

# Kozmetik Endüstrisi İçin Ham Madde Olarak Uzun Sığır Tendonları'ndan Elastin ve Kolajen Polipeptidlerin İzolasyonu

## ISOLATION OF ELASTIN AND COLLAGEN POLYPEPTIDES FROM LONG CATTLE TENDONS AS RAW MATERIAL FOR THE COSMETIC INDUSTRY

F. LANGMAIER, M. MLÁDEK, K. KOLOMAZNÍK AND S. SUKOP

\* Institute of Protein and Leather Technology, Technological Faculty of Tomas Bata University, Nám, TGM 275 Zlín, CZ 76272/ČR, CZECH REPUBLIC

© Langmaier F, Mládek M, Kolomazník K, and Sukop S. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. *International Journal of Cosmetic Science* 2002; 24(5):273-9.

### Özet

Uzun sığır tendonları, lipoid ve eşlik eden nitrojenoz maddelerden enzimatik olarak düzenlenir.  $M_a=0.830\pm 1.206$  kDa ortalama moleküler ağırlıklı kolajenöz hidrolizat, cilt ve saç bakım ürünlerinde kullanılmak üzere uygundur ve ılımlı şartlarda ticari proteazla (*Bacillus subtilis*) hidroliz sonucunda elde edilir. Büyük zorlukla hidrolize edilebilen Elastin;  $M_a=0.448\pm 1.514$  kDa ortalama moleküler ağırlıklı bir ürüne, daha ağır şartlar altında; sonradan ticari endopeptidazla (*Bacillus licheniformis*)'le hidrolize edildi. Her hidrolizatın saflığı; hidroksiprolin ve amid nitrojen içerikleriyle değerlendirildi. Hidrolizatlardaki; aminosakkaridler ve glikosaminoglikanlar tespit edilemedi.

**Anahtar Kelimeler:** Uzun tendonların elastin hidrolizatlarla enzimatik hidrolizi, Kolajen hidrolizatlar

T Klin Kozmetoloji 2002, 3:206-213

### Summary

Long cattle tendons were enzymatically disposed of lipoid and accompanying nitrogenous substances. Collagenous hydrolysate of average molecular mass  $M_a=0.830\pm 1.206$  kDa suitable for application in skin and hair-care preparations, was obtained through hydrolysis by commercial protease (*Bacillus subtilis*) under mild conditions. Elastin, hydrolysable with greater difficulty, was subsequently hydrolysed by commercial endopeptidase (*Bacillus licheniformis*), under more drastic conditions, to a product of average molecular mass  $M_a=0.448\pm 1.514$  kDa. Purity of both hydrolysates was assessed by hydroxyproline and amide nitrogen contents. Aminosaccharides and glycosamino glycans in hydrolysates were not detected.

**Key Words:** Enzymatic hydrolysis of long tendons by elastin hydrolysates, Collagen hydrolysates

T Klin J Cosmetol 2002, 3:206-213

Kesilmiş sığırın, uzun tendonlarının (*musculus longissimus atlantis et capitis*, *musculus longus capitis*) üstün olan protein içeriği elastindir ve rahatlıkla histolojik boyama teknikleriyle belirlenebilir (ilk anda fenolik tip, orsein'in yoğun bağlanma renkleri). Non-polar yan zincirleriyle beliren amino asitler (glisin, alanin, valin ve lösin); yapısında dominanttır ve mevcut amino asitlerin yaklaşık %93'ünü oluştururlar. Elastinin sulu solüsyonlarda düşük şişebilme yeteneğinden birçok enzimin aktivasyonundan, fiziksel ve kimyasal etkilere yüksek rezistansı ve özel "çifte spiralli" tersiyer yapısın-

dan sorumludurlar. Bu özellikler nedeniyle, elastin erken dönemlerde genellikle "etkisiz" protein olarak tasarlandı. Uzun tendonlarda, elastinin yüksek oranı; kural olarak çiftlik hayvanlarına bazı yemek karışımlarını hazırlamak için; sınırlı et üretiminden bu artışın pratik kullanımına da neden olur.

