PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

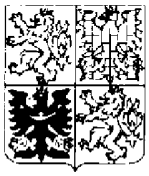
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2112-98

(19)

ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02. 07. 98**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **04.07.97**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **97/9714102**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13. 01. 99**
(Věstník č. 1/99)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6]:
A 61 K 7/075
A 61 K 7/16
A 61 K 7/48
A 61 K 31/715

(71) Přihlašovatel:
CIBA SPECIALTY CHEMICALS HOLDING INC., Basel, CH;

(72) Původce:
Maier Thomas dr., Schliengen, DE;
Huber Klaus dr., Bad Lippspringe, DE;
Rau Udo prof. dr., Dettum, DE;
Schilling Bernhard dr., Waltham, MA, US;

(74) Zástupce:
Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Nové skleroglukany a kosmetické přípravky obsahující tyto nové sloučeniny

(57) Anotace:
Kosmetický přípravek obsahuje A/ kosmeticky přijatelný nosič a B/ 0,05 až 3,0 % hmotn. vztaženo na hmotnost celého přípravku, beta-1,3-skleroglutanu, který má trojrozměrnou, příčně vyzanou strukturu tripletového helixu a průměrnou molekulovou hmotnost od 1.10^6 do 12.10^6.

CZ 2112-98 A3

Nové skleroglukany a kosmetické přípravky obsahující tyto nové sloučeniny

Oblast techniky

Tento vynález se týká nových sloučenin, způsobu výroby těchto nových sloučenin a kosmetických přípravků obsahujících tyto nové sloučeniny jako účinnou složku.

Dosavadní stav techniky

Ve spise GB-A-2 050 825 je popsán kosmetický přípravek typu olej ve vodě, který obsahuje emulgační činidlo, olej a vodu, přičemž emulgační činidlo sestává a/ nejméně z jedné specifikované sloučeniny glycyrrhizinové kyseliny a b/ nejméně z jednoho ve vodě rozpustného polysacharidu, vybraného ze souboru obsahujícího pektin, karajovou gumu, gumu ze svatojánského chleba a xantanovou gumu.

Polysacharidy používané ve spise GB-A-2 050 825 mají některé nevýhody, zejména tu, že obsahují kyselé skupiny, které je činí náchylnými ke tvorbě solí a/nebo ke změnám pH a též mají nedostatečnou stabilitu v přiměřeném rozmezí teplot.

Ve spise JP 030 167 109 je popsán kosmetický materiál, který obsahuje beta-1,3-glukan s průměrnou molekulovou hmotností vyšší než 10.10^6. beta-1,3-glukany s průměrnou molekulovou hmotností vyšší než 10.10^6 mají špatné vyhlídky a také jejich molekulová hmotnost nemůže být stanovena s použitím obvyklé metody rozptylu světla.

Nyní bylo nalezeno, že některé nové skleroglukany jsou použitelné jako účinné složky a excipienty v kosmetických přípravcích, bez nevýhod, které provázejí polysacharidy používané ve spise GB-A-2 050 825 nebo beta-1,3-glukany ze spisu JP 030 167 108. Navíc tvoří nové skleroglukany, používané ve výše zmíněných kosmetických přípravcích ohebné filmy, které, ačkoliv jsou ve vodě

po vysušení nerozpustné, snadno v ní bobtnají. Tato schopnost tvořit filmy představuje další výhodu pro použití těchto skleroglukanů v kosmetických přípravcích. Dále bylo nalezeno, že nové skleroglukany vykazují cenné protizánětlivé vlastnosti, takže jsou například výhodnými účinnými složkami v opalovacích přípravcích při ošetřování spálenin po slunění.

Podstata vynálezu

Tento vynález se tedy týká především kosmetického přípravku, který obsahuje

A/ kosmeticky přijatelný nosič a

B/ 0,05 až 3,0, s výhodou 0,2 až 1,0 % hmot., vztaženo na hmotnost celého přípravku, beta-1,3-skleroglukanu, který má trojrozměrnou příčně vázanou strukturu tripletového helixu a průměrnou molekulovou hmotnost od 1.10^6 do 12.10^6, s výhodou od 2.10^6 do 10.10^6.

Kosmetický přípravek může například tvořit šampon a/nebo vlasový kondicionér, ve kterém skleroglukanová složka B/ má jednu nebo více z těchto funkcí:

i/ vliv na rozčesávání vlasů ošetřených šamponem a/nebo kondicionérem;

ii/ vliv na zlepšení disperze dalších složek v šamponu a/nebo kondicionéru;

iii/ působí jako činidlo upravující hladkost vlasů ošetřených šamponem a/nebo kondicionérem a

iv/ vliv na zlepšení úrovně fixace takových přísad, jako jsou barviva nebo UV-filtry v šamponu a/nebo kondicionéru.

Kosmetický přípravek podle tohoto vynálezu může také tvořit přípravek pro péči o pokožku, například emulzi nebo krém, ve kterém skleroglukan může mít jednu nebo více z těchto funkcí:

i/ vliv na funkci lubrikace a tím na usnadnění roztírání přípravku na pokožce;

ii/ působí jako filmotvorné činidlo a tím vytváří ochranný film na pokožce, který, ačkoliv je při dotyku téměř nezjistitelný, do-

dává pokožce hedvábný omak;
iii/ působí jako činidlo upravující hladkost pokožky snižováním odlupování vnější vrstvy stratum corneum;
iv/ vliv na protizánětlivý účinek na pokožku;
v/ vliv na zlepšení disperze dalších složek v přípravku pro péči o pokožku a
vi/ působí jako emulgátor nebo jako pomocný emulgátor v přípravku pro péči o pokožku.

