

**УКРАЇНА****(19) UA****(11) 106882****(13) C2****(51) МПК****A23J 1/06** (2006.01)**A23L 1/29** (2006.01)**A61K 35/16** (2006.01)

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2011 11307	(72) Винахідник(и):	Травнічек Дусан (CZ)
(22) Дата подання заявки:	26.02.2010	(73) Власник(и):	СВУС ФАРМА А.С., Smetanovo nabrezi 1238/20a, 500 02 Hradec Kralove, Czech Republic (CZ)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	27.10.2014	(74) Представник:	Пахаренко Антоніна Павлівна, реєстр. №4
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	PV 2009-117	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Duarte R.T. et al., Bovine Blood Components: Fractionation, Composition, and Nutritive Value. Journal of agricultural and food chemistry. - 1998. - Vol. 47, p. 231-236. Montoro ronsano J.B. et al., The hemoderivatives: They characteristics and description. Ciencia y tecnologia pharmaceutica. - 1999. - Vol. 9, No. 2, p. 51- 58.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	26.02.2009		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	CZ		
(41) Публікація відомостей про заявку:	26.12.2011, Бюл.№ 24		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	27.10.2014, Бюл.№ 20		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/CZ2010/000021, 26.02.2010		

(54) СПОСІБ БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ОДЕРЖАННЯ ГЕМОДЕРИВАТУ З ТЕЛЯЧОЇ КРОВІ**(57) Реферат:**

Винахід належить до біотехнологічного способу одержання гемодеривату з телячої крові, що включає наступні етапи: ферментування крові, сушіння продукту ферментації, дезінтеграція і екстракція етанолом продукту ферментування крові в кілька етапів з використанням захисної атмосфери інертного газу, стабілізація отриманого екстракту шляхом відокремлення солей, що містяться в крові, вакуумне згущення екстракту з наступною стабілізацією шляхом відокремлення солей з використанням захисної атмосфери інертного газу, обробка сконцентрованого екстракту ефіром і етанолом у кілька етапів для видалення фосфоліпідів, стабілізація осаду гемодеривату з телячої крові шляхом відокремлення ефірного розчину і вакуумне згущення отриманого етанол-ефірного розчину гемодеривату з телячої крові з використанням захисної атмосфери інертного газу, розчинення залишку гемодеривату з телячої крові після випарювання в дистильованій воді та нормалізація кінцевого продукту гемодеривату з телячої крові.

UA 106882 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

[0001] Даний винахід стосується способу біотехнологічного одержання гемодеривату з телячої крові. Свіжеодержаний кров'яний матеріал тваринного походження, тобто свіжу телячу кров, спочатку ферментують у кілька етапів, звичайно у два етапи при підвищеній температурі нагрівачого повітря. Отриманий продукт ферментування крові висушують звичайно при температурі від 30 до 100 °С. Висушений продукт ферментування крові відокремлюють. Потім проводять екстрагування продукту ферментування крові етанолом у кілька етапів. Екстракт продукту ферментування крові піддають вакуумному згущенню звичайно до кінцевої концентрації, що в 20 раз перевищує початкову концентрацію, і далі відокремлюють небажані речовини. Сконцентрований таким способом екстракт далі піддають одноступінчастій ефірній обробці, у процесі такого впливу діетиловим етером відбувається осадження сконцентрованого продукту ферментування крові, і отриманий осад відокремлюють від розчину небажаних розчинених в ефірі фосфоліпідів. Потім нормалізують кінцевий продукт.

[0002] Даний винахід також стосується використання гемодеривату з телячої крові.

Попередній рівень техніки

[0003] У чеському патенті А.О. № 228 038 наведений опис способу одержання тканинного препарату із тканини рослин або тварин шляхом екстрагування зазначених тканин етанолом. Тканину піддають багатоступінчастому впливу етанолу протягом періоду часу від 3 до 100 днів у температурному інтервалі від 10 до 100 градусів Цельсія (°С), переважно від 70 до 85 °С. Далі екстракт концентрували в межах від 5 до 50 % від початкового об'єму і осаджували з використанням ефіру або іншого розчинника. Осад промивали ефіром, висушували і висушений осад розчиняли.

