet und wird gegebenenfalls mit p-Hydroxybenzoesäureester konserviert.

Beispiel 2

60 kg Schweinenackebänder mit einem Trockengewicht von etwa 40% werden in einem Kochbehälter mit 120 kg destilliertem Wasser versetzt. Die Mischung wird mit konzentrierter Essigsäure auf 3,4 angesäuert. Anschliessend folgt eine Bearbeitung des Materials wie im vorstehenden Beispiel beschrieben. Die Mischung wird insgesamt fünf Stunden gekocht, wobei nach jeder Stunde die Flüssigkeit ausgetauscht wird.

Nach dem Kochen erfolgt die mechanische Reinigung wie im vorstehenden Beispiel beschrieben. Für den enzymatischen Abbau wird das Material zusammen mit 180 kg destilliertem Wasser in einem Heizkessel behandelt und mit 5 Ammoniak auf einen pH-Wert von 9,4 eingestellt. Die Mischung wird auf 55°C erwärmt und mit 240 g alkalischer Bakterienproteinase aus *Bacillus firmus* mit 9000 LVE, 1200 g Ammoniumsulfat und 960 g Harnstoff versetzt. Zum enzymatischen Abbau wird acht Stunden auf 55°C erwärmt und stark gerührt. Das Elastin ist jetzt vollständig gelöst und die restlichen Enzyme werden durch Erhitzen der Mischung auf 95°C inaktiviert. Anschliessend wird auf etwa 60°C abgekühlt.

Die Reinigung erfolgt wie in Beispiel 1 angegeben durch Schichtenfiltration. Man erhält 220 kg schwach gelbliche trübe opalisierende Flüssigkeit mit einem Trockengewicht von 9,8% und einem pH-Wert von 7,9. Der pH-Wert wird nun auf 7,0 eingestellt und die Flüssigkeit durch Sprühtrocknen pulverisiert.