



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 199 01 270 B4** 2007.09.13

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **199 01 270.9**
 (22) Anmeldetag: **15.01.1999**
 (43) Offenlegungstag: **07.10.1999**
 (45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **13.09.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C12P 19/04** (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 31/716 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(30) Unionspriorität:
98-10098 **24.03.1998** **KR**
98-49026 **16.11.1998** **KR**

(73) Patentinhaber:
Amorepacific Corp., Seoul/Soul, KR

(74) Vertreter:
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

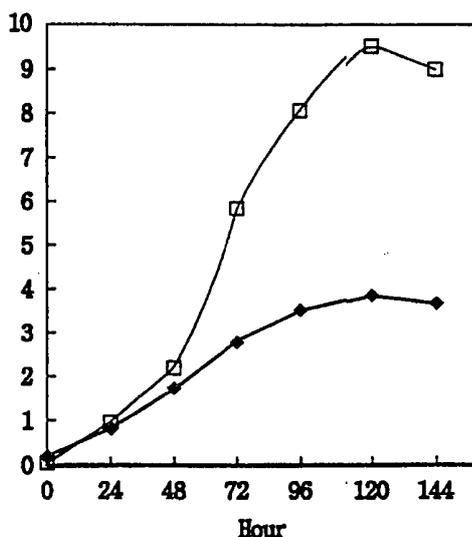
(72) Erfinder:
Park, Kyung Mok, Yongin, KR; Park, Byung Hwa, Anyang, KR; So, Sung, Suwon, KR; Kim, Mu Sung, Suwon, KR; Kim, Jung Su, Suwon, KR; Kim, Young Taek, Youngin, KR; Lee, Sung Gu, Youngin, KR; Lee, Dong Chul, Seoul/Soul, KR

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
DE 41 09 457 A1
FR 25 01 232 A1
US 49 60 697
WO 98/40 082 A1
Chemical Abstracts 121:299188;
Chemical Abstracts 119:224330;
Chemical Abstracts 115:6938;
Chemical Abstracts 113:76545;
Chemical Abstracts 112:137441;
Chemical Abstracts 108:109291;
Chemical Abstracts 74:61776;

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Flüssigkultivierung von Schizophyllum commune Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Flüssigkultivierung von Schizophyllum commune Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) Kultivierung der Myzelien von Schizophyllum commune Fr. über zwei bis vier Tage in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 4,0 bis 8,5, das 1 bis 10 Gew.-% Glucose, 0,1 bis 1 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 bis 0,5 Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-% KH_2PO_4 und 0,005 bis 0,2 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält;
- (2) Zugabe von Aktivkohle in das Flüssigmedium in einer Menge von 0,1 bis 5 % und Kultivierung für weitere ein bis vier Tage;
- (3) Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium; und
- (4) Reinigung des β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucans.



Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1) Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Flüssigkultivierung von *Schizophyllum commune* Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan.

2) Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Die Haut hat gegen Einflüsse aus der Umgebung wie Temperatur oder Feuchtigkeit, ultraviolette Strahlung, giftige Substanzen eine Schutzfunktion. Jedoch kann die normale Funktion der Haut durch, übermäßige physikalische oder chemische Reizung oder Nährstoffmangel beeinträchtigt sein, was Hautalterung und Hautschäden verursacht. Deshalb wurden im Bereich der Kosmetik physiologisch aktive Materialien, die aus Tieren, Pflanzen oder Mikroorganismen gewonnen werden, als kosmetischer Bestandteil verwendet, um die Haut durch Verhindern dieser Hypergasia schön und gesund zu erhalten.

[0003] Zum Beispiel wurde berichtet, dass Pilzextrakte die Fähigkeit zur Feuchtigkeitsspeicherung, zur Verhinderung der Melaninbildung und zur Abschirmung von UV-Strahlung haben und dadurch in einer kosmetischen Zusammensetzung verwendet werden können, um einen Hautaufhellungseffekt oder eine Anti-Oxidationswirkung zu bewirken. Insbesondere wurde ein Extrakt von *Schizophyllum commune* Fr., der hervorragende Hautaufhellungswirkung und Feuchtigkeitsspeicherungseffekt bewirkt, in JP-5-286-843A offenbart.

[0004] Seine wirksame Komponente wurde jedoch noch nicht aufgeklärt. Dies bedeutet, dass weitere Forschungsarbeiten zur Aufklärung, welche Komponente des Extrakts von *Schizophyllum commune* Fr. effektiv auf die Haut wirken kann, nötig sind. Solche weiteren Forschungsarbeiten können Verfahrensverbesserungen zur effektiven Gewinnung von reinen aktiven Bestandteilen einschließen.

[0005] Deshalb haben die hier beteiligten Erfinder umfangreiche Arbeiten durchgeführt, um die aktiven Bestandteile des Extrakts von *Schizophyllum commune* Fr., die effektiv auf die Haut wirken, aufzuklären. Als ein Ergebnis haben sie gefunden, dass β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan, das durch die Flüssigkultivierung von *Schizophyllum commune* Fr. gewonnen wurde, die Melaninbildung inhibieren kann, die Biosynthese von Hautzellen und Kollagen fördern kann und durch übermäßige Sonneneinwirkung hervorgerufene Verbrennungen heilen kann.

[0006] Weiter haben sie gefunden, dass durch Zusatz von Aktivkohle oder Glucose zum Flüssigmedium die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan gesteigert werden kann. Ebenso haben sie gefunden, dass durch Zusatz von sowohl Aktivkohle als auch Glucose zum Flüssigmedium die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan weiter gesteigert werden kann.

[0007] Aus Chemical Abstracts 74: 61776 ist ein von *Schizophyllum commune* in Flüssigkultur produziertes extrazelluläres Polysaccharid mit dem Namen Schizophyllan bekannt, das durch Alkohol-fällung aus dem Filtrat gewonnen wird. Bei dem bekannten extrazellulären Polysaccharid handelt es sich um ein einfaches Glucan, das über β -1,3 und β -1,6 glycosidische Bindungen aufgebaut ist.

[0008] Aus Chemical Abstracts 108: 109 291 ist ebenfalls ein von *Schizophyllum commune* Fr. in Flüssigkultur produziertes Polysaccharid bekannt. Dabei wird insbesondere die Bildung des Polysaccharids unter Verwendung verschiedener Stämme von *Schizophyllum commune* und unterschiedlichen Kulturbedingungen untersucht.

[0009] Aus Chemical Abstracts 121: 299 188 sind ebenfalls von *Schizophyllum commune* produzierte Exopolysaccharide bekannt.

[0010] Aus Chemical Abstracts 112: 137 441 sind die von *Schizophyllum commune* und *Sclerotium Rolfsii* produzierten Polysaccharide Schizophyllan und Scleroglucan bekannt. Dabei werden optimale Fermentationsbedingungen sowie die pH-Stabilität der beiden Polysaccharide beschrieben. Eine Verbesserung der Fermentationsbedingungen und eine Verbesserung der Stabilität werden hierbei nicht diskutiert.

[0011] Aus Chemical Abstracts 113: 76 545 ist die Kultivierung von *Schizophyllum commune* und *Sclerotium*

glucanicum in Bioreaktoren unter verschiedenen Bedingungen bekannt.

[0012] Aus Chemical Abstracts 115: 6938 ist die Herstellung von mikrobiellen Polysacchariden durch das Schizophyllum commune ATTC 38548 bekannt. Dabei wird die Auswirkung des partiellen Drucks in der Flüssigphase und das Unterbinden einer Pelletbildung durch Verwendung einer Zahnradschlepppumpe auf das Wachstum von Schizophyllum commune ATTC 38548 und die Produktion des Schizophyllans untersucht.