[0004] Перевага даного винаходу полягає в тому, що отриманий препарат може бути використаний для лікування і регенерації клітин живих організмів. Процес екстрагування виконують із використанням екстракційного розчинника.

[0005] Проведене з використанням такого способу екстрагування має недолік, що полягає в тому, що речовину, що екстрагують, не поміщають у бойлер, що приводить до значної втрати енергії і негативно впливає на процес екстрагування, тому що відбувається зниження температури речовини, що екстрагується. Інший недолік полягає в наявності окиснюючої атмосфери, при проведенні зазначеного екстрагування, що негативно впливає на хімічну стабільність екстракту. Ще один недолік даного винаходу полягає в низькій селективності одноступінчастої ефірної обробки, тобто небажані речовини в осаді є фізично недоступними для впливу на них ефіру. Осад утворюється у вигляді щільної масляної фази. У даному винаході наведений опис методики, що полягає в тому, що очищення осаду, що містить активні речовини, від небажаних фосфоліпідних речовин проводять шляхом додавання ефіру, у результаті чого виникають відносні труднощі з утворенням емульсії, тобто з відокремленням фосфоліпідів від мікрочастинок осаду. Таким чином, очевидно, що існує проблема з очищенням осаду від фосфоліпідів, виключається кількісне видалення фосфоліпідів, при цьому відбувається лише їх часткове видалення. Більше того, після одержання з використанням ефіру згущеного етанолового екстракту продукту ферментування крові відповідно до даного винаходу необхідний етап висушування, для видалення ефіру. Таким чином, існує певна небезпека вибуху, а також потрапляння ефіру у навколишнє середовище, що не виключає можливого забруднення навколишнього середовища. Випарений залишок, що не містить ефіру, чутливий до мікробного забруднення, а також чутливий до впливу окиснюючої атмосфери, і таким чином, існує можливість неконтрольованого розщеплення випареного залишку за рахунок впливу кисню.

[0006] У чеському патенті № 279 147 наведений опис біотехнологічного способу одержання продукту, що стимулює імунітет організмів, шляхом екстрагування з матеріалу тваринного походження. Свіжеодержаний кров'яний матеріал тваринного походження піддають ферментативному розщепленню в 2 етапи. Спочатку при температурі в інтервалі від 80 до 85 °С протягом 3 годин і далі на другому етапі при температурі 70-75 °С протягом 48 годин. Потім отриманий матеріал висушують при 75-80 °С і при максимальній вологості 35 % протягом 120-160 годин, який надалі подрібнюють на гранули розміром 500 мкм. Далі проводять екстракційну флотацію при підйомі кров'яного матеріалу шляхом циркуляції екстрагуючої речовини, утвореної аліфатичними спиртами, що містять до 4 атомів, при максимальному вмісті води до 5 % і при одночасному нагріванні в межах 50-55 °С. Постійний контакт екстрагуючої речовини з екстрагуємою речовиною забезпечується за рахунок виштовхування нагору і утримання на поверхні, наприклад, дезінтегрованого продукту ферментування. Шляхом осадження ліпідні частки видаляються із отриманого таким способом екстракту. Нормалізацію кінцевого продукту здійснюють шляхом модифікації активних речовин винятково у водному

розчині, при цьому не забезпечується розв'язання проблеми мікробіологічної стабільності кінцевого продукту.

[0007] Перевага даного винаходу полягає в низькій енергоємності процесу екстрагування етанолом, тому що забезпечується рекуперація значної кількості конденсаційної теплоти екстракційного розчинника із процесу. Контрольоване ферментування безумовно забезпечує одержання більшої кількості активних речовин у порівнянні з попереднім винаходом.