Elastin veya daha doğrusu kolayca uygulanabilir hidrolizatlar, cilt ve saç bakımı kozmetiklerinin önemli bir bileşeni olarak kabul edilir, çünkü K-elastinin polipeptidler üzerinde yürütülen erken farmakolojik

çalışmalarda (organik çözücüler ve sudan oluşan bir çevrede üretilen elastinin alkale hidrolizatı); insan vücudu cildi epidermisindeki elastin biyosentezi stimülasyonundaki pozitif etkisi ve dermo-strüktürel aktivitesi gösterilmektedir (1,2).

Kozmetik bileşimlerdeki hazırlanmış elastinler; kimyasal veya enzimatik hidrolizle sürdürülen organik çözücülerle özümsemesi boyunca lipoid maddelerle düzenlenen dokulara uygun bağlanan bir endüstriyel derece üzerinden elde edilir. Elde edilen polipeptidler, 0.5-150 kDa' u sınırlarında belirlenen, geniş bir moleküler ağırlık dağılımında görünürler. Ticari elastine dayalı hazırlanan bileşimlerin sık bir sorusu; ilk anda düşük içerikte bir hidrokspirolin ve dikarboksilik amino asitler ve tersine, kolajende tamamen bulunmayan yaklaşık %0.4 mol dezmozin ve aynı kantitede izodezmozin'den farklılaşan kolajen degradasyon (hidrolizis) ürünleri ve lipoid maddelerle kontamine olup olmadığıdır. Elastin ekindeki desmozin ve izodesmozin; çapraz bağ yapısındadır.

Sunulan çalışma; cilt ve saç kozmetiklerinde avantajlı olarak uygulanan kolajen ve elastin hidrolizatlarına öncülük eden siğir uzun tendonlarının, iki basamaklı biyoteknolojik, enerji istemeyen özel işleme tutulmuş metodu tartışmaktadır.

## Deneysel

### *Başlangıç materyali*

Uzun siğir tendonları, belediyeye ait mezbaha'da taze üretimden alındı ve bir dondurucuda saklandı. Uzun fibrillerle histolojik testler (Orsein'le renklendirme) elastine kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi; uzun elastin fibriller arasındaki kısa fibröz oluşumlar ise tersine kolajene pozitif bir histolojik reaksiyon gösterdi. Materyalin kuru maddesi %43.25-4.40 arasındaydı, kuru maddedeki kül içeriği %1.18'e ve amid nitrojen (Kjeldahl) içeriği ise %15.51'e (w/w) erişiyordu. Özel işlemden önce orijinal materyal, 1-2 cm doğrusal boyutta partiküllere öğütüldü.

### *Başlangıç materyalinin saflığı*

Beraberindeki lipoid maddeler ve globüler proteinlerin düzeni; kısa tendonların kolajen temizlenmesi sırasında erkenden uygulanmış alkale bölgede (pH: 11.8) maksimum etkinlikteki mikrobiyal orijinli (Aspergillus) ticari olarak bulunabilen lipaz Graessex TM® (Novonordisk Bagsvaerd, Denmark)'la gerçekleştirilen biyoteknolojik bir prosedürle sunuldu (3,4). %1 hacimli sikloheksilamin eklenecek alkale bir reaksiyon çevresi üretilti. %500'lük hacim banyosu (başlangıç materyalinin kitlesine bağlı olarak), önceden anlatılan %15'lik hazırlanmış enzim (aynı temele dayanan) içeriyordu. 40°C'lik bir banyo ısısında, arasıra da hareketlenen reaksiyon karışımıyla, 48 saatlik bir periyot önceden tanımlanan beraberindeki bileşenlerin uzaklaştırılmasını yeteri kadar sağlıyordu. Distile sudan (40°C), yıkama suyu nötral reaksiyonuna kadar aynı hacimde erimeyen fraksiyon iki kere yıkandı. Sonucun üretkenliğini hesap ederek; ilk başlangıç materyalinin her zaman 1000 gr olduğu kantite tartısıyla; ilk materyal iki testte saflaştırıldı.