Přípravek pro péči o pokožku může být vytvořen jako vodný lotion, jako emulze vody v oleji nebo oleje ve vodě, jako lotion olejový nebo alkoholicko-olejový, jako vezikulární disperze aniontových nebo neiontových amfifilních lipidů, jako vodný, vodně-alkoholický, alkoholický nebo alkoholicko-olejový gel, pevná tyčinka nebo aerosol.

Je-li přípravek upraven jako emulze vody v oleji nebo oleje ve vodě, pak kosmeticky přijatelný nosič A/ obsahuje s výhodou 5 až 50 % hmot. olejové fáze a 47 až 94,95 % hmot. vody, oboje vztaženo na celkovou hmotnost přípravku.

Olejová fáze může obsahovat jeden olej nebo směs olejů, o nichž je známo, že jsou vhodné k použití v kosmetických přípravcích.

Příklady takových olejů zahrnují alifatické uhlovodíky, jako je parafinový olej, skvalen, vazelina a ceresin; rostlinné oleje, jako je olivový olej, mandlový olej, sezamový olej, avokádový olej, ricinový olej, kakaové máslo a palmový olej; živočišné oleje, jako je olej ze žraločích jater, olej z tresčích jater, hovězí lůj a máslo; vosky, jako je včelí vosk, karnaubský vosk, spermacet a lanolin; mastné kyseliny, jako je laurová kyselina, myristová kyselina, palmitová kyselina, stearová kyselina, olejová kyselina a behenová kyselina; alifatické alkoholy, jako je laurylalkohol, stearylalkohol, cetylalkohol a oleylalkohol; a alifatické estery, jako je isopropyl-, isocetyl- nebo oktadecylmyristát, butylstearát, hexyllaurát, diisopropyladipát nebo diisopropylsebakát.

Výhodné mono- nebo polyoly, které jsou použitelné v alkoholicko-olejovém lotionu nebo v alkoholicko-olejovém nebo v alkoholickém gelu, zahrnují ethanol, isopropylalkohol, propylenglykol, hexylenglykol, glycerol a sorbitol.

Když se beta-1,3-skleroglukan používá jako pomocný emulgátor, mohou být další emulgátory jakékoliv emulgátory, které jsou obvyklé v kosmetických přípravcích, například jeden nebo více ethoxylovaných esterů derivátů přírodních olejů, jako je polyethoxylovaný ester hydrogenovaného ricinového oleje, emulgátor na bázi silikonového oleje, jako je silikonový polyol, popřípadě mýdlo ethoxylované mastné kyseliny, ethoxylovaný mastný alkohol, popřípadě ethoxylovaný ester sorbitolu, ethoxylovaná mastná kyselina nebo ethoxylovaný glycerid.

Kosmetický přípravek podle tohoto vynálezu může představovat prostředek pro ošetřování zánětu pokožky, zejména po slunění.

Kosmetický přípravek podle tohoto vynálezu může rovněž tvořit prostředek pro péči o ústní dutinu, například zubní gel, pomocný prostředek pro fixaci zubů nebo zubní pastu; směs pro lubrikaci sliznic, jako je vaginální krém nebo gel, nebo oftalmologický prostředek, jako jsou oční kapky, kde glukanová komponenta B/ může mít jednu nebo více z těchto funkcí:

i/ vliv na lubrikaci suchých sliznic;

ii/ vliv na zahušťování tekutých přípravků;

iii/ vliv na udržení účinných složek tvorbou filmů na povrchu sliznic a

iv/ vliv na zlepšení disperze dalších komponent v přípravku.

Když se beta-1,3-skleroglukan používá v oftalmologických přípravcích, může se používat s dalšími komponentami, jako jsou:

a/ oftalmologicky účinné složky, například síran gentamycinu, hydrochlorid lomefloxacinu, chloramfenikol, sodná sůl diklofenaku, draselná sůl diklofenaku, natriumfosfát dexametazonu, dusičnan nafazolinu, hydrochlorid tetryzolinu, hydrochlorid antazolinu, síran antazolinu, pilokarpinchlorid, palmitan vitaminu A a síran

zinečnatý;

b/ oftalmologické pufry, jako je boritá kyselina, borax, octová kyselina, octan sodný, fosforečná kyselina, dihydrogenfosforečnan sodný, hydrogenfosforečnan sodný, trometamol, citronová kyselina a citronan sodný;

c/ oftalmologické konzervační látky, jako je benzylalkylamoniumchlorid, benzoxoniumchlorid, diglukonan chlorhexidinu, chlorbutanol, fenylethylalkohol a thiomersal;

d/ rozpouštědla, jako je ethanol, glycerol, polyethylenglykol, voda nebo jejich směsi;

e/ zprostředkovadla rozpouštění, jako je Cremophor EL, Cremophor RH, Tween 20 a Tween 80;

f/ izotonizační činidla, jako je chlorid sodný, mannitol a sorbitol;

g/ chelátotvorné látky, jako je dvojsodná sůl EDTA;

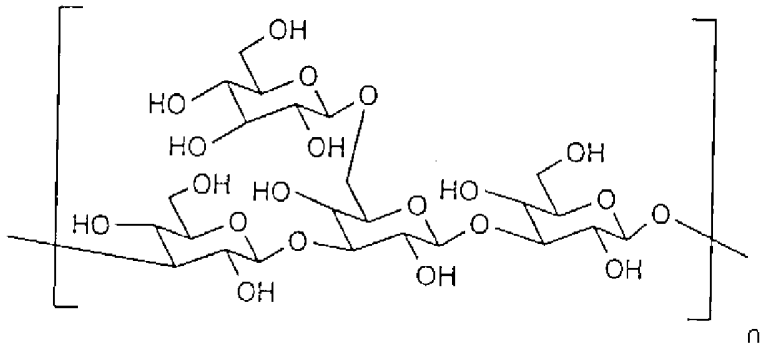
h/ antioxidační látky, jako je alfa-tokoferolacetát, askorbová kyselina, N-acetylcystin, hydrogensiřičitan sodný, thiosíran sodný a propylgallát; a

i/ sloučeniny zvyšující viskozitu, jako je methylhydroxypropylcelulóza, sacharóza, Carbopol 940, Carbopol 980 a Polaxomer F127.

