

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241179**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **431873**

(22) Data zgłoszenia: **21.11.2019**

(51) Int.Cl.

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 1/24 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

(54)

Sposób otrzymywania kolagenu o aktywności antyoksydacyjnej

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

31.05.2021 BUP 11/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

16.08.2022 WUP 33/22

(73) Uprawniony z patentu:

DEPUT TOMASZ, Radzymin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ŁUKASZ KUCHARSKI, Szczecin, PL

ADAM KLIMOWICZ, Szczecin, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Rafał Malujda

PL 241179 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kolagenu o aktywności antyoksydacyjnej, który może być wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, spożywczym.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kolagenu o aktywności antyoksydacyjnej ze skór ryb słodkowodnych, z przeznaczeniem głównie dla przemysłu kosmetycznego, farmaceutycznego i spożywczego.

Z polskiego opisu patentowego PL190757B1 znany jest sposób otrzymywania kolagenu biologicznie aktywnego ze skór ryb łososiowatych, w którym obrabiany surowiec poddaje się czyszczeniu skór z użyciem narzędzi wykonanych z materiałów naturalnych jak szkło lub drewno, pozbawiając skóry z łusek, skrzel i tkanki mięsnej. Tak przygotowany surowiec umieszcza się w roztworze kwasu mlekowego o stężeniu od 0,1 do 1,5%, uzyskując hydratację zawartego w skórkach kolagenu, przy czym proces hydratacji dokonuje się w szklanych pojemnikach w temperaturze od 15–20°C przez okres od 24 do 48 godzin, prowadząc bieżącą wizualną kontrolę procesu. Następnie odbywa się operacja filtracji z wykorzystaniem naturalnego jedwabiu o wzrastającej gęstości poprzez wielokrotne sączenie, powodując oddzielanie się od czystego kolagenu elementów komórkowych, pigmentów oraz pozostałości kwaśnego roztworu, przy czym filtry z jedwabiu naturalnego mają strukturę zbliżoną do struktury kolagenu, nie powodując zniszczenia struktury kolagenu. Operacja sączenia polega na 15 do 20 krotnym sączeniu kolagenu przez naturalne filtry jedwabne, eliminując z powierzchni kolagenu pigment, elementy komórkowe, zatrzymując niezwiązany wodzian kwasu mlekowego oraz pozbawiając kolagen charakterystycznego zapachu, pozostawiając aktywność biologiczną.

Z patentu PL206813B1 znany jest sposób otrzymywania kolagenu, ze skór ryb słodkowodnych i/lub słonowodnych, polegający na tym, że skóry ryb oddziela się od tusz, oczyszcza mechanicznie z nadmiaru tłuszczu oraz poddaje się dezynfekcji, a następnie zalewa się skóry roztworem wodnym kwasu glikolowego lub mieszaniny kwasu glikolowego z kwasem mlekowym w wodzie heksagonalnej w stężeniu od 0,4% wagowych do 10% wagowych i po czasie reakcji prowadzi się proces ekstrakcji kolagenu w roztworze o pH od 1,8 do 3,8 przez czas co najmniej 12 godzin w temperaturze od 2°C do 20°C. Z literatury branżowej znany jest 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 w ilości 4 części wagowych na 1 część wagową skór rybich. Otrzymuje się roztwór kolagenu o pH około 2,8, który konserwuje się Aseptyną. Kolagen jest szeroko rozpowszechnionym zewnątrzkomórkowym białkiem zwierzęcym stanowiącym około 30% białek w organizmie. Z uwagi na swoje unikalne właściwości biologiczne, biogodność ze wszystkimi organizmami żywymi, jest on powszechnie wykorzystywany w kosmetologii, farmacji czy medycynie estetycznej. Białka kolagenowe pod względem strukturalnych i funkcjonalnych cech można podzielić na dwie grupy: tworzące fibryle oraz struktury niefibrylarne. Do pierwszej grupy zalicza się główne, najczęściej występujące w tkance łącznej oraz najlepiej poznane kolageny typu I, II, III, V i XI. Dla wszystkich tych typów istnieje jeden wspólny model w postaci potrójnej helisy. Druga grupa, kolageny niezdolne do tworzenia fibryli, wykazują znaczne różnice w strukturze, umiejscowieniu w tkankach oraz pełnią odmienne funkcje w organizmach żywych. Ich wspólną cechą jest występowanie co najmniej jednego niehelikalnego fragmentu w strukturze. W produktach kosmetycznych zawierających kolagen rybi w znaczącej przewadze występuje typ genetyczny kolagenu I oraz niewielkie ilości typów genetycznych II i III. Dominującą formą kolagenu (85–90%) w skórze człowieka jest kolagen typu I, który stanowi włóknistą podporę skóry, a także kolagen typu III (do 15%), który oplata włókna zbudowane z kolagenu typu I i odpowiada za prawidłowe ich ułożenie, a także za sprężystość skóry. Kolagen występujący w kosmetykach w trakcie ogrzewania ulega denaturacji. Denaturacją białka nazywamy zmiany w przestrzennej strukturze białka natywnego, które prowadzą do utraty aktywności biologicznej oraz innych indywidualnych cech charakterystycznych, przy zachowaniu sekwencji aminokwasów. W wyniku działania podwyższonej temperatury, powyżej tzw. temperatury denaturacji, obserwuje się rozpad wiązań wodorowych i hydrofobowych, stabilizujących natywną strukturę białka. Struktura potrójnej helisy rozpada się tracąc swoje charakterystyczne i funkcjonalne właściwości. W efekcie następuje