[0013] Aus Chemical Abstracts 119: 224 330 ist die Verbesserung der Wachstumsbedingungen des Schizophyllum commune ATTC 38548 unter Verwendung von Sensoren bekannt, die den Kultivierungsprozess analysieren.

[0014] Aus der DE 41 09 457 A1 ist ein Verfahren zur extrazellulären Herstellung von Homopolysacchariden unter Verwendung von unterschiedlichen Pilzstämmen bekannt. Dabei werden im Konkreten mittels Kreuzungsverfahren neue Mikroorganismen hergestellt, um die hochmolekularen ungeladenen Homopolysaccharide herzustellen. Als Kulturmedium wird hierbei ein Glucose-Hefeextrakt-Salz-Medium eingesetzt.

[0015] Aus der US 4 960 697 sind Isolierungs- und Reinigungsmethoden für Glucane, unter anderem für die von Schizophyllum commune produzierten Glucane, durch Zugabe eines zweiwertigen Kations und Präzipitation mit einem Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel bekannt. Das Abfangen der Glucane oder von Stoffen durch Adsorption an Aktivkohle aus dem Kulturmedium, welche das Wachstum der Myzelien inhibieren, ist aus dieser Druckschrift nicht bekannt.

[0016] Aus der WO 98/40082 A1 ist die Verwendung eines Glucans in Zusammensetzungen zur therapeutischen Hautbehandlung bekannt. Ein Verfahren zur Flüssigkultivierung von Schizophyllum commune Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan ist aus der Entgegenhaltung nicht bekannt.

[0017] Aus der FR 2 501 232 A1 ist des Weiteren die Verwendung von β -Glucanen aus Schizophyllum commune in Arzneimitteln bekannt.

Zusammenfassung der Erfindung

[0018] Demgemäß ist es eine Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Flüssigkultivierung von Schizophyllum commune Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan zur Verfügung zu stellen, mit dem ein besonders hoher Ertrag des Glucans erzielt werden kann.

[0019] Erfindungsgemäß wird die voranstehende Aufgabe alternativ durch Verfahren gemäß den Patentansprüchen 1, 2 oder 3 gelöst.

[0020] Gemäß Patentanspruch 1 ist ein Verfahren der eingangs genannten Art mit den folgenden Schritten angegeben:

- (1) Kultivierung der Myzelien von Schizophyllum commune Fr. über zwei bis vier Tage in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 4,0 bis 8,5, das 1 bis 10 Gew.-% Glucose, 0,1 bis 1 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 bis 0,5 Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-% KH_2PO_4 und 0,005 bis 0,2 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält;
- (2) Zugabe von Aktivkohle in das Flüssigmedium in einer Menge von 0,1 bis 5 % und Kultivierung für weitere ein bis vier Tage;
- (3) Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium; und
- (4) Reinigung des β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucans.

[0021] Gemäß Patentanspruch 2 ist ein Verfahren der eingangs genannten Art mit den folgenden Schritten angegeben:

- (1) Kultivierung der Myzelien von Schizophyllum commune Fr. über drei bis fünf Tage in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 4,0 bis 8,5, wobei das Medium 1 bis 3 Gew.-% Glucose, 0,3 bis 0,5 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 bis 0,5 % Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-% KH_2PO_4 und 0,005 bis 0,2 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält;
- (2) Zugabe von Glucose in das Flüssigmedium in einer Menge von 1 bis 10 % und Kultivierung für weitere ein bis drei Tage;
- (3) Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium; und
- (4) Reinigung des β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucans.

[0022] Gemäß Patentanspruch 3 ist ein Verfahren der eingangs genannten Art mit den folgenden Schritten angegeben:

- (1) Kultivierung der Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. über drei bis fünf Tage in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 4,0 bis 8,5, wobei das Medium 1 bis 3 Gew.-% Glucose, 0,3 bis 0,5 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 bis 0,5 % Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-% KH_2PO_4 und 0,005 bis 0,2 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält;
- (2) Zugabe von 0,1 bis 5 % Aktivkohle und von 1 bis 10 % Glucose in das Flüssigmedium und Kultivierung für weitere ein bis fünf Tage;
- (3) Isolierung von β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium; und
- (4) Reinigung des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans.

Beschreibung der Zeichnungen

[0023] [Abb. 1](#) ist ein Graph, der das Wachstum der Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. (◆) und die hergestellte Menge von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan (□) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer zeigt.

[0024] [Abb. 2](#) ist ein Infrarot-Absorptionsspektrum von mit dem vorliegenden Verfahren gewonnenen β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan.

[0025] [Abb. 3](#) ist ein kernmagnetisches Resonanzspektrum von mit dem vorliegenden Verfahren gewonnenen β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan.

[0026] [Abb. 4](#) ist ein Graph, der das Wachstum der Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. (◆) und die hergestellte Menge von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan (□) in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, bei dem Verfahren, das einen zweiten Kultivierungsschritt unter Zugabe von sowohl Aktivkohle als auch Glucose in das flüssige Medium, umfasst, zeigt.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0027] *Schizophyllum commune* Fr. ist ein holzersetzender Pilz, der in der Klassifizierung durch R. Singer (The Agaricales in Modern Taxonomy, 1975) zu den Agaricales Tricholomataceae *Schizophyllum* der Basidiomyceten gehört und in das Extrazelluläre β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan absondert. Er kann wild wachsend gesammelt werden und anhand der folgenden morphologischen oder taxonomischen

[0028] Eigenschaften identifiziert werden:

Sein Fruchtkörper ist 1.0 bis 3.0 Zentimeter groß, er ist ungestielt mit einer muschelartigen Form mit länglichen Lamellen und haarbesetzten Rändern. Die Lamellen sind weiß, werden aber bei Reifung leicht grau oder leicht purpurbraun. Sein Fleisch neigt dazu, runzlig zu werden, lebt aber durch Feuchtigkeitsaufnahme wieder auf. Das Sporenpulver ist weiß. Die Sporen haben zylindrische Form mit einer Größe von $4 \times 1.5 \mu\text{m}$ bis $6 \times 2 \mu\text{m}$ und sind glatt und weiß. *Schizophyllum commune* Fr. steht in Gruppen auf totem Holz oder Hartholzstämpfen. Sein Vorkommen und seine Form sind ausführlicher im „Illustrated Book of Korean Fungus“ (Sam Soon KIM et al., YooPong Press, 1990) und in „The Agaricales in Modern Taxonomy“ (Singer, R., 1975) beschrieben.

[0029] Glucosebindungen vom β -Typ wie β -1,3-Bindungen, β -1,4-Bindungen, β -1,6-Bindungen werden im Allgemeinen, ohne spezielle Unterscheidung, als β -Glucan bezeichnet. Die Bindungsart ist aber tatsächlich sehr von ihrer Herkunft abhängig und kann unterschiedliche physikalische oder chemische Eigenschaften und biologische Funktion aufweisen. Das heißt, dass β -Glucan in Abhängigkeit von seiner Herkunft unterschiedliche Zusammensetzung der es aufbauenden Zucker, Verzweigungsgrad, Molekulargewicht oder 3-D-Struktur aufweist. Beispielsweise wird das β -Glucan aus *Ganoderma lcidum* hauptsächlich aus der Zellwand und in untergeordnetem Maße aus dem Extrazellulären isoliert und weist eine Bindung aus Glucose, Mannose und Galactose auf. Das β -Glucan von *Coriolus versicolor* wird im Wesentlichen aus der Zellwand isoliert und weist β -1,3-Bindungen und β -1,4-Bindungen auf. Das β -Glucan von *Lentinus edodes* wird aus der Zellwand isoliert und ist β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan mit zwei β -1,6-Bindungen, die zu jeder fünften β -1,3-Bindung der Hauptkette verzweigt sind. Das β -Glucan von *Pleurotus ostrealus* wird aus der Zellwand isoliert und weist eine Bindung aus Glucose, Mannose und Galactose auf. Das β -Glucan von *Phellinus linteus* wird aus der Zellwand isoliert und hat eine Bindung aus 70 bis 90% Glucose, und Mannose und Galactose. Weiterhin wird das β -Glucan von *Saccharomyces cerevisiae* aus der Zellwand isoliert und hat eine heterogene Bindung mit wenig Verzweigungen und ist damit unlöslich.