Banyonun kuru maddesinde, belirgin özelliklerden ayrı olarak (banyoda kuru madde, kuru madde'de amid nitrojen) lipoid madde total içeriğinin belirlenmesi, kloroformla özümsemiş kuru maddenin yeniden özümsemesini izleyerek bir diklorometan: kloroform (2:1 hacimsel) karışımıyla yinelenen aynı işlemlerle gerçekleştirildi. Bu teknik, biyolojik maddelerdeki küçük miktar lipoid maddelerin belirlenmesi için sıklıkla önerilmektedir (6,7).

Sonradan; benzen:dietil eter:etanol:asetik asit (50:40:2:0.2) ve heksan:dietil eter (80:30) (Fried'e göre polar lipoidler, trigliseridler ve serbest yağ asitlerinin ayrılması) (8) çözücü sistemlerini kullanarak silika jel G üzerinde TCL tekniğiyle izole edilen maddeler fraksiyonunda, lipoid maddelerin özel tiplerinin orantılı sunumu gözlemlendi. TCL kromatogramların kantitatif değerlendirilmesi; bir Camac TCL dansitometresi yardımıyla gerçekleştirildi (Camag, Mutenz, Swiss). Sonuç, açıkça Tablo 1'de düzenlenmiştir.

**Tablo 1.** Sığır uzun tendonlarının temizleme banyosunun özellikleri

Özellikler	Test 1	Test 2
Başlangıç materyali		
Tartılmış materyal (gr)	1000.0661	1000.1093
Kuru madde (%)	43.22	43.96
Kuru maddedeki amid nitrojen (%)	15.37	15.65
Saflaştırma Banyosu		
Banyodaki kuru madde	30.70	35.617
Başlangıç materyalindeki kuru madde %'si	7.12	8.09
Banyodaki kuru maddedeki lipoid maddeler (%)	29.74	38.67
Başlangıç materyalindeki kuru madde %'si	1.42	3.13
Banyodaki kuru maddedeki proteinler (%)	70.26	61.33
Başlangıç materyalindeki madde %'si	5.00	4.96
Banyodaki kuru maddedeki Amid Nitrojen (%)	10.70	9.18
Başlangıç materyalindeki kuru madde %'si	5.24	5.11
Saflaştırma Banyosunun Kuru Maddesindeki Lipoid Fraksiyonu		
Polar lipoidler (fosfolipoidler, steroidler vb.) (%)	2.70	2.90
Parsiyel gliseridler (%)	8.60	8.30
Trigliseridler (%)	31.00	28.50
Serbest yağ asitleri (%)	57.60	58.60
Total lipoid maddeleri (%)	99.90	98.30

### ***Kolajen hidrolizat***

Kolajen hidrolizat, prensipte elastinden, jelatine yol açan sıcak sulu basit özümsemeye ayrılabilir. Birçok nedenden dolayı (örnek (5)'e bakınız) cilt ve saç bakımından hazırlanmış bileşimlerdeki nemlendiricilerin fonksiyonu; 40°C'ye soğutulduktan sonra denatüre eden doğrudan eklenen *Bacillus subtilis*'e dayalı (Neutrase 0.5 L®, Novonordisk, Baegsuerd, Denmark) %1'lik ticari proteazla enzimatik hidrolize edilen saflandırılmıştır. Materyalin denatürasyonundan sonra (denatüre eden %500'lük banyo hacmi; başlangıç materyalinin kitlesine bağlıdır, 95°C'da 30 dakika boyunca denatüre eder), elde edilen düşük moleküler kitleli kolajen hidrolizatlarıyla uygun olarak sunulur. Buna rağmen, uzun tendonlar, yüksek elastin içeriğine rağmen; elastinden kolajen hidrolizatı yeteri kadar ayıran 40°C'lik bir reaksiyon ısısında 4 saatlik bir enzimatik hidrolizli sulu bir çevrede, az da olsa şişerler. Hidrolizin bitmesiyle beraber, proteaz inhibisyonu, çok az hidrojen peroksit damlası eklenerek korunur. Elastin tarafında şekillendirilen hidrolize olmamış solid faz, filtrasyonla ayrılır;

kolajen hidrolizat içeren sıvı faz; %10-15'lik kuru madde düzeyine kadar vakumla konsantre edilir ve laboratuvar sprey kurutucusunda toz haline getirilir (Laboratory Spray Dryer 0.8®, LabPlant, Huddersfield, UK).