Kosmetický přípravek podle tohoto vynálezu se může též používat jako lubrikans.

Kosmetický přípravek podle tohoto vynálezu může rovněž obsahovat další složky, o kterých je známo, že mohou mít v kosmetickém přípravku užitečnou funkci. Příklady takových dalších složek zahrnují například změkčovadla, zvlhčovadla pokožky, UV-filtry, jako je oxanilid, triazin nebo triazol, navíc zahušťovadla, jako je xantan, činidla zadržující vlhkost, jako je glycerol, filmotvorné látky, konzervační látky, parfémy a barviva.

beta-1,3-skleroglukanová složka kosmetického přípravku podle tohoto vynálezu má trojrozměrnou příčně vázanou strukturu tripletového helixu a ve své struktuře má beta-1,3-vázanou glukopyranózu jako hlavní řetězec a beta-1,6-vázanou glukopyranózu jako postranní řetězec a má tento strukturní vzorec:



kde n značí číslo, které poskytuje beta-1,3-skleroglukanové komponentě průměrnou molekulární hmotnost /MW/ od 1.10^6 do 12.10^6, s výhodou od 2.10^6 do 10.10^6, stanovenou ze snadno změřitelného Staudingerova indexu η s použitím této Mark-Houwinkovy rovnice:

$$MW = [\eta/4.45.10^{-7}]^{1/1.49} .$$

S výhodou má vodný roztok 0,3 g/litr beta-1,3-skleroglukanu obsah glukózy nižší než 0,1 g/litr a viskozitu od 50 do 190 mPa.s, měřeno při rychlosti smyku $0,3^{-1}$ při teplotě 20 °C.

beta-1,3-skleroglukan, který má průměrnou molekulovou hmotnost od 1.10^6 do 12.10^6 a trojrozměrnou příčně vázanou strukturu tripletového helixu, je nová sloučenina a jako taková představuje druhý znak tohoto vynálezu.

Molekulární charakterizace beta-1,3-skleroglukanu se obvykle může provádět s pomocí techniky rozptylu světla s použitím různých koncentrací polymeru ve vhodných rozpouštědlech, jako je 0,01 N vodný roztok hydroxidu sodného. Zásobní roztok se může například připravit ze vzorku lyofilizovaného práškového beta-1,3-skleroglukanu a tento roztok se potom míchá po dobu 1 až 2 dnů při teplotě 25 °C. Pak se stanoví statické a dynamické parametry rozptylu světla. Z těchto hodnot se odvodí poměr $/R_g/R_h/$ poloměru otáčení $/R_g/$ k hydrodynamickému poloměru $/R_h/$. Tento poměr $/R_g/R_h/$

slouží jako indikátor tvaru zkoušeného vzorku.

Měření viskozity se potom mohou provádět při teplotě 25 °C s různě zředěnými vzorky základního roztoku s použitím vodného roztoku hydroxidu sodného nebo dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla. Vhodným zařízením pro měření viskozity je Ubbelohde-Capillary I /kapilární konstanta K = 0,009693/, s aplikací Hagenbachovy korekce.

Tyto techniky molekulární charakterizace ukazují, že nový beta-1,3-skleroglukan se při teplotě 25 °C vyskytuje jako fyzikálně spojené tripletové helixy.

beta-1,3-skleroglukan se vyrábí s použitím Fungi imperfecti Sclerotium rolfsii ATCC 15205, které je patogenní k rostlinám. Tento způsob tvoří třetí znak tohoto vynálezu.

Způsob podle vynálezu se vyznačuje tím, že se mikroorganismy v podobě Fungi imperfecti Sclerotium rolfsii ATCC 15205, patogenní k rostlinám, kultivují v kultivačním mediu za mikroaerobních podmínek.

Používané základní kultivační medium je medium, které je popsáno v patentovém spise US 3,301.848; obsahuje zdroj uhlíku, zdroj dusíku, například amonnou sůl nebo s výhodou dusičnan sodný, zdroj fosforečnanu, například trihydrát dihydrogenfosforečnanu draselného, chlorid draselný, heptahydrát síranu hořečnatého, heptahydrát síranu železnatého a extrakt z kvasnic. Použití trihydrátu dihydrogenfosforečnanu draselného jako zdroje fosforu je výhodné tím, že okyseluje medium a tak obchází potřebu jiné kyseliny k nastavení hodnoty pH media okolo 2.

Při výhodném provedení se používá jako zdroj uhlíku glukóza. Ta se přeměňuje v beta-1,3-skleroglukan, biomasu, oxid uhličitý a šťavelovou kyselinu, což je jediný prokazatelný vedlejší produkt. K uvedenému základnímu mediu se s výhodou přidává hydrát citronové kyseliny, účelně v množství v rozmezí od 0,2 do 1,5 g/litr,

thiamin nebo jeho sůl s minerální kyselinou, účelně v množství od 0,3 do 30 mg/litr a zinečnatá sůl, například síran zinečnatý, účelně v množství od 0,3 do 30 mg/litr. I když extrakt z kvasnic je sám o sobě zdrojem nejen thiaminu, nýbrž i zinku, nemůže dodávat tyto složky v dostatečném množství, které by zaručilo optimální výtěžky beta-1,3-skleroglukanu jako žádaného produktu.