[0030] Das erfindungsgemäß aus *Schizophyllum commune* Fr. isolierte β -Glucan wurde dagegen als homo-

genes β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan identifiziert, das zu jeder dritten β -1,3-Bindung der Hauptkette verzweigte β -1,6-Bindungen aufweist und nur aus Glucose zusammengesetzt ist, mit einem Molekular von 2 000 000 bis 5 000 000. Es wird aus dem Extrazellulären gewonnen und hat die Eigenschaften eines stabilen neutralen Polysaccharids.

[0031] Das Verfahren zur Flüssigkultivierung von *Schizophyllum commune* Fr. zur Gewinnung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan wird ausführlicher beschrieben.

[0032] (1) Schritt zur Herstellung von Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr.;
Die Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. können durch Kultivierung von Sporen wildwachsender *Schizophyllum commune* Fr. hergestellt werden.

[0033] Genauer gesagt werden die Sporen von wildwachsenden *Schizophyllum commune* Fr. nach einigen Malen Waschen mit destilliertem Wasser, auf einem Hefe-Malzextrakt-Agarmedium (3g Hefeextrakt, 3g Malzextrakt, 5g Pepton, 10g Glucose, 15g Agar, 1 L destilliertes Wasser) angeimpft und 7 Tage bei einer Temperatur von 24 °C zur Erzeugung von Myzelien gehalten. Die erzeugten Myzelien werden schräg in Reagenzgläsern kultiviert, die das selbe Hefe-Malzextrakt-Agarmedium enthielten, und dann bei einer Temperatur von 4 °C gehalten, um monatlich übergangskultiviert zu werden.

[0034] (2) Schritt zur Kultivierung der Myzelien in einem flüssigen Medium;
Die Myzelien werden aseptisch homogenisiert und anschließend in einer Menge von 0.00001 bis 10 Vol.-%, vorzugsweise 3 Vol.-% in einem flüssigen Medium mit einem pH-Wert von 4.0 bis 8.5, vorzugsweise mit einem pH-Wert von 6.5 angeimpft, das 1 bis 10 Gew.-%, vorzugsweise 3 Gew.-% Glucose, 0.1 bis 1 Gew.-%, vorzugsweise 0.3 Gew.-% Hefeextrakt, 0.05 bis 0.5 %, vorzugsweise 0.05 Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-%, vorzugsweise 0.1 Gew.-% KH_2PO_4 und 0.005 bis 0.2 Gew.-%, vorzugsweise 0.05 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ enthält.

[0035] Anschließend wird die Flüssigkultivierung der Myzelien durch Halten des Mediums auf einer Temperatur von 20 bis 35 °C, vorzugsweise 28 °C, unter Rühren mit 100 bis 400 UpM, vorzugsweise 200 UpM und einer Belüftung von 0.3 bis 2 VVM, vorzugsweise 1 VVM, in einem Fermentationstank für drei bis sieben Tage, vorzugsweise fünf Tage durchgeführt.

[0036] Der in [Abb. 1](#) dargestellt Graph zeigt, dass die Produktivität zu β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan nach zwei Tagen Kultivierung ansteigt und bei einer Kultivierung über fünf Tage das Maximum erreicht. Es ist verständlich, dass die Kultivierung über die ersten beiden Tage dem Wachstum der Myzelien dient und die anschließende Kultivierung der Herstellung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan. Weiterhin kann im späteren Teil der Kultivierung β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan in gewissem Maße zersetzt werden. Deshalb wird die Kultivierung vorzugsweise über fünf Tage durchgeführt.

[0037] (3) Schritt zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium;
 β -1,6-Verzweigtes- β -1,3-Glucan kann mittels Adsorption an Aktivkohlepulver isoliert werden. Genauer gesagt wird das Aktivkohlepulver nach Abschluss der Kultivierung in das Flüssigmedium in einer Menge von 0.1 bis 6%, vorzugsweise 1%, zugegeben, und anschließend wird die Mischung gerührt um unnötige Bestandteile wie Pigmente und Proteine zu entfernen. Anschließend wird die Mischung durch eine Filterpresse filtriert, um eine β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan enthaltende Lösung zu ergeben. Zu diesem Zeitpunkt kann die Adsorption mit dem Aktivkohlepulver nach der Filtration mit einer Filterpresse durchgeführt werden.

[0038] (4) Schritt der Reinigung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan;
Die Reinigung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan kann durch Fällung mit Ethylalkohol durchgeführt werden.

[0039] Genauer gesagt wird die erhaltende Lösung mittels Filtern mit Membranen mit Mikroporen von 1 μm und 0.45 μm feinfltriert, um entfärbtes oder schwach braunes Filtrat zu ergeben. Dem Filtrat wird Ethylalkohol zugesetzt, um β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan auszufällen. Zur Reinigung des β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucans kann die Fällung mit Ethylalkohol zwei bis fünf Mal wiederholt werden. Die Menge des zuzusetzenden Ethylalkohols liegt vorzugsweise im Bereich des drei- bis vierfachen Volumens, vorzugsweise des 3.5-fachen Volumens des Filtrats und kann bei Wiederholungen der Fällung mit Ethylalkohol verringert werden.

[0040] Wenn die Fällung mit Ethylalkohol zwei Mal oder häufiger wiederholt wird, kann die bei der letzten Fällung zugesetzte Menge Ethylalkohol dem Volumen des vorherigen Filtrats entsprechen.

[0041] Die Niederschläge werden anschließend gewonnen und bei einer Temperatur von 20 bis 100 °C mit heißer Luft getrocknet, um flüchtige Verbindungen wie Ethylalkohol zu entfernen. Abschließend kann das Produkt bei einer Temperatur von -70 °C gefriergetrocknet und anschließend gemahlen werden, um β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan in Pulverform zu ergeben.

[0042] Wie [Abb. 1](#) entnommen werden kann, können einige Stoffe, die β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan zersetzen und das Wachstum der Myzelien inhibieren, neben β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan als Nebenprodukte gebildet werden. Diese Stoffe werden als endo-1,3- β -Glucanase und FIS (Fruchtbildungsinduzierende Substanz, Fruiting Inducing Substance) identifiziert. Endo-1,3- β -Glucanase (Prokop et al., 1994, Can. J. Microbiol. Rev. Band. 40, Nr. 1, Seite 18) kann β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan zersetzen und so die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan verringern. Und die FIS, beispielsweise (4E,8E)-N-D-2'-Hydroxipalmitoyl-1-O- β -D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienin und (4E,8E)-N-D-2'-Hydroxistearoyl-1-O- β -D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienin (Mizushina et al., 1998, Biochem. Biophys. Res. Commun. Band 249, Seite 17) kann das Wachstum der Myzelien inhibieren und so die Produktivität zu β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan verringern (Wessels, 1978. Genetics and Morphogenesis in the Basidiomycetes, Seiten 81 bis 104, Academic Press; Prokop et al., 1992, Experimental Mycology, Band 16, Seiten 197 bis 206). Es wurde berichtet, dass diese Nebenprodukte im späteren Teil der Kultivierung von *Schizophyllum commune* Fr. hergestellt werden.