Geçerli analizlerden ayrı olarak (Kjeldahl'dan sonra kuru madde, amid nitrojen'in belirlemesi); saflandırıcı banyonun kuru maddesiyle aynı şekilde lipoid maddelerin içeriği, bir özümseme işlemiyle çalışan toz kolajen hidrolizatta belirlendi (6,7) ve grup analizleri, önceden anlatılan TCL kromatografi tekniğiyle çalışılarak sunuldu (8).

Kolajen hidrolizatların ortalama moleküler kitlesi, dinitroflorobenzen (10) veya ninhidrin (11)'le polipeptid-NH<sub>2</sub> son gruplarının reaksiyon ürünlerinin UV spektrofotometrisiyle belirlendi (9). Bütün metodlar, gerçekte de eş sonuçlar verdi. Kolajen hidrolizatın saflağı; kolorimetre ile belirlenen hidroksiprolin içeriği sonuçlarıyla doğrulandı (10,12).

Başlangıç materyalinin kuru maddesiyle bağlantılı kolajen hidrolizat ürünü, %35 civarındaydı; kolajen hidrolizatın bulunan özellikleri Tablo 2'de gözden geçirilmiştir.

**Tablo 2.** Sığır uzun tendonlarının kollajen hidrolizat özellikleri

Özellikler	Test 1	Test 2
Kuru madde hidrolizat (gr)	164.4943	156.6922
Başlangıç materyali kuru maddesindeki hidrolizat ürünü	35.89	35.66
Kuru madde hidrolizattaki bulaşan maddeler		
Kuru madde hidrolizatın total lipoid maddeleri (%)	0.0040	0.0038
Total lipoid maddelerin lipoid fraksiyon bileşimi (%)		
Polar lipoidler (fosfolipidler, steroller vb.) (%)	6.90	7.80
Monoglisidler (%)	4.20	3.60
Diglisidler (%)	3.50	7.10
Triglisidler (%)	57.10	53.20
Serbest yağ asitleri (%)	29.80	27.10
Toplam belirlenen (%)	101.50	98.80
Glikozaminoglikanlar [(15)'e göre]	belirlenmedi	belirlenmedi
Aminosakkaridler [(16)'ya göre]	belirlenmedi	belirlenmedi
Kuru madde hidrolizattaki total proteinler (%)	99.98	99.98
Kuru madde hidrolizattaki amid nitrojen (%)	15.37	15.50
Başlangıç materyalinin nitrojen %'si	38.13	35.33
Kuru madde hidrolizattaki hidroksiprolin (%)	10.58	10.72
Hidrolizatın ortalama moleküler kütlesi (M <sub>N</sub> ) (kDa)	0.927	1.016
Ninhidrinle spektrofotometri [(9,10)'a bakınız]	0.830	1.206

### *Elastin hidrolizat*

Suda erimeyen (hidrolize olmayan) artık madde; filtrasyonla, reaksiyon karışımından izole edildi ve %1 hacim sikloheksilamin eklenmiş, alkalize %250'lik suda (başlangıç materyalinin kütlesiyle bağlantılı) dağıldı. Dağılımı 70°C'a ısıtarak, reaksiyon karışımına Alcalase 2.4 L® olarak tasarlanan (NovoNordisk, Baegsward, Denmark) bakteriyel orijinli (Bacillus licheniformis) ticari olarak geçerli endopeptidazdan %5 kantite eklendi. Anlamli bir hidroliz süresi için 5 saatlik bir periyod yeterliydi. Reaksiyon karışımını 5 dak. 95°C'da ısıtmakla endopeptidaz inaktivasyonu etkilendi.

Suda erimeyen artık fraksiyon (kuru madde içeriği, başlangıç materyalinin kuru maddesiyle bağlantılı olarak %3.5'a erişiyordu) filtrelendi, elastin hidrolizat solusyonu, 45°C'a erişmeyen bir ısıda yaklaşık %12'lik kuru madde konsantrasyonuna vakumla yoğunlaştırıldı ve son olarak bir laboratuvar sprey kurutucusunda kurutuldu. Toz elastin hidrolizat, kolajen hidrolizatla kullanılan metodlar uygulanarak özellik kazandı. Ürün ve elastin hidrolizat'ın ilgili özellikleri Tablo 3 verilerinde belirgindir. Tablo 1

ve 2'deki ürün verilerine dayanarak materyal dengesi kuru madde ve/veya amid nitrojenle ilgili yürürlükteki testlerle hesaplanabilir.