Bylo zjištěno, že snížením použitého množství kyslíku se snižuje množství oxidu uhličitého a vznikající biomasy, s následujícím zvýšením tvorby žádaného beta-1,3-skleroglukanu. V souvislosti s tím je preferováno vedení způsobu podle tohoto vynálezu s použitím specifické rychlosti spotřeby kyslíku /rychlost spotřeby kyslíku vztažena na biomasu/ v rozmezí od 0,01 do 0,08 h^{-1}.

Je překvapující, že výtěžky beta-1,3-skleroglukanu jako žádaného produktu se zvyšují, když se rychlost spotřeby kyslíku v průběhu kultivačního procesu kontinuálně snižuje, takže dodávka kyslíku buňkám se kontinuálně omezuje. Vysvětlení může být takové, že organismus preferuje mikroaerobní prostředí, obklopuje se, dokonce ´´in vivo´´, slizovitým povlakem, který značně brání přenosu kyslíku. Následkem toho je aktuální potřeba kyslíku mnohem nižší než mikroaerobní dodávka kyslíku do reaktoru. To souhlasí s pozorovaným výsledkem, že při zvyšování dodávky kyslíku do reaktoru slouží kyslík k nadměrné spotřebě glukózy respirací, jejímž důsledkem je snižující se koeficient výtěžku /g biomasy na g skleroglukanu/.

S výhodou se používá inokulum kultivované s omezením dodávky dusíku. S překvapením bylo zjištěno, že použití takového inokula jako inokula při kultivaci vede ke zlepšení poměru produktu k biomase.

Omezením zdroje dusíku v kultivačním mediu je poměr beta-1,3-skleroglukanu jako žádaného produktu k biomase signifikantně vyšší, než když se kultivace vede s použitím standardního inokula. Je známo, že vysoký poměr C/N má příznivý vliv na koncen-

traci produktu v průběhu tvorby mikrobiálních polysacharidů. O tomto pozorování příznivého vlivu ''reverzního omezení zdroje dusíku'' /reverzní proto, poněvadž kultura inokula s omezeným zdrojem dusíku, která je dodávána mediu, nemá později omezený zdroj dusíku, jelikož medium pak obsahuje dostatečný zdroj dusíku/ nebylo dosud referováno. Možné vysvětlení příznivého vlivu ''reverzního omezení zdroje dusíku'' může spočívat v tom, že organismus, když má omezený zdroj dusíku, nemůže fixovat polysacharidy buněčné stěny uvnitř stěny pro nedostatek chitinu, který obsahuje dusík jako N-acetylglukosaminové jednotky. Následkem toho je polysacharid buněčné stěny uvolňován do media ve větší míře.

V souhlase s tím je výhodné, když se způsob podle tohoto vynálezu vede s použitím zdrojů dusíku v kultivačním medium v množství v rozmezí od 0,2 do 0,8 g N/litr.

Jak již bylo uvedeno, je šťavelová kyselina jediný prokazatelný vedlejší produkt způsobu podle tohoto vynálezu. Pokles hodnoty pH v průběhu kultivačního procesu podle vynálezu je úměrný množství vzniklé šťavelové kyseliny. Beta-1,3-sklerogukanový produkt a koncentrace biomasy nejsou ovlivněny počáteční hodnotou pH, použitou při způsobu podle tohoto vynálezu. Toto pozorování svědčí proti předcházejícím nálezům, kde byla zmiňována tvorba horšího produktu a biomasy při hodnotách pH nižších než 3. Poněvadž omezení pH se netýká Sclerotium rolfsii, může být kultivační proces podle tohoto vynálezu veden za zcela nesterilních podmínek při pH 2, nehledě na oddělenou sterilizaci extraktu z kvasnic.

S výhodou se kultivační proces podle tohoto vynálezu realizuje za míchání, při teplotě 15 až 40 °C. Potom se kultivační roztok oddělí od biomasy a vzniklý beta-1,3-skleroglukanový produkt se izoluje obvyklým způsobem.

Mikrobiální produkce beta-1,3-skleroglukanu s použitím Fungi imperfecti Sclerotium rolfsii ATCC 15205 je v průběhu kultivace

spojena se značným zvýšením viskozity media v reaktoru. Navíc projevuje suspenze kultury chování pseudoplastického toku. Jak organismus tak i beta-1,3-skleroglukanový produkt jsou citlivé na smyk.

Při zvětšování velikosti reaktoru se zvyšuje důležitost přiměřeného míchání značně viskózního média. Při pomalejším míchání se rovněž snižuje rychlost růstu a tvorby polysacharidu v průběhu kultivace. Aby se dosáhlo přiměřeného míchání ve velkých reaktorech, pracuje se při obvyklé praxi s vysokými rychlostmi míchadla. Při výrobě skleroglukanu však vysoké průměrné rychlosti ve smyku a maximální rychlosti v reaktoru polysacharid degradují. Nyní bylo zjištěno, že stejně dobrého míchání lze dosáhnout ve srovnatelné době s použitím velmi vysoké rychlosti vzdušnění. Tak se vzdušnění týká hlavně úkolu, jak uskutečnit axiální míchání media. Vysoké rychlosti vzdušnění zajišťují rotaci značně viskózního obsahu reaktoru až do ukončení kultivace. Méně prudké míchání umožňuje tvorbu výšemolekulárního produktu. Míchací zařízení způsobuje potřebné stírání polysacharidu z povrchu buněk. Průměrné rychlosti ve smyku v reaktoru jsou s výhodou v rozmezí od 18 do 25 s^{-1} a nejvyšší rychlost míchadla je s výhodou v rozmezí od 0,7 do 1,0 m/s. Navíc vysoký obsah plynu v kapalině snižuje hustotu celého systému a zároveň i viskozitu.