rozwijanie się superhelisy i oddysocjowanie jednostek α . W przypadku, gdy wszystkie łańcuchy kolagenu są połączone między sobą siecującymi wiązaniami kowalencyjnymi lub gdy wiązanie występuje między dwoma łańcuchami polipeptydowymi, powstają odpowiednio trimery (γ) lub dimery (β). Brak wiązań kowalencyjnych w białku powoduje rozpad cząsteczki do pojedynczych łańcuchów α . Ciepła denaturacja kolagenu skóry ryb prowadzi na ogół do dysocjacji na podjednostki α i β , przy bardzo niewielkim udziale trimerów – do ok. 10%. Najistotniejszym skutkiem dalszego ogrzewania jest przejście potrójnej helisy w kłębek statyczny. Stabilność cieplna żelu kolagenowego i jego funkcjonalne właściwości zależą od zawartości hydroksyproliny w białku. Hydroksyprolina stabilizuje trójniciową superhelisę kolagenu tworząc wiązania wodorowe między helisami. Przy wyższej zawartości hydroksyproliny w białku jest niezbędna wyższa dawka energii dla rozerwania zwiększonej liczby wiązań wodorowych pomiędzy grupami wodorotlenowymi hydroksyproliny a tlenem grupy karbonylowej wiązania peptydowego położonego w sąsiedztwie. Rozpuszczalny kolagen izolowany ze skór rybich posiada temperaturę denaturacji zawartą w granicach 25–30°C. Objawem denaturacji rozpuszczonego białka jest znaczne obniżenie lepkości roztworu. W większości przypadków kolagen rybi, w tym kolagen izolowany ze skór rybich występujący w kosmetykach, nie ulega denaturacji, ponieważ jest mniej usieciovany i zawiera mniej hydroksyproliny niż kolagen organizmów stałocieplnych. Nawet krótkotrwałe ogrzewanie żelu kolagenowego powoduje nieodwracalne zmiany w strukturze trzeciorzędowej białka. Podjednostki najczęściej samorzutnie "zwijają się" w roztworze w rodzaj kłębka. Kłębek ten ma zwykle kształt zbliżony do sfery, wewnątrz której znajduje się zwinięty w kulkę łańcuch biopolimeru oraz zokludowane w nim cząsteczki rozpuszczalnika. Struktura ta ma całkowite odmienne właściwości funkcjonalne niż natywny kolagen. Preparaty kosmetyczne ogrzane powyżej temperatury denaturacji tracą swoje właściwości nieodwracalnie. Niemożliwe jest, aby po denaturacji żelu kolagenowego i ochłodzeniu tego żelu wytworzyła się natywna struktura potrójnej helisy tego białka. Śluz ze ślimaka, jak wykazały badania, zawiera kolagen, elastynę, kwas glikolowy oraz alantoinę, jak również szereg protein, przeciwutleniaczy, oligoelementów, witamin oraz naturalnych antybiotyków. Śluz ślimaka, ze względu na swoje silne właściwości regenerujące, stosowany jest w leczeniu