Test 1'deki kuru madde materyal dengesi bağlantıyla gösterilebilir:

$$30.793 \text{ g} + 164.943 \text{ g} + 211.465 \text{ g} + 10.231 \text{ g}$$

(saflaştırıcı (kolajen (elastin (Hidrolize banyo) hidrolizat) hidrolizat) olmamış artık)

$$= 417.432 \text{ g} (432.572)$$

Σ (başlangıç kantite ağırlık)

veya başlangıç materyalinin kuru madde yüzdesiyle gösterilebilir:

$$\%7.11 + \%38.13 + \%48.89 + \%2.36$$

$$= \%96.5 \text{ (başlangıç kuru maddesinden)}$$

Aynı testteki amid nitrojen dengesi şu bağlantıya yol açar:

$$3.338 \text{ g} + 27.018 \text{ g} + 35.992 \text{ g} + 1.656 \text{ g}$$

(saflaştırıcı (kolajen (elastin (hidrolize banyo) hidrolizat) hidrolizat) olmamış artık)

$$= 68.004 \text{ g} (66.486)$$

Σ (başlangıç materyalindeki nitrojen)

**Tablo 3.** Sığır uzun tendonlarının elastin hidrolizat özellikleri

Özellikler	Test 1	Test 2
Kuru madde hidrolizat (gr)	211.465	217.663
Başlangıç materyalindeki hidrolizat ürünü (%)	48.89	49.45
Bulaşanlar		
Kuru madde hidrolizattaki total lipoid maddeler (%)	0.0029	0.0026
Polar lipoidler (fosfolipoidler, steroidler vb.) toplamdaki (%)	3.80	4.30
Toplamdaki parsiyel gliseridleri (%)	belirlenmedi	belirlenmedi
Toplamdaki trigliseridler (%)	70.20	69.10
Toplamdaki serbest yağ asitleri (%)	23.70	24.70
Toplam (%)	97.80	98.10
Kuru madde hidrolizattaki protein bileşenleri (%)	99.97	99.97
Kuru madde hidrolizattaki amid nitrojen (%)	16.26	16.35
Kuru madde hidrolizattaki hidroksiprolin (%)	1.65	1.65
Hidrolizat ortalama moleküler kitle $M_N$ (kDa)		
Dinitroflorbenzen'le spektrofotometre [(9,11)'e bakınız]	0.487	0.775
Ninhidrin'le spektrofotometre [(9,10)'a bakınız]	0.448	0.826
Hidrolize olmamış artık madde		
Toplam kuru madde (gr.)	1.0231	1.5374
Başlangıç materyalindeki kuru madde %'si	2.36	3.49
Kuru maddedeki amid nitrojen (%)	16.19	15.99

yüzde oran olarak tanımlanması şöyle olur:

$$\%5.02 + \%40.64 + \%54.13 + \%2.49 = \%102.28$$

(başlangıç amid  $N_2$ 'den)

Benzer olarak, test 2'deki kuru maddedeki materyal dengesi şöyle tanımlanır:

$$35.617 \text{ g} + 156.922 \text{ g} + 213.957 \text{ g} + 15.374 \text{ g}$$

(saflaştırıcı (kolajen (elastin (hidrolize banyo) hidrolizat) hidrolizat) olmamış artık)

$$= 421.870 \text{ g} (440.080)$$

$\Sigma$  (başlangıç kuru madde)

veya yüzdelik oran olarak tanımlanırsa (başlangıç kuru maddesine bağlı):

$$\%8.09 + \%35.65 + \%48.62 + \%3.49$$

$$= \%95.8 \text{ (kuru maddeden başlayarak)}$$

Bu testteki amid nitrojen dengesi şu bağlantıyla tanımlanır:

$$3.5175 \text{ g} + 24.3170 \text{ g} + 35.581 \text{ g} + 2.460 \text{ g}$$

(saflaştırıcı (kolajen (elastin (hidrolize banyo) hidrolizat) hidrolizat) olmamış artık)