[0043] Deshalb haben die hier beteiligten Erfinder weitere Arbeiten durchgeführt, um diese Nebenprodukte zu entfernen und dadurch die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan zu erhöhen. Als ein Ergebnis fanden sie, dass diese Aufgabe durch Zugabe von Aktivkohle in das Flüssigmedium während des Kultivierungsschritts (2) gelöst werden kann. Dies bedeutet, dass die Nebenprodukte mittels Adsorption an Aktivkohle ohne jeden negativen Einfluss auf das Wachstum der Myzelien und die Herstellung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan entfernt werden können.

[0044] Die Zugabe der Aktivkohle wird nach einer Kultivierung über zwei bis vier Tage durchgeführt und zwar in einer Menge von 0.1 bis 5 %. Nach der Zugabe wird die Kultivierung für weitere ein bis vier Tage fortgesetzt.

[0045] Die Zugabe von Aktivkohle kann die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan um etwa 30 % erhöhen.

[0046] Daneben kann die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan durch Zufuhr von Glucose während der Kultivierung zur Herstellung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan weiter erhöht werden.

[0047] Genauer gesagt kann ein großes C/N-Verhältnis die Produktivität zu β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan verbessern, während ein kleines C/N-Verhältnis das Wachstum der Myzelien fördert. Deshalb kann in der vorliegenden Erfindung das Flüssigmedium durch eine Verringerung der ursprünglichen Menge an Kohlenstoffquelle, beispielsweise 1 bis 3 % Glucose und 0.3 bis 0.5 % Hefeextrakt während der Kultivierung zum Wachstum der Myzelien auf ein vergleichsweise kleines C/N-Verhältnis, aber durch Zufuhr von Glucose während der Kultivierung zur Herstellung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan auf ein vergleichsweise großes C/N-Verhältnis eingestellt werden. Die Zugabe von Glucose wird vorzugsweise dann vorgenommen, wenn die Bildung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan rasch ansteigt oder das Wachstum der Myzelien langsamer wird, das heißt nach einer Kultivierung über drei bis fünf Tage, in einer Menge von 1 bis 10 %. Nach der Zugabe kann die Kultivierung für weitere ein bis drei Tage fortgesetzt werden. Die Glucosezugabe kann die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan um ungefähr 38% steigern.

[0048] Weiterhin kann die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan zusätzlich durch die Zugabe von sowohl Aktivkohle als auch Glucose in das Flüssigmedium weiter gesteigert werden. Die Zugabe wird nach einer Kultivierung über drei bis fünf Tage vorgenommen. Das ursprüngliche Medium enthält vorzugsweise 1 bis 3 % Glucose und 0.3 bis 0.5 % Hefeextrakt als Kohlenstoffquelle, um das C/N-Verhältnis zu verkleinern. Die Mengen an zuzugebender Aktivkohle und Glucose sind vorzugsweise 0.1 bis 5 % und 1 bis 10 %, respektive.

[0049] Nach der Zugabe kann die Kultivierung für weitere ein bis fünf Tage fortgesetzt werden. Die Zugabe kann die Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan um ungefähr 60 % steigern.

[0050] Der in [Abb. 4](#) gezeigte Graph lehrt, dass die Produktivität an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan nach einer Kultivierung über zwei Tage ansteigt und bei Kultivierung über sechs Tage das Maximum erreicht. Es ist verständlich, dass die Zugaben von Aktivkohle und Glucose die Produktivität steigern und den Produktionszeitraum verlängern, was zu einer Steigerung der Ausbeute an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan führt.

[0051] Das mit dem obigen Verfahren gewonnene β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan kann, wie in den folgenden experimentellen Beispielen gezeigt, die Biosynthese von Hautzellen und Kollagen fördern, durch übermäßige Sonneneinwirkung verursachte Verbrennungen heilen und die Melaninbildung inhibieren.

[0052] Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann die vorliegende Erfindung eine β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan als aktiven Bestandteil enthaltende Zusammensetzung zur äußerlichen Anwendung zur Verfügung stellen. Die Zusammensetzung kann die Hautalterung verzögern, einen hautaufhellenden Effekt bewirken und effektiv Hautschäden heilen. Die Zusammensetzung kann β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan in einer Menge von 0.00001 bis 10 Gew.-% enthalten, wobei die Menge in Abhängigkeit von den Formulierungen oder den letztendlichen Zwecken der Zusammensetzung gewählt werden kann. Weiterhin kann die Zusammensetzung zur äußerlichen Anwendung zu Kosmetika wie Hautweichmachern, Nähr-Toilettenwassern, Massagecremes, Nährcremes, Packungen und Gelen, und Hautarzneimitteln wie Lotionen, Salben, Gelen, Cremes, Pflastern oder Sprays formuliert werden, ist aber nicht darauf beschränkt. Weiterhin können die Zusammensetzungen andere Bestandteile enthalten, die üblicherweise verwendet werden und in Abhängigkeit von der Formulierung gewählt werden können.

Bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung

[0053] Die vorliegende Erfindung wird mittels der folgenden Beispiele ausführlicher dargestellt. Diese Beispiele werden jedoch nur zum Zwecke der Darstellung aufgeführt und sollten nicht als Beschränkung des Bereichs der Erfindung ausgelegt werden, der eigentlich in den begleitenden Ansprüchen skizziert ist.

Zubereitung 1

[0054] Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. wurden in Reagenzgläsern, die Hefe-Malzextrakt-Agarmedium, (3g Hefeextrakt, 3g Malzextrakt, 5g Pepton, 10g Glucose, 15g Agar, 1 L destilliertes Wasser) enthalten, schräg kultiviert, und dann aseptisch homogenisiert. Anschließend wurden die Myzelien in einer Menge von 3 Vol.-% in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 6.5, das 3 Gew.-% Glucose, 0.3 Gew.-% Hefeextrakt, 0.05 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.1 Gew.-% KH_2PO_4 und 0.05 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält, angeimpft. Die Flüssigkultivierung. Die Flüssigkultivierung wurde durch Halten des Mediums auf einer Temperatur von 28 °C, unter Rühren mit 200 UpM, und einer Belüftung von 1 VVM, in einem 30 L-Fermentationstank über fünf Tage durchgeführt. Nach Beendigung der Kultivierung war die Konzentration der Myzelien ungefähr 4.0 g/L, und die Konzentration an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan war ungefähr 9.5 g/L (siehe [Abb. 1](#)).

[0055] Anschließend wurde dem Flüssigmedium Aktivkohlepulver (Jeil Chemical Co., Ltd., Korea) in einer Menge von 1.0 % zugegeben, und dann wurde die Mischung 30 Minuten lang gerührt. Anschließend wurde die Mischung in einer Filterpresse abfiltriert, um eine β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan enthaltende Lösung zu ergeben.

[0056] Die Lösung wurde erneut filtriert, wobei die Filter Membranmikroporen von 1 μm und 0.45 μm in dieser Reihenfolge aufwiesen, um ein entfärbtes oder hellbraunes Filtrat zu ergeben. Dem Filtrat wurde das 3.5-fache Volumen Ethylalkohol zugesetzt, und anschließend wurde die Mischung zur Fällung über Nacht bei Raumtemperatur gehalten. Der Niederschlag wurde gewonnen und in destilliertem Wasser aufgelöst, um eine Lösung mit einem dem des vorhergehenden Filtrats äquivalenten Volumens zu ergeben. Dieser Lösung wurde das zweifache Volumen Ethylalkohol zugesetzt und anschließend wurde die Mischung zur Fällung über Nacht bei Raumtemperatur gehalten. Der Niederschlag wurde wiederum gewonnen und in destilliertem Wasser aufgelöst, um eine Lösung mit einem dem des vorhergehenden Filtrats äquivalenten Volumen zu ergeben. Dieser Lösung wurde ein äquivalentes Volumen Ethylalkohol zugesetzt, und anschließend wurde die Mischung zur Fällung über Nacht bei Raumtemperatur gehalten. Anschließend wurde der Niederschlag gewonnen und bei 80 °C in erwärmter Luft getrocknet. Abschließend wurde das Produkt bei -70 °C gefriergetrocknet und dann in einer Mühle gemahlen, um das Pulver zu ergeben.