Následující příklady provedení tento vynález blíže ilustrují.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Kultivace se provádí s použitím vláknitě rostoucí houby Sclerotium rolfsii ATCC 15205, která je patogenní pro rostliny, získané od ATCC, Rockville, MD, USA.

Připraví se toto standardní kultivační medium:

monohydrát glukózy	38,5	g/litr
dusičnan sodný	3,0	g/litr
dihydrogenfosforečnan draselný	1,3	g/litr
monohydrát citronové kyseliny	0,7	g/litr
chlorid draselný	0,5	g/litr
heptahydrát síranu hořečnatého	0,5	g/litr
heptahydrát síranu železnatého	0,05	g/litr
hydrochlorid thiaminu	3,3	mg/litr
heptahydrát síranu zinečnatého	3,3	mg/litr
extrakt z kvasnic	1,0	g/litr
počáteční pH	2,0.	

Hodnota pH media se nastaví 85% fosforečnou kyselinou před autoklávováním standardního media. Živná media se sterilizují po dobu 20 min při teplotě 121 °C a přetlaku 10 MPa. Roztoky thiaminu a síranu zinečnatého se přidají ke kultuře ve formě sterilního filtrátu. Navíc se do kultivačního reaktoru přidá 1 g/litr protipěnidla.

Pro první kulturu se umístí 100 ml uvedeného standardního kultivačního media do 500 ml Erlenmayerovy baňky, opatřené odraznými destičkami a sterilizuje se. První kultura se potom naočkuje kouskem mycelia z jedné šikmé agarové kultury a inkubuje aerobně po dobu jednoho týdne v temnu při teplotě 27 °C a při 100 ot/min v na třepačce inkubační místnosti při 40% relativní vlhkosti.

Pro druhou kulturu se 500 ml uvedeného standardního kultivačního media umístí do 2000 ml Erlenamyerovy baňky, opatřené odraznými destičkami a sterilizuje se. Sterilizované medium se potom naočkuje 5 % /hmotnost/objem/ první kultury. Poněvadž Sclerotium rolfsii tvoří velké sbalky za nízkých smykových podmínek v třepací nádobě, je nutné nejdříve první kulturu homogenizovat za sterilních podmínek /20.000 ot/min, 30 s/. Druhá kultura se potom inkubuje pod dobu 3 až 4 dnů za stejných podmínek, které jsou popsány pro první kulturu.

Kultivace probíhá při rychlosti míchadla 200 ot/min a velikosti vzdušnění 0,067 obj/obj.min v reaktoru, který je opatřen čtyřmi míchadly INTERMIG a který má tyto rozměry:

celkový objem	1500 litrů
pracovní objem	1000 litrů
vnitřní průměr	860 mm
celková výška	2760 mm
výška plnění	1800 mm
průměr míchadla	580 mm
výška listu míchadla	125 mm
šířka zarážky	70 mm
vzdálenost stěny od zarážky	17 mm
poměr výšky náplně k vnitřnímu průměru	2,1
poměr průměru míchadla k vnitřnímu průměru	0,68.

Nejvyšší rychlost míchadla je 2,0 m/s a průměrná rychlost ve smyku je 50,0 s^{-1}. Celkové produktivity 2,9 g/litr se dosáhne ve výrobním čase 77 h, s konečnou koncentrací produktu 9,2 g/litr. Zdánlivá viskozita /měřená s koncentrací polysacharidu 0,3 g/litr a $\gamma = 0,3\ s^{-1}$/ je 29 mPa/s a molekulová hmotnost polysacharidu je $3,0.10^6$ g/mol.

Molekulární charakterizace beta-1,3-skleroglukanového produktu se provádí technikou rozptylu světla při použití pěti různých koncentrací polymeru v 0,01 N vodném roztoku hydroxidu sodného jako rozpouštědle. Zásobní roztoky se připraví rozpuštěním přiměřených množství lyofilizovaného práškového vzorku beta-1,3-skleroglukanu a potřebné zásobní roztoky se míchají po dobu 1 až 2 dnů při teplotě 25 °C. Potom se stanoví statická a dynamická data rozptylu světla. Z těchto dat se odvodí poměr /R_g/R_h/ poloměru otáčení /R_g/ k hydrodynamickému poloměru /R_h/. Tento poměr /R_g/R_h/ slouží jako indikátor tvaru testovaného vzorku. Po skladování po dobu 11 dnů je získaný poměr /R_g/R_h/ 0,87, který je bližší hodnotě pro kouli 0,76 než pro tyčinku / > 2/, a druhý osmotický viriální ko-

eficient /A_2/, který vyjadřuje závislost koncentrace na intenzitě rozptylu, je $4.1.10^{-4}$ $cm^3 molg^{-2}$.

Měření viskozity se provádí při teplotě 25 °C s různými zředěnými vzorky základního roztoku s použitím vodného roztoku hydroxidu sodného nebo dimethylsulfoxidu jako rozpouštědla. Přístroj použitý k měření viskozity je Ubelohde-Capillary I /kapilární konstanta K = 0,009693/, s aplikací Hagenbachovy korekce.

Reologická měření se provádějí se vzorkem beta-1,3-skleroglukanu Bohlinovým reometrem CS-50 při teplotě 25 °C. Systém válců CS-25 se používá jako systém měřicí. Odečítá se při čtyřech koncentracích polymeru /0,5 %, 1%, 1,5 % a 2 %/. Použitým rozpouštědlem je voda s přísadou 2-fenoxyethanolu jako stabilizátoru. Všechny roztoky se skladují po dobu nejméně 2 týdnů než se analýzují. Roztoky se potom koncentrují oddestilováním vody s použitím zařízení ''Rotavap'' při teplotě 60 °C.