$$= 68.8755 \text{ g} (68.8285)$$

$\Sigma$  (başlangıç materyalindeki nitrojen)

veya yüzdelik oran olarak tanımlanırsa (başlangıç materyalindeki amid nitrojen'le bağlantılı):

$$\%5.11 + \%35.55 + \%51.70 + \%3.57 = \%95.71$$

## Tartışma

Et üretiminde küçük parçalara ayrılmış sığır uzun tendonları, noksan kullanılmış protein artıklarıdır. Bu gerçek; dominant protein içeriği elastinin dikkat çeken hidrofobik özelliğine ve kolajenle karşılaştırıldığında hidrolize yüksek rezistansına katkıda bulunur. Elastindeki esansiyel amino asitlerin düşük içeriği, uzun tendonlar için; gıda maddesi uygulamaları olasılıklarını istenmeyen şekilde eder (evcil hayvanlar için gıda karışımlarına elastin materyallerinin dahil edilmesi). Bu tip protein artığındaki farklılık bir dereceye kadar potansiyel biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin hazırlanmasında bulunabilir; bununla beraber böyle problemlerin çözümleri hala başlangıçtadır.

Uzun tendonların pratik kullanımına bakıldığında, bazı eski çalışmaların sonuçları

elastinin hidrolizatların yeniden dermo-yapılandırma aktivitesine dikkati çekecek kadar ilginçtir (özellikle düşük moleküler K-elastin gibi) (1). Bu bulgu sonradan; bu çeşit ekzogenetik polipeptidlerle stimule edilen fibroblast biyosentetik aktivitesinin önemli bir doğrulaması gibi kabul edilebilecek, kolajen fibrillerin renk veren bir modifikasyonu (orseinofili) elastin hidrolizatların cilde dağılımının gözlenmesi sonradan gerçekleştirildi (2). Diğer yandan yüksek moleküler elastik polipeptidlerle zar oluşturan cilt hidratantların fonksiyonu sağlandı ve agresif maddelere karşı saçın devam eden koruyucu etkisiyle, sadece saç bakımı için hazırlanan bileşimlerin saçla az veya çok selektif olarak ekstrakte edilebileceğinin gerçekçi görülebileceği gözönünde tutuldu. Günümüzde, böylece izafeten geniş pratik uygulama olasılıkları elastin hidrolizatları sunar (daha az kDa sırasına göre, özellikle ortalama moleküler kitleyle).

Elastin ve/veya hidrolizatlarının, prensip olarak herhangi bir pratik uygulamalarını gözönünde tutarken, saflaştırmanın ve eğer gerekirse sonradan hidrolizinin en basit olası yöntemidir. Günümüzdeki yöntemler, bir kural olarak tamamen isteme dayanır ve bu nedenle ticari olarak geçerli lipaz ve/veya proteazları kullanarak, kolajen ve elastin hidrolizatların olası kolay bir ayırımını yapacak sığır uzun tendonlarının, proteinlerinin temizlenmesi ve hidrolize olması için biyoteknolojik bir yöntem önerildi.

Uzun tendonların fibröz proteinlerini saflaştırırken, mikrobiyal orijinli lipaz kullanıma konu (*Aspergillus*). Yararı; tek bir operasyonda kolajen ve elastinden bulaşanların (lipoid maddeler, glikozamino-glikanlar ve/veya aminosakkaridler kadar mevcut globuler proteinler) kolay ayırımı ve düşük enerji istemidir.

Saflaştırma sırasında, lipoid özellikli maddelerle yaklaşık %40'lık bir seviye oluşturan

kuru maddenin yaklaşık %7-8 kitlesi kadar protein materyali kaybolur. Nötral lipidlerin iyi bir dağılımı için yeterli mevcut parsiyel gliseridlerle beraber, dominant içerik; serbest yağ asitlerini içerir. Bu; şu anda kullanılan temizleme yöntemlerinde bulunan nötral elektrolitlerin sulu solusyonlarıyla (glikozamino-glikan, amino-sakkarid ve diğer tip maddeleri uzaklaştırmak için) organik çözücülerin kombinasyonu ve temizlemedeki endüstriyel sürfaktanları uygulamanın gereğini, elimine eder. Temizlenme banyosunun kuru maddesinin yaklaşık %60'ını oluşturan nitrojenöz bileşimler, %15.0-15.3 amid nitrojen içerir. Bu değer, önceki yazarlarca yayınlanan [örnek (14)'e bakınız] globüler proteinlerdeki nitrojen içeriğini iyi şekilde doğrular. Bununla beraber, bu fraksiyonun yakın çalışması daha yönetilmemiştir.