[0057] Die Pulververbindung wurde mittels eines Infrarot-Spektrophotometers (Biorad FTS-40) und einem Kernmagnetischen Resonanz-Spektrophotometers (Varian Gemini-2000, 300 MHz, FT-NMR) identifiziert. Die Ergebnisse sind in den [Abb. 2](#) und [Abb. 3](#), respektive, dargestellt. In [Abb. 2](#) wird bei 889.4 nm das β -Anomer bestätigt, was zeigt, dass die Verbindung hauptsächlich β -Glucan ist, und in [Abb. 3](#) wird bestätigt, dass diese Verbindung eine homogene Struktur aufweist, bei der eine β -1,6-D-Glucose zu jeder dritten β -1,3-D-Glucose verzweigt ist.

[0058] ^{13}C -NMR (ppm): C-6 (61.15), C-4 (68.58), C-6 (70.25), C-2 (72.74), C-2 (73.80), C-3 (74.81), C-5

(76.40), C-3 (86.44), C-1 (103.11).

[0059] Weiterhin wurde die Reinheit des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans mit einem BGSTER A Test gemessen, der die Reaktion von Amöbozytenlysate von Schwertschwanz und β -Glucan (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) verwendet. Er ergab eine Reinheit dieser Verbindung von 99.2%.

Zubereitung 2

[0060] Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. wurden nach aseptischer Homogenisierung in einer Menge von 3 Vol.-% in ein Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 6.5, das 3 Gew.-% Glucose, 0.3 Gew.-% Hefeextrakt, 0.05 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 Gew.-% KH_2PO_4 und 0.05 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält, angeimpft. Die Flüssigkultivierung wurde durch Halten des Mediums auf einer Temperatur von 28 °C, unter Rühren mit 200 UpM, und einer Belüftung von 1 VVM, in einem 30 L-Fermentationstank über drei Tage durchgeführt. Dann wurden dem Medium Aktivkohlepulver (Jeil Chemical Co., Ltd. Korea) in einer Menge von 0.5 % zugegeben, und dann wurde die Kultivierung für weitere drei Tage bei denselben Bedingungen fortgesetzt. Nach Beendigung der Kultivierung betrug die Konzentration der Myzelien ungefähr 3.8 g/L und die Konzentration an β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucan ungefähr 12.3 g/L.

[0061] Anschließend wurde die Kultur in einer Filterpresse abfiltriert und dann wurden Aktivkohlepulver (Jeil Chemical Co., Ltd., Korea) in einer Menge von 0.5 % zugesetzt. Anschließend wurde die Mischung 30 Minuten lang gerührt.

[0062] Danach wurde zur Reinigung des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans der für Zubereitung 1 beschriebenen Vorgehensweise gefolgt.

[0063] Das erhaltene Produkt wurde als β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan mit einer gemessenen Reinheit von 99.5 % identifiziert.

Zubereitung 3

[0064] Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. wurden nach aseptischer Homogenisierung in einer Menge von 3 Vol.-% in ein Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 6.5, das 2 Gew.-% Glucose, 0.4 Gew.-% Hefeextrakt, 0.05 % $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.1 Gew.-% KH_2PO_4 und 0.05 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält, angeimpft. Die Flüssigkultivierung wurde durch Halten des Mediums auf einer Temperatur von 28 °C, unter Rühren mit 200 UpM, und einer Belüftung von 1 VVM, in einem 30 L-Fermentationstank über vier Tage durchgeführt. Dann wurde dem Medium Glucose in einer Menge von 0.3 % zugegeben, und dann wurde die Kultivierung für weitere zwei Tage bei denselben Bedingungen fortgesetzt. Nach Beendigung der Kultivierung betrug die Konzentration der Myzelien ungefähr 4.5 g/L und die Konzentration an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan ungefähr 13.1 g/L.

[0065] Anschließend wurde zur Isolierung und Reinigung des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans der für Zubereitung 1 beschriebenen Vorgehensweise gefolgt.

[0066] Das erhaltene Produkt wurde als β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan mit einer gemessenen Reinheit von 99.4 % identifiziert.

Zubereitung 4

[0067] Myzelien von *Schizophyllum commune* Fr. wurden nach aseptischer Homogenisierung in einer Menge von 3 Vol.-% in ein Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 6.5, das 2 Gew.-% Glucose, 0.4 Gew.-% Hefeextrakt, 0.05 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1 Gew.-% KH_2PO_4 und 0.05 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält, angeimpft. Die Flüssigkultivierung wurde durch Halten des Mediums auf einer Temperatur von 28 °C, unter Rühren mit 200 UpM, und einer Belüftung von 1 VVM, in einem 30 L-Fermentationstank über vier Tage durchgeführt. Dann wurden dem Medium 0.5 Aktivkohle und 3 % Glucose zugegeben, und dann wurde die Kultivierung für weitere zwei Tage bei denselben Bedingungen fortgesetzt. Nach Beendigung der Kultivierung betrug die Konzentration der Myzelien ungefähr 4.5 g/L und die Konzentration an β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan ungefähr 15.1 g/L (siehe [Abb. 4](#)).

[0068] Anschließend wurde zur Isolierung und Reinigung des β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucans der für Zubereitung 1 beschriebenen Vorgehensweise gefolgt.

[0069] Das erhaltene Produkt wurde als β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan mit einer gemessenen Reinheit von 99.6 % identifiziert.

Experimentelles Beispiel 1: Proliferation von Fibroblasten

[0070] Menschliche Fibroblasten wurden auf nach Dulbeco modifizierten Eagle-Medium (DMEM), das 2.5 % Rinderfötenserum enthielt, kultiviert und dann mit 5000 Zellen pro Vertiefung auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen gegeben.

[0071] Die Proben wurden vorbereitet:

β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitung 1; 1-prozentige Lösung und ihre nachfolgenden Verdünnungen;

β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitung 4; 1-prozentige Lösung und ihre nachfolgenden Verdünnungen;

GluCare-S, aus Hefe (Cosmoferm) isoliertes β -Glucan; 1-prozentige Lösung und ihre nachfolgenden Verdünnungen; und

das Filtrat vor Fällung mit Ethylalkohol in Zubereitung 1; 100-prozentig und seine folgenden 1/10 Verdünnungen.

[0072] Nach der Zugabe jeder Probe in ihre Vertiefung wurde die Platte mit 96 Vertiefungen über vier Tage bei 37 °C gehalten. Nach Beendigung der Kultivierung wurden 0.2 % 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazoliumbromid (MTT) zu 50 μ L pro Vertiefung zugegeben.