Po době 17 dnů skladování je Staudingerův index η/100 cm^3/ g pro roztok beta-1,3-skleroglukanu v 0,01 N vodném roztoku hydrosidu sodného 3,64 a Staudingerův index η/100 cm^3/g pro roztok beta-1,3-skleroglukanu v dimethylsulfoxidu je 5,51.

Tyto výsledky potvrzují, že beta-1,3-skleroglukan má trojrozměrnou příčně vázanou strukturu tripletového helixu.

Příklad 2

S použitím postupu popsaného v příkladu 1 se vede kultivace při rychlosti míchadla 100 ot/min a vzdušnění 1,0 obj/obj/min, ve stejném reaktoru, který byl použit v příkladu 1. Nejvyšší rychlost míchadla je 1,0 m/s a průměrná rychlost ve smyku je 25,0 s^{-1}. Celkové produktivity 3,1 g/litr se dosáhne po výrobním čase 98 h, s konečnou koncentrací produktu 12,6 g/litr. Zdánlivá viskozita /měřená s koncentrací polysacharidu 0,3 g/litr a γ = 0,3 s^{-1}/ je 37 MPa/s a molekulová hmotnost polysacharidu je $4,1.10^6$ g/mol.

S použitím podmínek popsaných v příkladu 1 se reologická měření provádějí se vzorkem beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 2, a to s Bohlinovým reometrem CS-50 při teplotě 25 °C. Systém válců CS-25 se používá jako systém měřicí. Odečítá se při třech koncentracích polymeru /0,5 %, 1 %, 1,5 %/. Použitým rozpouštědlem je voda s přísadou 2-fenoxyethanolu jako stabilizátoru. Všechny roztoky se skladují po dobu nejméně 2 týdnů než se analýzují. Roztoky se potom koncentrují oddestilováním vody s použitím zařízení "Rotavap" při teplotě 60 °C. Měření rotace se provádějí při rychlosti smyku 20/s nebo 100/s. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka

Koncentrace testované sloučeniny % hmot.	Viskozita η mPa/s	
	rychlost smyku 20 [1/s]	rychlost smyku 100 [1/s]
0,5	231,6	57,16
1,0	573,5	138,2
1,5	1226,0	291,5

Výsledky ukazují na chování pseudoplastického toku testované sloučeniny při klesající smykové viskozitě a vyšších rychlostech smyku. Aby se dosáhlo dobré skladovací stability u některého konečného produktu, například kosmetického preparátu, může být využito vlastnosti dobrého houstnutí nových beta-1,3-skleroglukanů podle tohoto vynálezu. Z uvedeného hlediska je reologické chování nových beta-1,3-skleroglukanů při nízkých rychlostech smyku relevantní. Vysoké stability při skladování se tedy dosáhne úpravou viskozity, čímž se získávají vysoké hodnoty při nízkých rychlostech smyku. V případě kosmetické pasty, kterou je nutno na pokožce roztírat, se vyskytují rychlosti smyku až do 1000/s. Aby se dosáhlo maximálně rovnoměrného rozetření pasty na pokožce, musí být viskozita pasty při těchto vyšších rychlostech smyku nízká. Výsledky v tabulce

jasně ukazují, že nové beta-1,3-skleroglukany podle tohoto vynálezu zmíněným požadavkům vyhovují.

Příklad 3

Masážní krém se připraví z těchto složek /% hmot./:

včelí vosk	2
parafinový olej	45
cetylalkohol	3
pektin /molekolová hmotnost 100.000/	2,5
deionizovaná voda	46,5
methylparaben	0,2
beta-1,3-skleroglukan z příkladu 1	0,5
parfém	0,3

vše vztaženo na celkovou hmotnost krému.

Nejdříve se připraví první roztok homogenním rozpuštěním pektinu, methylparabenu a skleroglukanu v deionizované vodě při teplotě 80 °C. Druhý roztok se připraví roztavením včelího vosku, parafinového oleje a cetylalkoholu zahříváním směsi na teplotu 80 °C. Zatímco se první roztok míchá v homogenizačním mixéru, přidává se k němu druhý roztok a disperguje se. Získaná emulze se nechá chladnout a při dosažení teploty 70 °C se přidá parfém. Jakmile teplota klesne na 30 °C, míchání se zastaví. Takto získaná forma masážního krému olej ve vodě má dobrou strukturu a lesk a při teplotě 2 až 60 °C skladování je stabilní po dobu více než 6 měsíců.

Příklad 4

Vodný oftalmologický přípravek se připraví z těchto složek /mg/:

beta-1,3-skleroglukan z příkladu 1	1
sodná sůl diklofenaku	1
zprostředkovadlo rozpouštění /Cremophor EL/	50
oftalmologický pufr /Trometamol/	6

boritá kyselina	19
oftalmologické konzervans /Thiomersal/	0,04
voda pro injekce do	1,00 ml.

Příklad 5

Vodný lotion pro ošetřování drsné pokožky se připraví z vodné emulze, která obsahuje 10 % hmot. glycerylstearátu a buď 0,05 % hmot. nebo 0,50 % hmot. beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1.