Kolajen ve elastinin hidroliz rezistansındaki farklılık, uzun tendonların protein içeriklerinin kolay bir seçici enzimatik hidrolizini, iki basamakta gerçekleştirir. Kolajen hidrolizat; ılımlı reaksiyon şartları altında hareket eden bakteriyel orijinli (*Bacillus subtilis*) ticari bir proteazla elde edilebilir. Benzer bir yöntem; tabii ki hemen hemen saf kolajen içeren kesilmiş sığır kısa tendonlarının hidrolizinde; temel olarak kullanıldı.

Temizlenme banyosu için olasılıkla zayıfça kullanılabilen dominantların trigliserid olduğu sadece ortalama 39 ppm lipoid maddeleri (%35 oranında kuru maddeyle bağlantılı) içeren bir ürünle, kolajen hidrolizat elde edilir (uzun maddelerin kuru maddesine bağlı olarak). Kolajen hidrolizattaki hidroksiprolin içeriği ortalama %10.65 civarındadır (aynı temelle bağlantılı olarak) ve saf kolajen için (%10.75) teorik değeri düşüktür ama kolajen alkalin yöntemle yönlendirildiğinde (temizleme banyosu pH  $\cong$  10.7) dikkate alınmalıdır, deamidasyon, teorik içerik %15.35'e kadar azalacak şekilde kolayca oluşur. Elde edilen hidrolizatta glisidil-glukozaminler veya aminosakkaridleri belirleme

girişimleri başarısız olmuştur, böylece saflık iyi kabul edilir.

Hidrolizle dokunulmayan elastin bileşen, reaksiyon karışımından filtrasyonla kolayca ayrılabilir. İkinci basamaktaki hidrolizi, bakteriyel orijinli (*Bacillus licheniformis*) ticari bir endopeptidazı daha nisbeten şiddetli şartlarda uygulayarak yönlendirilmelidir. Beş saatlik hidrolizi izleyen suda erimeyen (hidrolize olmayan) artık madde, %3.5'a erişmez (başlangıç materyalinin kuru maddesi) ve filtrasyonla kolayca izole edilebilir.

Elastin hidrolizat ayrıca az miktarda lipoid madde içerir (kuru madde hidrolizat başına ortalama 27 ppm) ve başlangıç materyal saflaştırılması derecesinde lipoid maddelerin steril geçerliliğini kabul eden düşünceyi sağlayan trigliseridler bunların en yaygınıdır. Asparagin, glutamin ve/veya dahi arjinin elastinde kolajenden daha az yaygınlıkta bulunur ve böylece deaminidasyonun, hidrolizat'ta hidrokisprolin içeriği üzerindeki küçük etkisi devam eder. %1.65'lik bir deneysel değer (kuru madde hidrolizatı başına) aynı temele bağlantılı %2.02-%1.29 sınırlarında, bireysel yazarlara göre, teorik verilerle görüş birliği içindedir. Kolajen hidrolizatta elastin hidrolizatın kirlenmesi elimine edilir ve ne glikozil-glukozaminler veya ne de aminosakkaridler belirlenebilir, saflığının çok iyi olduğu düşünülür.

Büyük dağılma olmadan 1.0 kDa'luk bir değer çevresinde dalgalanma gösteren hidrolizatların ortalama moleküler kitlesi (sayısal olarak MN) kozmetik cilt bakım bileşimleri için kabul edilebilir sınırlar içindedir, ciltte iyi bir dağılım gösterdiği gibi diğer bileşimlerle de uyum içindedir.