trądziku, kuracji przeciwzmarszczkowej, usuwaniu blizn, podrażnień, oparzeń, rozstępów oraz w celu przyspieszenia gojenia się ran. Połączenie kolagenu ze śluzem ślimaka zwiększa ilość antyoksydantów, co ma olbrzymi wpływ na eliminację wolnych rodników odpowiedzialnych za starzenie skóry. W składzie śluzu ślimaka znajduje się sporo protein, które mają wiele nienasyconych wiązań, co powoduje, że tworzą one naturalny filtr UV, który absorbuje szkodliwe promieniowanie słoneczne, chroniąc skórę przed jego niekorzystnym działaniem i procesem fotostarzenia. Brak równowagi między tworzeniem się reaktywnych form tlenu (RFT) a możliwościami antyoksydacyjnymi organizmu nazywany jest stresem oksydacyjnym. Wolne rodniki są to cząsteczki lub atomy, które posiadają niesparowane elektrony i powstają w czasie niecałkowitej redukcji cząstek tlenu w procesie oddychowym lub w czasie reakcji biochemicznych zachodzących w komórkach organizmu. Stres oksydacyjny jest nie tylko i wyłącznie wywoływany przez RFT, ale równie istotną rolę mogą odgrywać także reaktywne formy azotu (RFA) oraz reaktywne formy siarki. Wpływ reaktywnych form tlenu na organizm ludzki jest ogromny. Te agresywne formy mogą być przyczyną wielu schorzeń mięśnia sercowego, powodować nawet zawał, wpływać na chorobę wieńcową. Stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w rozwoju komórek nowotworowych, znacznie utrudnia leczenie i właśnie dlatego antyoksydanty mogą odgrywać istotną rolę w procesie leczenia raka. Istnieje wiele schorzeń, które mogą być następstwem działania RFT, główne z nich to: cukrzyca, zaburzenia w przemianie tłuszczów, stwardnienie rozsiane, choroba Alzheimera czy Parkinsona, infekcje (wirusowe, AIDS, grzybicze), reumatoidalne zapalenie stawów, choroby układu pokarmowego, alergie, zaćma, zwyrodnienie plamki żółtej, choroby skórne, czy schorzenia autoimmunologiczne. Największym sprzymierzeńcem w walce z RFT są antyoksydanty, które mogą być pochodzenia naturalnego lub syntetyczne. Uzasadnione więc wydaje się być wprowadzanie diety bogatej w naturalne antyoksydanty, które mogą odgrywać kluczową rolę w walce z chorobami cywilizacyjnymi. Sprzymierzeńcami w walce z RFT są więc owoce i warzywa, a także niektóre oleje oraz witaminy C i E. Dużą aktywność antyoksydacyjną wykazują następujące grupy związków: kwasy fenolowe, flawonoidy, garbniki, kumaryny, stilbeny. Aktualnie znane są sposoby otrzymywania kolagenu z takich surowców jak skóry zwierzęce, kości zwierząt czy ze skór rybich.