Stanovení drsnosti pokožky se provádí podle německé normy DIN 4768ff. Drsnost pokožky se stanoví odebráním silikonových otisků pokožky a potom měřením profilu povrchu otisků pomocí profilometru, který je spojen s počítačem. Drsnost pokožky se vypočítává z mnohonásobně měřených bodů /100 bodu na mm^2/. Počet dobrovolníků je 10. Stanovení drsnosti pokožky se provádí před aplikací zkoušeného lotionu a 8 hodin po aplikaci zkoušeného lotionu. Jako zkušební místo na pokožce se užívá pokožka na předloktí. Pro srovnání se provádí kontrolní pokus s použitím placeba. Získané výsledky svědčí o snížení drsnosti pokožky /při srovnání s neošetřenou pokožkou/ o 32 % s lotionem, který obsahuje 0,05 % hmot. beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1 a 35 % s lotionem, který obsahuje 0,50 % hmot. beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1. Kontrolní pokus prokázal snížení drsnosti pokožky /ve srovnání s neošetřenou pokožkou/ pouze o 22 %.

Příklad 6

Působení beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1 /0,1 % hmot. nebo 0,5 % hmot./, který byl rozpuštěn ve vodě, na zvlhčování pokožky, bylo zkoumáno za definovaných klimatických podmínek /22 °C a 60% relativní vlhkost/. Testované roztoky byly aplikovány na předloktí. Odhady vlhkosti pokožky se stanovují před aplikací testovaného roztoku, 1 h po aplikaci a 8 h po aplikaci. Stanovení se provádí s použitím přístroje Corneometer /model CM 820, Courage and Khazuka, Německo/. Vypočítá se zvýšení vlhkosti pokožky v procentech na ošetřeném místě pokožky ve srovnání s neoše-

třenou pokožkou. Počet dobrovolníků je 10.

Zvýšení vlhkosti pokožky, 1 h po aplikaci, při použití 0,1% vodného roztoku beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1, je 27 % a při použití 0,5% vodného roztoku beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1 je 29 %. Zvýšení vlhkosti pokožky 8 h po aplikaci, při použití 0,1% vodného roztoku beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1, je 17 %, při použití 0,5% vodného roztoku beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1 je 22 %.

Tyto výsledky ukazují, že beta-1,3-skleroglukan z příkladu 1 vyvolává okamžité zvýšení vlhkosti pokožky. Po 8 h po aplikaci testovaného produktu vykazuje jeho 0,5% roztok významnou dlouhotrvající retenci vody v pokožce. Toto dlouhotrvající působení převyšuje srovnávací výsledky, které byly získány při použití buď 0,1% hyaluronové kyseliny nebo 0,25% kolagenu.

Příklad 7

Zkouška protizánětlivé účinnosti beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1, rozpuštěného ve vodě /0,1%/.

Pět dobrovolníků se zdrželo po dobu tří dnů aplikace kosmetických přípravků na zkušební oblast pokožky před zahájením studie. Na zádech dobrovolníků se vytvoří různé stupně UV-erytému po expozici UV-záření lampou /lampa Ultra-Vitalux; Osram/. Aplikovaná energie odpovídá 1,5násobku minimální erytémové dávky /MED/, která se stanoví u každého dobrovolníka před vyvoláním erytému. Testovaná sloučenina se aplikuje ihned po ozáření a 6 h po něm. V průběhu následujících 5 dnů se erytém ošetřuje dvakrát denně testovaným produktem. Stupeň zčervenání erytému se stanovuje s použitím chromametru /Minolta/, a to 24 h, 72 h a 120 h po první aplikace testovaného produktu.

Po 24 h činí zmenšení zčervenání, při srovnání s neošetřeným konrolním erytémem, 17 %, po 72 h 23 % a po 120 h 31 %. Tyto výsledky jsou po 120 h výrazně lepší než výsledky, které byly získány při

srovnávacích zkouškách s použitím známých protizánětlivých prostředku D-panthenolu /použit jako 2,0% lotion/ nebo Aloe vera /10% z gelu 1 : 1/. Při použití lotionu, který byl připraven z 0,5 % hmot. beta-1,3-skleroglukanu z příkladu 1 rozpuštěním ve vodě, činí zmenšení zčervenání, při srovnání s neošetřeným erytémem 40 % po 120 h, což je daleko lepší než hodnoty pozorované při použití D-panthenolu /použit jako 2,0% lotion/ nebo Aloe vera /10% z gelu 1 : 1/.

Příklad 8

Ústní voda

Složení /% hmot./:

Triclosan	0,03 až 0,1
alkohol /potravinářský ethanol/	10 až 20
glycerol	5 až 10
smáčedlo, např. Polysorbate 20, Poloxymer 407, laurylsíran sodný	1 až 2
sacharin /sodný/	0,02 až 0,05
fluorid sodný	0 až 0,05
aroma	q. s.
barvivo	q. s.
deionizovaná voda do	100
beta-1,3-skleroglukan z příkladu 1	1 až 5
hodnota pH	5 až 7.

Způsob přípravy: Triclosan se rozpustí v alkoholu, potom se přidá roztok smáčedla. K tomuto roztoku se přidá glycerol a asi 20 % hmot. vody. Potom se přidají všechny další složky a mícháním se zhomogenizují. Dodá se voda do 100 % hmot. Upraví se hodnota pH a míchá se tak dlouho, až je roztok čirý. Pokud se Trikosan úplně nerozpustí, musí se zvýšit obsah alkoholu a/nebo smáčedla.