[0073] Wiederum wurde die Platte über vier Tage bei 37 °C gehalten, um Formazan zu ergeben. Nach Auflösung des Formazans in Dimethylsulfoxid wurde mit einem Mikroplattenleser die Absorption bei 570 nm gemessen. Die Proliferation von Fibroblasten wurde durch Vergleich der Absorption mit der der unbehandelten Kontrollgruppe bewertet. Die Ergebnisse werden in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Konzentration der Proben (%)	Zubereitung 1	Zubereitung 4	GluCare-S	Konzentration (%)	Filtrat der Zubereitung 1
4×10^{-7}	5	5	0	1×10^{-2}	5
4×10^{-6}	6	5	0	1×10^{-1}	10
4×10^{-5}	5	7	1	1×10^0	15
4×10^{-4}	6	7	3	1×10^1	17
8×10^{-4}	15	16	5	1×10^2	14
4×10^{-3}	34	28	7		
4×10^{-2}	40	35	7		
4×10^{-1}	38	34	5		

[0074] Wie in Tabelle 1 gezeigt, führt die Behandlung mit GluCare-S zu einer höchstes 7-prozentigen Steigerung der Proliferation von Fibroblasten. Die Behandlung mit aus *Schizophyllum commune* Fr. isoliertem β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan dagegen führt zu einer höchstens 40-prozentigen Steigerung. Das Filtrat vor Reinigung des β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucans (Extrakt aus *Schizophyllum commune* Fr.) ist jedoch weniger wirksam für die Fibroblastenproliferation.

Experimentelles Beispiel 2: Poliferation von Keratinozyten

[0075] Die im experimentellen Beispiel 1 beschriebene Vorgehensweise wurde mit Keratinozyten anstelle von Fibroblasten durchgeführt, um die Proliferation von Keratinozyten zu bewerten. Die Ergebnisse werden in Ta-

belle 2 gezeigt.

Tabelle 2

Konzentration der Proben	Zubereitung 1	Zubereitung 4	GluCare-S	Konzentration (%)	Filtrat der Zubereitung 1
4×10^{-7}	5	3	0	1×10^{-2}	5
4×10^{-6}	5	3	0	1×10^{-1}	10
4×10^{-5}	7	5	1	1×10^0	13
4×10^{-4}	11	10	3	1×10^1	8
8×10^{-4}	19	15	10	1×10^2	6
4×10^{-3}	20	19	12		
4×10^{-2}	19	16	11		
4×10^{-1}	18	15	8		

[0076] Wie in Tabelle 2 gezeigt, führt die Behandlung mit GluCare-S zu einer höchstes 12-prozentigen Steigerung der Proliferation von Keratinozyten. Die Behandlung mit aus Schizophyllum commune Fr. isoliertem β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucan dagegen führt zu einer höchstens 20-prozentigen Steigerung. Das Filtrat vor Reinigung des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans (Extrakt aus Schizophyllum commune Fr.) ist jedoch weniger wirksam für die Keratinozytenproliferation.

Experimentelles Beispiel 3: Biosynthese von Fibroblastenkollagen

[0077] Die Fibroblasten wurden auf einer Mikrotiterplatte mit 24 Vertiefungen, die dasselbe Medium wie im experimentellen Beispiel 1 enthielten, kultiviert und mit denselben Proben über drei Tage behandelt. Nach Abschluss der Kultivierung wurden 0.5 mL DMEM und 10 μ Ci L[2,3,4,5- 3 H]-Prolin in jede Vertiefung zugegeben. 24 Stunden später wurden das in jeder Vertiefung enthaltende Medium und die Zellen gewonnen, mit 5% Trichloressigsäure gewaschen und auf zwei Reagenzgläser aufgeteilt. In eines der Reagenzgläser wurden eine Einheit/ μ L Typ I-Kollagenase zugegeben und das Reagenzglas über 90 Minuten bei 37 °C gehalten. Das andere Reagenzglas wurde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 0.05 mL 50-prozentiger Trichloressigsäure in jedes der beiden Reagenzgläser zugegeben, die über 20 Minuten bei 4 °C gehalten wurden. Die entstehende Lösung wurde 10 Minuten lang bei 12 000 UpM zentrifugiert und dann der Zerfall pro Minute (decay per minute, dpm) der überstehenden Lösung und des Niederschlags mit einem Flüssigszintillationszähler gemessen. Die relative Kollagenbiosynthese (relative collagen biosynthesis, RCB) wird mit der folgenden Gleichung berechnet.

$$RCB = [\text{Kollagen dpm} / \{\text{Gesamtkollagen} - \text{Kollagen dpm}\} \times 5.4 \text{ Kollagen dpm}] \times 100$$

[0078] Die Ergebnisse werden in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

Konzentration der Proben	Zubereitung 1	Zubereitung 4	GluCare-S	Konzentration (%)	Filtrat der Zubereitung 1
4×10^{-6}	5	0	0	0	0
4×10^{-5}	5	5	1	1×10^{-2}	0
4×10^{-4}	11	8	3	1×10^{-1}	5
4×10^{-3}	22	21	5	1×10^0	12
4×10^{-2}	32	30	5	1×10^1	10
4×10^{-1}	24	23	3	1×10^2	6

[0079] Wie in Tabelle 3 gezeigt, führt die Behandlung mit GluCare-S zu einer höchstes 5-prozentigen Steigerung der Biosynthese von Fibroblastenkollagen, während die Behandlung mit aus *Schizophyllum commune* Fr. isoliertem β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucan zu einer höchstens 32-prozentigen Steigerung führt. Das Filtrat vor Reinigung des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans (Extrakt aus *Schizophyllum commune* Fr.) ist jedoch weniger wirksam für die Förderung der Kollagenbiosynthese.

Experimentelles Beispiel 4: Heileffekt für durch übermäßige Sonneneinstrahlung hervorgerufene Hautschäden

[0080] Die Hautfarbe wurde vor der Bestrahlung mit UV-Strahlen mit einem Chromameter CM2002 gemessen. Am Oberarm eines Freiwilligen wurde mit einem Sonnensimulator MED gemessen und anschließend wurde mit UV-Strahlung bestrahlt, um 1.5 MED einzustellen und Erytheme hervorzurufen. 6, 8, 10, 12, 16, und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden dem Probanden 20 μ L der selben Proben (1 % β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucan und 100% Filtrat) wie im experimentellen Beispiel 1 appliziert. Vor und nach der Behandlung mit den Proben wurde die Hautfarbe mit dem Chromameter2002 gemessen. Der relative Wert, wenn die Hautfarbe vor der UV-Bestrahlung zu 100 gesetzt wird, wird als „Erythemindex“ berechnet, dessen statistische Signifikanz durch einen Anova-Test ($p < 0.05$) verifiziert wurde. Mit diesem Index wurde der Heilungseffekt bei Verbrennungen bewertet. Die Ergebnisse werden in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4

Stunden	Einheit (Erythemindex)			
	Kontrolle (D.W.)	Zubereitung 1	GluCare-S	Filtrat der Zubereitung 1
0	100.00	100.00	100.00	100.00
16	197.85	163.60	193.32	180.65
24	193.58	155.01	189.32	178.28
48	174.98	135.87	165.25	160.56

[0081] Wie in Tabelle 4 gezeigt wird, führt die Behandlung mit GluCare-S zu höchstens 5.56-prozentiger Heilungswirksamkeit für die beschädigte Haut, während die Behandlung mit aus *Schizophyllum commune* Fr. isoliertem β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucan zu höchstens 22.35-prozentiger Heilungswirksamkeit führt. Das Filtrat vor Reinigung des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans (Extrakt aus *Schizophyllum commune* Fr.) jedoch ist zur Heilung der beschädigten Haut weniger wirksam.