[0008] Недолік даного винаходу полягає в тому, що процес екстрагування здійснюють із використанням способу мацерації, під час якого не відбувається осадження екстрагованих солей, що містяться в крові, у діапазоні нагрівання, і вони зберігаються в матеріалі протягом усього технологічного процесу аж до одержання кінцевого продукту. Виключається видалення небажаних солей, що містяться в крові, через використання низької концентрації екстракту, що обумовлено використанням великої надлишкової кількості екстракційного розчинника – етанолу стосовно речовини, що екстрагується, – ферментованої крові. Патент дозволяє розв'язати дану негативну проблему за рахунок застосування процесу охолодження, який, проте, не є досить ефективним для видалення небажаних солей, що містяться в крові. Процес видалення солей є короткочасним процесом, що проводиться при низькій температурі, таким чином, можна зробити припущення щодо того, що процес відокремлення небажаних речовин характеризується низькою ефективністю. Більше того, після проведення ефірної обробки осад розчиняють у дистильованій воді таким чином, щоб забезпечувалася присутність у розчині, в цілому, трьох розчинників: етанолу в слідових кількостях, діетилового ефіру в значній кількості і дистильованої води, як основного розчинника. Після подальшого вакуумного випарювання ефіру, а також, можливо, етанолу, утворюється в основному водний розчин, сприйнятливий до мікробного забруднення. У цьому випадку одноступінчаста ефірна обробка є недостатньою для одержання чистого кінцевого продукту. Інший недолік полягає в тому, що ферментування на другому етапі є відносно тривалим процесом, здійснюваним протягом приблизно 48 годин при температурі 70-75 °С, що виявляє істотний негативний вплив на економічність процесу ферментування. Розділення продукту ферментування крові на частки розміром до 0,5 мм є необхідним для наступного процесу екстрагування, проведеного з використанням мацерації при підйомі речовини на поверхню. Кінцевий продукт має явну кристалічну структуру в результаті процесу виготовлення відповідно до даного винаходу, тому що має небажаний високий вміст солей крові.

[0009] Недолік, властивий обом вищевказаним винаходам, заснованим на використанні телячого ферменту, полягає в наявності небажаних речовин, які розбавляють концентрацію активної речовини, і деякі з них можуть, імовірно, сприяти окисненню або розкладанню кінцевого продукту.

Суть винаходу

[0010] Використання способу біотехнологічного одержання гемодеривату з телячої крові відповідно до даного винаходу дозволяє усунути або суттєво обмежити вищезгадані недоліки. Свіжеодержаний кров'яний матеріал тваринного походження спочатку ферментують у кілька етапів, отриманий продукт ферментування крові висушують, висушений продукт ферментування крові відокремлюють, потім проводять екстрагування продукту ферментування крові етанолом у кілька етапів, далі продукт ферментування крові піддають вакуумному згущенню з наступною стабілізацією після видалення небажаних речовин. Сконцентрований екстракт далі піддають одноступінчастій ефірній обробці, у процесі якої відбувається ефірне осадження сконцентрованого продукту ферментування крові, і отриманий таким способом осад відокремлюють від розчину небажаних розчинних в ефірі речовин.

[0011] Предмет цього винаходу полягає в тому, що кров'яним матеріалом тваринного походження, отриманим безпосередньо шляхом ферментування, переважно телячою кров'ю, заповнюють невеликі ємності, таким чином, щоб рівень кров'яного матеріалу досягав висоти 2,5-3 см, і матеріал поступово нагрівають доти, доки температура його маси не досягне 55-65 °С, переважно 60 °С, після чого проводять другий етап ферментування, у процесі якого температура навколишнього нагріваючого повітря, знижується приблизно з 80 °С на першому етапі до 65-75 °С, переважно +70 °С. По досягненню зазначеної температури настає другий етап ферментування, під час якого між температурою нагріваючого повітря і температурою кров'яного матеріалу підтримується постійний температурний перепад, що становить 5 °С протягом 5-20 годин, переважно 12 годин, протягом якого відбувається аутоферментативне розщеплення кров'яного матеріалу. Під час зазначеного другого етапу ферментування вся маса кров'яного матеріалу набуває тягучу (клейку) консистенцію і на цьому завершується другий етап ферментування.