Istotą rozwiązania według wynalazku jest sposób otrzymywania kolagenu o aktywności antyoksydacyjnej, ze skóry ryb słodkowodnych, dokładnie zdezynfekowanych, która ulega procesowi izolacji przy użyciu ekstraktów wykonanych za pomocą ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz zawierających w swoim składzie 5% liści brzozy, charakteryzujący się tym, że ekstrakty roślinne zostały wykonane

z użyciem kwasu winowego o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$, przy czym ekstrakcję kolagenu prowadzi się w czasie 72 godzin w temperaturze pokojowej, a proces ekstrakcji kolagenu odbywa się przy $\text{pH} = 2,8$. Po zakończeniu ekstrakcji, uzyskany materiał poddaje się procesowi filtracji na filtrach świecowych wykonanych z nylonu. Korzystnie, do uzyskanego kolagenu dodaje się 3% śluzu ślimaka *Helix aspersa* Müller i poddaje procesowi mieszania przez co najmniej 120 minut.

Celem wynalazku jest opracowanie nowej technologii wytwarzania kolagenu o aktywności antyoksydacyjnej ze skór dokładnie oczyszczonych i czystych mikrobiologicznie ryb słodkowodnych z dodatkiem śluzu ślimaka *Helix aspersa* Müller i ekstraktu z liści brzozy. Opracowana technologia obejmuje rozdział kolagenu przy użyciu filtrów świecowych wykonanych z nylonu charakteryzujący się tym, że nie niszczy potrójnej helisy, natomiast wydajność procesu filtracji dla jednego filtra wynosi 100–1000 kg/dzień. Celem wynalazku jest sposób wytwarzania „żywego kolagenu”, opartego na ekstrakcji ze skóry ryb przy wykorzystaniu ekstraktu z liści brzozy wykonanych przy użyciu ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz, znamienny tym, iż pozyskany kolagen wykazuje wysoki potencjał przeciwutleniający.

Według wynalazku sposób otrzymywania kolagenu ze skór ryb, dokładnie oczyszczonych od tuszy i dokładnie zdezynfekowanej, które normalnie zostałyby poddane utylizacji. Tak przygotowany materiał poddano procesowi ekstrakcji przy wykorzystaniu jako ekstrahenta wcześniej przygotowanych ekstraktów z liści brzozy. Do wyizolowania składników o właściwościach antyoksydacyjnych wykorzystano liście brzozy, przy zastosowaniu ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami o częstotliwości 40 kHz w czasie od 5 do 120 minut. Ilość materiału roślinnego w ekstraktach był równy 5% (w/w). Tak przygotowany materiał roślinny zalewany był roztworem kwasu winowego 0,1. Po upływie czasu ekstrakcji, materiał roślinny oddzielano od ekstraktu, który następnie wykorzystywano do ekstrakcji kolagenu ze skór ryb. Skórę ryb w ilości 5 do 10% (w/w) zalewano ekstraktem według powyższego schematu i poddawano procesowi maceracji w czasie 72 h, proces ten zachodził w roztworze kwasu winowego o $\text{pH} 2,8$, tak pozyskany kolagen charakteryzował się wysokim potencjałem antyoksydacyjnym, potwierdzonym analitycznie metodą DPPH, posiadał także bardzo stabilną strukturę i charakteryzował się bardzo przyjemnym zapachem i cytrynowym kolorem.

Przedmiot wynalazku został przedstawiony w przykładach wykonania, kolagenu ze skór ryb o aktywności antyoksydacyjnej.

Przykład I

Sporządzono 5% ekstrakt liści brzozy w $0,1 \text{ mol/dm}^3$ kwasie winowym o masie 9400 g i poddano działaniu ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz w czasie 75 minut. Oczyszczoną i zdezynfekowaną skórę z łosia w ilości 600 g zalewano wyżej przygotowanym wyciągiem, ekstrakcję hydratu kolagenu prowadzono w temperaturze pokojowej w czasie 72 godzin w roztworze o pH równym 2,8. Po zakończeniu ekstrakcji, pozyskany materiał (hydrat) uzdatniano w czasie 30 minut za pomocą filtrów świecowych wykonanych z nylonu. Uzyskano kolagen, który charakteryzował się aktywnością antyoksydacyjną wynoszącą 49% (oznaczoną metodą DPPH).

Przykład II

Kolagen uzyskany w przykładzie I w ilości 10 kg wymieszano przy pomocy mieszadeł wolnoobrotowych z 300 g śluzu ślimaka *Helix aspersa* Müller w czasie 120 minut. Tak uzyskany produkt charakteryzował się większą odpornością termiczną niż kolagen bez śluzu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kolagenu ze skóry ryb słodkowodnych, który posiada aktywność antyoksydacyjną **znamienny tym**, że ekstrakcję kolagenu prowadzi się przy użyciu 5% ekstraktu liści brzozy w $0,1 \text{ M}$ kwasie winowym, poddanego działaniu ultradźwięków o częstotliwości 40 kHz, w czasie 72 godzin, w temperaturze pokojowej, przy pH równym 2,8, a następnie po zakończeniu ekstrakcji uzyskany materiał poddaje procesowi filtracji na filtrach świecowych wykonanych z nylonu.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do uzyskanego kolagenu dodaje się 3% śluzu ślimaka *Helix aspersa* Müller i poddaje procesowi mieszania przez co najmniej 120 minut.