Experimentelles Beispiel 5: Aufhellungseffekt

[0082] Auf die Oberarme von 10 gesunden männlichen Freiwilligen wurden opake Bänder mit sechs Löchern mit 1.5 cm Durchmesser angebracht und mit UV-Strahlung mit einer TL20W/090UV Lampe (Philips) und einer TL20W/12UV Lampe (Philips) mit einer Stärke von 200 mJ/cm^2 bestrahlt. Zwei Wochen später wurden den

Probanden 0.1 % β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitung 4, 0.1 % GluCare-S und eine 25-%ige Verdünnung des Filtrats vor Fällung mit Ethylalkohol aus der Zubereitung 1 zweimal täglich zwei Monate lang appliziert. Vor und nach Behandlung mit den Proben wurde mit einem Chromameter 2002 in gleichen Zeitabständen die Hautfarbe gemessen. Der Unterschied der Helligkeit (ΔL) verglichen mit der Hauthelligkeit vor Anwendung der Proben wurde berechnet und die Ergebnisse in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5

Anwendungszeitraum der Probe (Tage)	(Einheit: ΔL)			
	Kontrolle	Zubereitung 4	GluCare-S	Filtrat der Zubereitung 1
0	0	0	0	0
10	0.25	0.95	0.31	0.61
20	0.50	2.15	0.52	1.50
30	1.00	2.65	1.35	2.00
40	1.74	3.52	2.12	2.54
50	2.37	4.2	2.75	2.90
60	2.93	4.71	3.20	3.35

[0083] Wie in Tabelle 5 gezeigt wird ist aus *Schizophyllum commune* Fr. isoliertes β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan für die Verbesserung der Hauthelligkeit am effektivsten.

Experimentelles Beispiel 6: Verbesserung von Hautrunzeln

[0084] Um die Fähigkeit der β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan enthaltenden Zusammensetzung zur Verbesserung von Hautrunzeln zu bewerten, wurde das folgende Experiment durchgeführt. Zehn (10) Freiwillige im Alter zwischen 35 und 45 Jahren verwendeten die Nährcremes aus Beispiel 1 und Vergleichsbeispiel 1.

Stoff	(Einheit: Gew.-%)	
	Beispiel 1	Vergleichsbeispiel 1
β-1,6-verzweigtes-β-1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 1	0.1	-
Bienenwachs	3.0	3.0
Polysorbat 60	1.5	1.5
PEG-60-gehärtetes Rizinusöl	2.0	2.0
Sorbitansesquioleat	0.5	0.5
Flüssiges Paraffin	10.0	10.0
Squalan	5.0	5.0
Octan/Decansäuretriglycerid	5.0	5.0
Glycerin	5.0	5.0
Butylenglycol	3.0	3.0
Propylenglycol	3.0	3.0
Triethanolamin	0.2	0.2
Konservierungsstoff	q.s.	q.s.
Pigment	q.s.	q.s.
Parfum	q.s.	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100	auf 100

[0085] Drei Monate lang wurde auf die rechte Gesichtshälfte die Nährcreme von Beispiel 1 und auf die linke Gesichtshälfte die Nährcreme von Vergleichsbeispiel 1 appliziert. Die Verbesserung der Hautrunzeln wurde durch Vergleich der Fältchen in Augenwinkel vor und nach der Benutzung der Cremes bewertet. Die Fältchen im Augenwinkel wurden abgeformt und mit einem Visiometersystem (C + K) in einem Raum mit konstanter Temperatur und Feuchtigkeit, eingestellt auf eine Temperatur von 24 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 40 % gemessen. Die Verbesserung der Hautrunzeln wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$\text{Verbesserung der Hautrunzeln } (\Delta\%) = \{(T_{di} - T_{do})/T_{do}\} \times 100$$

(Wobei T_{di} der nach der Verwendung der Cremes gemessene Hautrunzelwert und T_{do} der vor der Verwendung der Cremes gemessene Hautrunzelwert ist.)

[0086] Im Ergebnis betrug die Verbesserung in der linken Gesichtshälfte 3.1 ± 2.2 %, während die Verbesserung in der rechten Gesichtshälfte 15 ± 4.1 % betrug.

[0087] Die β-1,6-verzweigtes-β-1,3-Glucan enthaltenden Zusammensetzungen zur äußerlichen Anwendung werden mittels der folgenden Formulierungen 1 bis 9 ausführlicher veranschaulicht. Diese Formulierungen werden jedoch nur zum Zweck der Veranschaulichung wiedergegeben und sollten nicht als Beschränkung des Bereichs der Erfindung ausgelegt werden, der in den begleitenden Ansprüchen skizziert ist.

Formulierung 1: Hautlotion

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 1	0.1
Glycerin	3.0
Butylenglycol	2.0
Propylenglycol	2.0
Carboxivinylpolymer	0.1
PEG-12-nonyl-phenyl-ether	0.2
Polysorbat 80	0.4
Ethanol	10.0
Triethanolamin	0.1
Konservierungsmittel	q.s.
Pigment	q.s.
Parfum	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100

Formulierung 2: Milchlotion

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 4	0.1
Squalan	5.0
Bienenwachs	4.0
Polysorbat 60	1.5
Sorbitansesquioleat	1.5
Flüssiges Paraffin	0.5
Octan/Decansäuretriglycerid	5.0
Glycerin	3.0
Butylenglycol	3.0
Propylenglycol	3.0
Carboxivinylpolymer	0.1
Triethanolamin	0.2
Konservierungsstoff	q.s.
Pigment	q.s.
Parfum	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100

Formulierung 3: Nährcreme

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 2	0.1
Bienenwachs	10.0
Polysorbat 60	1.5
PEG-60-gehärtetes Rizinusöl	2.0
Sorbitansesquioleat	0.5
Flüssiges Paraffin	10.0
Squalan	5.0
Octan/Decansäuretriglycerid	5.0
Glycerin	5.0
Butylenglycol	3.0
Propylenglycol	3.0
Triethanolamin	0.2
Konservierungsstoff	q.s.
Pigment	q.s.
Parfum	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100

Formulierung 4: Massagecreme

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 3	0.1
Bienenwachs	10.0
Polysorbat 60	1.5
PEG-60-gehärtetes Rizinusöl	2.0
Sorbitansesquioleat	0.8
Flüssiges Paraffin	40.0
Squalan	5.0
Octan/Decansäuretriglycerid	4.0
Glycerin	5.0
Butylenglycol	3.0
Propylenglycol	3.0
Triethanolamin	0.2
Konservierungsstoff	q.s.
Pigment	q.s.
Parfum	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100

Formulierung 5: Packung

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 1	0.1
Polyvinylalkohol	13.0
Natriumcarboxymethylcellulose	0.2
Glycerin	5.0
Allantoin	0.1
Ethanol	6.0
PEG-12-nonyl-phenyl-ether	0.3
Polysorbat 60	0.3
Konservierungsstoff	q.s.
Pigment	q.s.
Parfum	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100

Formulierung 6: Gel

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 4	0.1
Ethylendiaminnatriumacetat	0.05
Glycerin	5.0
Carboxivinylpolymer	0.3
Ethanol	5.0
PEG-60 gehärtetes Rizinusöl	0.5
Triethanolamin	0.3
Konservierungsstoff	q.s.
Pigment	q.s.
Parfum	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100

Formulierung 7: Salbe

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 4	0.1
Bienenwachs	10.0
Polysorbat 60	5.0
PEG-60-gehärtetes Rizinusöl	2.0
Sorbitansesquioleat	0.5
Vaseline	5.0
Flüssiges Paraffin	10.0
Squalan	5.0
Sheabutter	3.0
Octan/Decansäuretriglycerid	5.0
Glycerin	10.0
Propylenglycol	10.2
Triethanolamin	0.2
Konservierungsstoff	q.s.
Pigment	q.s.
Parfum	q.s.
Destilliertes Wasser	auf 100

Formulierung 8: Gelartige Salbe

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 4	3.0
Polyacrylsäure (Carbopol 940)	1.5
Isopropanol	5.0
Hexylenglycol	25.0
Triethanolamin	1.7
Entsalztes Wasser	auf 100

Formulierung 9: Pflaster

Stoff	(Einheit: Gew.-%)
β -1,6-verzweigtes- β -1,3-Glucan aus Zubereitungsbeispiel 4	0.1
Hexylenglycol	20.0
Diethylamin	0.7
Polyacrylsäure (Carbopol 934P)	1.0
Natriumsulfit	0.1
Polyoxiethylenlaurylether (E.O. = 9)	1.0
Polyhydroxiethylencetylstearylether (Cetomacrogol 1000)	1.0
Viskoses Paraffinöl	2.5
Octansäureester/Decansäuresester (Cetiol LC)	2.5
Polyethylenglycol 400	3.0
Entsalztes Wasser	auf 100

Patentansprüche

1. Verfahren zur Flüssigkultivierung von Schizophyllum commune Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) Kultivierung der Myzelien von Schizophyllum commune Fr. über zwei bis vier Tage in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 4,0 bis 8,5, das 1 bis 10 Gew.-% Glucose, 0,1 bis 1 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 bis 0,5 Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-% KH_2PO_4 und 0,005 bis 0,2 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält;
- (2) Zugabe von Aktivkohle in das Flüssigmedium in einer Menge von 0,1 bis 5 % und Kultivierung für weitere ein bis vier Tage;
- (3) Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium; und
- (4) Reinigung des β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucans.