[0012] Певний рівень кров'яного матеріалу по висоті є оптимальним для ефективного протікання ферментних процесів. Висота рівня була встановлена експериментально. Якщо висота рівня була вище, те це виявляло більш позитивний вплив на ферментні процеси, однак теплоперенос під час першого етапи ферментування не є достатнім для швидкого досягнення температури пастеризації. Більш низькі рівні приводять до скорочення тривалості процесу ферментування, і, таким чином, коефіцієнт використання введеного матеріалу буде нижче.

[0013] Процес ферментування відповідно до даного винаходу здійснюється протягом більш короткого періоду часу і, отже, є більш економічним у порівнянні з існуючими технологіями. Визначення оптимального значення температури в масі забезпечує швидке досягнення температури пастеризації, тобто, виключається мікробне забруднення, і аутоферментативне розщеплення кров'яного матеріалу починається на другому етапі ферментування. Якби температура була вище, то це викликало б непропорційне скорочення часу ферментування на другому етапі. Якби температура була нижче, відбулося б зниження ефективності ферментування на другому етапі, і з більшим ступенем імовірності відбувся б небажаний ріст мікробів. Певні часові інтервали для двох етапів ферментування були отримані шляхом проведення тривалих оперативних випробувань.

[0014] Отриманий продукт ферментування крові висушують із використанням керованої вентиляції відповідно до кривої сушіння при 60-80 °C протягом 120-160 годин, переважно при 70 °C протягом 140 годин доти, доки не буде досягнутий кінцевий вміст вологи, що становить 10 %, переважно 2-3 %. Керовану вентиляцію оптимізують після завершення другого етапи ферментування з урахуванням експлуатаційної економічності і підтримки якості отриманого продукту ферментування. Певний інтервал температур висушування і час є результатом проведення тривалих експериментальних випробувань. Певна вологість є оптимальною у світлі введення мінімальної кількості води в технологічний процес для проведення наступного екстрагування.

[0015] Далі висушений продукт ферментування крові розділяють на частки розміром 1-10 мм, переважно 2-4 мм. Заявлений розмір часток є оптимальним для проведення наступного процесу екстрагування при ідеальних реологічних властивостях, тобто, з метою досягнення незначного опору шару часток стосовно швидкості потоку екстракційного розчинника в процесі екстрагування і щоб уникнути збільшення часу екстрагування, що могло б мати місце при розмірі часток, що перевищують 4 мм.

[0016] Відділений продукт ферментування крові піддають безперервному екстрагуванню в кілька етапів, переважно в 4 етапи, з використанням постійно чистого етанолу в екстракторі типу Сокслет при часі екстрагування, що становить 200-400 годин, переважно 240 годин при 70-78 °C, при цьому екстракти продуктів ферментування крові поєднують у процесі повторного екстрагування. Екстрагування продукту ферментування крові в кілька етапів відповідно до даного винаходу є доцільним для одержання чистої екстрагованої речовини, дія якого на продукт ферментування крові при температурі, близької до точки кипіння, дозволяє скоротити кількість використовуваного в процесі етанолу і здійснити процес концентрування отриманого екстракту в зоні кипіння при постійному відділенні небажаних осаджуваних солей, що містяться в крові. Для зазначеного способу ідеальним є екстрактор типу Сокслет, що забезпечує нагрівання екстрагованого продукту ферментування. При проведенні кожного окремого екстрагування одержують екстракт, що збирається в одній прийомній посудині. 4-етапне екстрагування є кращим і перевірене випробуваннями, що підтверджують, що воно є достатнім для одержання максимально можливої кількості екстрагованих речовин. Певний температурний діапазон є оптимальним для швидкості екстрагування і використовуваний інтервал часу є необхідним з урахуванням широкого діапазону необхідних речовин, що екстрагуються.

[0017] Отримані таким способом об'єднані екстракти продукту ферментування крові піддають стабілізації шляхом відокремлення небажаних солей, що містяться в крові, при кімнатній температурі протягом 24-120 годин, переважно 72 годин, при цьому загальний час стабілізації відраховують від початку процесу одержання останнього екстракту продукту ферментування крові. Ціль стабілізації полягає у видаленні небажаних солей, що містяться в крові, зазначені солі видаляються із часом при проведенні окремих технологічних операцій.