Příklad 9

Zubní pasta

Složení /% hmot./:

prostředek proti gingivitidě nebo bakteriím, například Triclosan	0,1 až 0,3
prostředek proti karies, například fluorid sodný nebo monofluorfosforečnan sodný	0,1 až 1,0
gelotvorné činidlo, například karboxymethylcelulóza, hydroxyethylcelulóza nebo xantanová guma	1,0
zvlhčovadlo, například glycerol, 70% sorbitol nebo propylenglykol	10 až 20
abraziva, například uhličitan vápenatý, hydratovaná silika, dihydrát dikalciumfosfátu nebo kaolin	15 až 20
sladidlo, například sacharin	0,1 až 0,2
aroma, například spearmint, pepermint, mentol nebo vanilin	1,0 až 1,5
smáčedlo, například laurylsíran sodný, lauroylsarkosinát sodný nebo laurylsulfoacetát	1,0 až 2,0
konzervační látka, například paraben	0,1 až 0,5
beta-1,3-skleroglukan z příkladu 1	5 až 10
barvivo	q. s.
voda do	100

Průmyslová využitelnost

Nový polysacharid beta-1,3-skleroglukan, připravený způsobem podle tohoto vynálezu, je výhodnou součástí kosmetických přípravků ve formě gelů, roztoků, emulzí, masážních krémů apod. pro různé účely použití, jako jsou šampony, ústní vody, zubní pasty, lotiony, zvlhčovadla pokožky, ochranné krémy, protizánětlivé preparáty apod.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Kosmetický přípravek v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje
A/ kosmeticky přijatelný nosič a
B/ 0,05 až 3,0 % hmot., vztaženo na hmotnost celého přípravku, beta-1,3-skleroglukanu, který má trojrozměrnou příčně vázanou strukturu tripletového helixu a průměrnou molekulovou hmotnost od 1.10^6 do 12.10^6.

2. Kosmetický přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje
A/ kosmeticky přijatelný nosič a
B/ 0,2 až 1,0 % hmot., vztaženo na hmotnost celého přípravku, beta 1,3-skleroglukanu s průměrnou molekulovou hmotností od 2.10^6 do 10.10^6.

3. Kosmetický přípravek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tvoří šampon a/nebo vlasový kondicionér.

4. Kosmetický přípravek podle nároku 1 nebo 2, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tvoří směs pro péči o pokožku.

5. Kosmetický přípravek podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že směs pro péči o pokožku je vytvořena jako vodný lotion, jako emulze vody v oleji nebo oleje ve vodě, jako lotion olejový nebo alkoholicko-olejový, jako vezikulární disperze aniontového nebo neiontového amfifilního lipidu, jako vodný, vodně-alkoholický, nebo alkoholicko-olejový gel, jako tuhá tyčinka nebo aerosol. (alkoholický)

6. Kosmetický přípravek podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m , že v emulzi vody v oleji nebo oleje ve vodě obsahuje kosmeticky přijatelný nosič A/ 5 až 50 % hmot. olejové fáze a 47 až 94,95 % hmot. vody, oboje vztaženo na celkovou hmotnost přípravku.

7. Kosmetický přípravek podle některého z předcházejících nároků, v y z n a č u j í c í s e t í m , že navíc obsahuje jedno nebo více změkčovadel, zvlhčovadel pokožky, UV-filtrů, zahušťovacích prostředků, prostředků zadržujících vlhkost, filmotvorných látek, konzervačních látek, parfémů a barviv.

8. Kosmetický přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tvoří protizánětlivý preparát pro ošetřování pokožky.

9. Kosmetický přípravek podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tvoří protizánětlivý preparát pro ošetřování pokožky, určený pro ošetřování pokožky po slunění.

10. Kosmetický přípravek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tvoří preparát pro péči o dutinu ústní, směs pro lubrikaci sliznic nebo oftalmologický preparát s obsahem nosiče.

11. beta-1,3-skleroglukanová sloučenina, která má trojrozměrnou příčně vázanou strukturu tripletového helixu a průměrnou molekulovou hmotnost od 1.10^6 do 12.10^6.

12. beta-1,3-skleroglukanová sloučenina, která má trojrozměrnou příčně vázanou strukturu tripletového helixu a průměrnou molekulovou hmotnost od 2.10^6 do 10.10^6.

13. Způsob výroby beta-1,3-skleroglukanové sloučeniny podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kultivují pro rostliny patogenní Fungi imperfecti Sclerotium rolfsii ATCC 15205 v kultivačním mediu za mikroaerobních podmínek.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m , že používané základní kultivační medium obsahuje zdroj uhlíku, zdroj dusíku, zdroj fosforečnanů, chlorid draselný, heptahydrát síranu hořečnatého, heptahydrát síranu železnatého a extrakt z kvasnic.

15. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zdrojem dusíku je dusičnan sodný a zdrojem fosforečnanů je trihydrát dihydrogenfosforečnanu draselného.

16. Způsob podle některého z nároků 13 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zdrojem uhlíku je glukóza.

17. Způsob podle některého z nároků 13 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se k základnímu mediu přidává hydrát kyseliny citronové, thiamin nebo jeho sůl s minerální kyselinou a zinečnatá sůl.

18. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se k základnímu mediu přidává hydrát kyseliny citronové v množství v rozmezí od 0,2 do 1,5 g/litr, thiamin nebo jeho sůl s minerální kyselinou v množství v rozmezí od 0,3 do 30 mg/litr a zinečnatá sůl v množství v rozmezí od 0,3 do 30 mg/litr.

19. Způsob podle některého z nároků 13 až 18, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se provádí s použitím specifické rychlosti absorpce kyslíku /rychlost absorpce kyslíku vztažena na biomasu/ v rozmezí od 0,01 až 0,08 h^{-1}.

20. Způsob podle některého z nároků 13 až 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e se jako inokulum používá výchozí kultura s omezeným obsahem dusíku.

21. Způsob podle některého z nároků 13 až 20, v y z n a č u j í s e t í m , že se provádí za míchání, při teplotě 15 až 40 °C, potom se oddělí kultivační roztok od biomasy a takto získaný beta-1,3-skleroglukanový produkt se izoluje.