2. Verfahren zur Flüssigkultivierung von Schizophyllum commune Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) Kultivierung der Myzelien von Schizophyllum commune Fr. über drei bis fünf Tage in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 4,0 bis 8,5, wobei das Medium 1 bis 3 Gew.-% Glucose, 0,3 bis 0,5 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 bis 0,5 % Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-% KH_2PO_4 und 0,005 bis 0,2 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält;
- (2) Zugabe von Glucose in das Flüssigmedium in einer Menge von 1 bis 10 und Kultivierung für weitere ein bis drei Tage;
- (3) Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium; und
- (4) Reinigung des β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucans.

3. Verfahren zur Flüssigkultivierung von Schizophyllum commune Fr. zur Isolierung von β -1,6-verzweigtem- β -1,3-Glucan, das die folgenden Schritte umfasst:

- (1) Kultivierung der Myzelien von Schizophyllum commune Fr. über drei bis fünf Tage in einem Flüssigmedium mit einem pH-Wert von 4,0 bis 8,5, wobei das Medium 1 bis 3 Gew.-% Glucose, 0,3 bis 0,5 Gew.-% Hefeextrakt, 0,05 bis 0,5 % Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05 bis 0,5 Gew.-% KH_2PO_4 und 0,005 bis 0,2 Gew.-% $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ enthält;
- (2) Zugabe von 0,1 bis 5 % Aktivkohle und von 1 bis 10 % Glucose in das Flüssigmedium und Kultivierung für weitere ein bis fünf Tage;

- (3) Isolierung von β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucan aus dem flüssigen Medium; und
- (4) Reinigung des β -1,6-verzweigten- β -1,3-Glucans.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

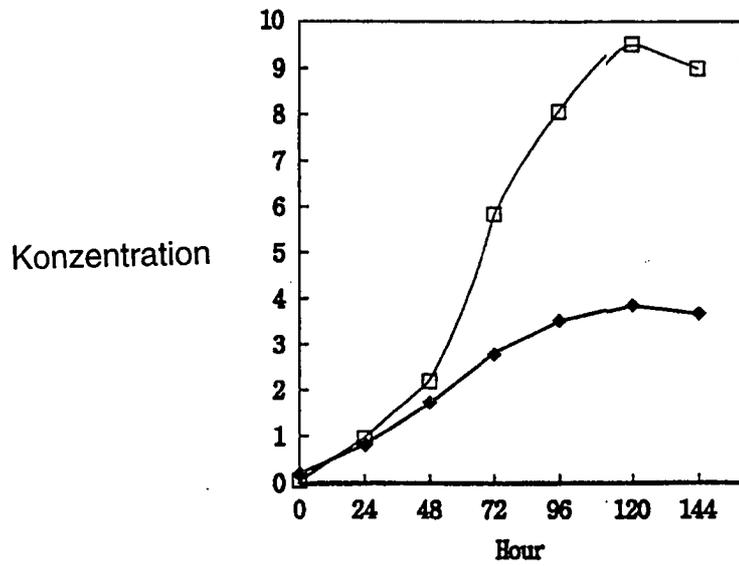


FIG. 2

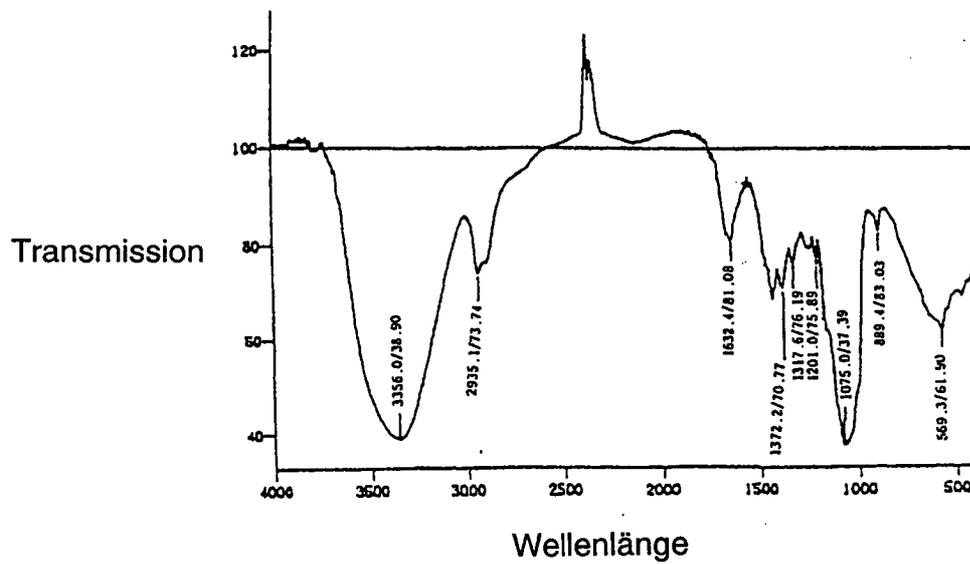


FIG. 3

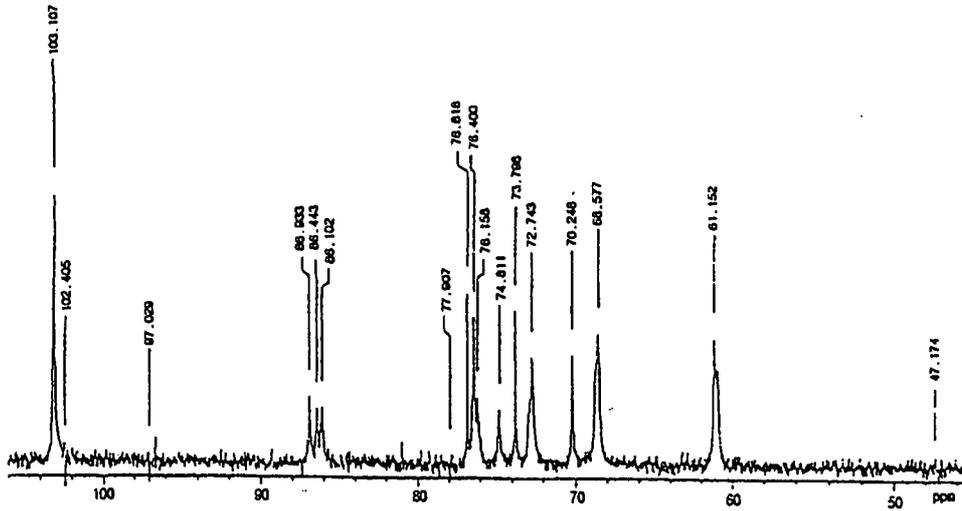


FIG. 4