Kolajen ve elastin hidrolizatlarla yapılan mikrobiyal testler, kozmetikte pratik uygulamalar için büyük önem taşır. Her iki hidrolizat içinde ham materyal olan sığır uzun tendonları gıda maddesi (et) üretiminde artık maddeler ve

mikrobiyal güvenilirlik testine maruz kalırlar (örneğin BSE testi içerir). Hidrolizatların mikrobiyal kontaminasyonu yakın olarak üretim donanımıyla bağlantılıdır ve laboratuvar üretim dereceleri için yapılan mikrobiyal test sonuçları endüstriyel üretim tam dereceleri için anlamlı olmayabilir. E.coli, streptococci, patojenik staphylococci, salmonellalar, pseudomonas fluorescens vb.'lerle kontaminasyon için yapılan mikrobiyal testler, bu nedenle yürütülmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Menasche M. Pharmaceutical studies on elastine peptides ( $\kappa$ -elastin): blood clearance, percutaneous penetration and tissues distribution. *Path Biol* 1981; 29:548-54.
2. Forlot P. Elastin in cosmetic formulations: hypotheses of action of its activity. *J Appl Cosm* 1985; 3:114-9. see also Martini MC, Seiller M (Coord). *Actifs et additives en cosmetologie*, Lavoisier-Tec Doc Paris 1992:107-8.
3. Langmaier F, Mladek M, and Kolomaznik K. Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins. *Int J Cosm Sci* 2001; 23:193-9.
4. Langmaier F, Mladek M, and Kolomaznik K. Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins: reaction conditions and the yield of enzymatic hydrolysis of short cattle tendons. *Int J Cosm Sci* 2001; 23:201-6.
5. Chvapil M. Industrial use of collagen. In: Parryand DA, Creamer K, eds. *Fibrous Proteins-Scientific, Industrial and Medical Aspects*. London: Academic Press, 1979; 10:247-69.
6. Hwang KT, and Regenstein JM. Characteristics of mackerel minced lipids hydrolysis. *J Food Sci* 1993; 58:79-82.
7. Ericson CM. Lipids extraction from channel muscle; composition solvent systems. *J Food Sci* 1993; 58:84-7.
8. Fried B. Lipids. In: Sherma J, and Fried B, eds. *Handbook of Thin Layer Chromatography*. New York: Dekker, 1991:593-8.
9. Rao CNR. *Ultraviolet and Visible Spectroscopy*. Chemical Applications. London: Butterworths, 1975:108-9.
10. Zweig G, and Sherma J, eds. *CRC Handbook Series in Chromatography, Section A*. Palm Beach, FL, USA: CRC Press Inc, 1978; 2:200-2.
11. Davidek J, Hrdlieka J, Karvanek M, Pokorny J, Seifert J, and Velisek J. *Laboratorni poirueka analyzy potravin*. Prague: SNTL, 1977:200-8.
12. Norme. AFNOR. *Collagenes-French Standard*. 1998:59-201.

13. Keller S, and Mandl L. Solubilized elastin as a substrate for elastase and elastase inhibitor determinations. *Biochem Med* 1971; 5:342-7.
14. Bienkiewicz K. *Physical Chemistry of Leather Making*. Malabar, FL, USA: RE Krieger Publishers Co, 1983:67.
15. Blazej A, Galatik A, Galatik J, and Mladek M. *Technologie kjuze a kozesin*. Praha: SNTL, 1984:134-9.
16. Wolf S. Einfache ind schnelle Methode zur Betsimmung des Proteoglykanes in Rohhauten und Blöben. *Leder* 1987; 38:245-8.
17. Waldi D, Saccharides. In: Stahl E, ed. *Thin Layer Chromatography*. Berlin: A Springer, 1965:466-9.

---

*\*Orijinal İngilizce şeklinden Türkiye Klinikleri tarafından tercüme edilmiştir. Türkçeye tercümesinin doğruluğundan Türkiye Klinikleri sorumludur, Blackwell Science Limited veya Society of Cosmetic Chemists sorumluluk kabul etmemektedir.*

*Translated by Türkiye Klinikleri Publishing House from the original English language version. Responsibility for the accuracy of the translation in the Turkish language rests solely with Türkiye Klinikleri Publishing House and is not the responsibility of Blackwell Science Limited or the Society of Cosmetic Chemists.*