[0018] Після проведення наступного вакуумного згущення стабілізований сконцентрований екстракт продукту ферментування крові піддають ефірній обробці в кілька етапів для одержання осаду гемодеривату з телячої крові, при цьому кожний з осадів, одержуваний у результаті проведення процесу, розчиняють у такій кількості етанолу доти, доки не відбудеться кількісне розчинення осаду гемодеривату з телячої крові і не утвориться справжній розчин гемодеривату з телячої крові для наступної ефірної обробки, і відокремлюють розчин, що

містить розчинені в діетиловому ефірі небажані фосфоліпіди, над відфільтрованим осадом. Ліпіди, що містяться в масляному осаді гемодеривату з телячої крові, зазнають подальшого впливу ефіру під час їх розчинення в етанолі.

[0019] Після проведення багаторазової обробки отриманий осад гемодеривату з телячої крові стабілізують для відокремлення залишкового небажаного ефіру від осаду.

[0020] Стабілізований осад гемодеривату з телячої крові спочатку розчиняють в етанолі з утворенням справжнього розчину, який потім піддають вакуумному згущенню при 25-40 °С, переважно при 28 °С, з одержанням дистилату, що не містить ефір. Розчинення в етанолі є перевагою в порівнянні з розчиненням у воді, тому що в цьому випадку одержують розчин, стійкий до мікробного впливу, який одержують на заключному етапі в незмінному виді, тобто на технологічному етапі нормалізації. На цьому етапі з розчину етанолу легко випарюється ефір, який уже є небажаним компонентом, при даній температурі.

[0021] Отриманий після випарювання залишок гемодеривату з телячої крові розчиняють у дистильованій воді до концентрації 50-500 г на 1 літр розчину. Отриманий водний розчин етанолу центрифугують із використанням охолоджуваної центрифуги для видалення нерозчинених речовин, і надосадкову рідину, що утворилась таким чином, стандартизують після відокремлення нерозчинених речовин в осаді до концентрації гемодеривату з телячої крові 50-500 г на 1 літр розчину і до необхідної концентрації етанолу в діапазоні від 16 до 19 масових відсотків. Винятково на даному технологічному етапі вперше використовують дистильовану воду як розчинник, і причина полягає в тому, що остаточна концентрація етанолу повинна залишатися в зазначеному діапазоні від 16 до 19 масових відсотків, у результаті чого забезпечується одержання розчину, стійкого до мікробного впливу. Нерозчинні речовини, що з'являються, одночасно видаляють із зазначеного водного розчину етанолу переважно шляхом центрифугування в охолоджуваній центрифугі. Центрифугу охолоджують через те, що існує небезпека нагрівання гемодеривату з телячої крові в процесі центрифугування, що може привести до його термічної деструкції.

[0022] Основна перевага даного винаходу полягає в одержанні високоякісного і стійкого до мікробного і хімічного впливу продукту з високим змістом гемодеривату з телячої крові і з мінімальним вмістом або при повній відсутності небажаних фосфоліпідів і солей, що містяться в крові, а також у використанні способу, який, починаючи з етапи екстрагування етанолом, у всіх випадках захищений від мікробного забруднення і окислювального впливу повітря. Будь-який процес, в якому присутній тільки водний розчин, виключається, тобто виключається присутність води як розчинника, яка в значній мірі чутлива до росту мікроорганізмів, коли у воді присутні біологічні речовини. Постійна подача свіжого розчинника при проведенні процесу екстрагування дозволяє одержати екстракт із високим ступенем концентрації, що надалі дозволяє проводити ефективне поступове відокремлення небажаних органічних солей. Багаторазова ефірна обробка, заснована на періодично одержуваному осаді гемодеривату з телячої крові, який потім розчиняють до одержання справжнього розчину, дозволяє досягти майже кількісного відокремлення ліпідних речовин. У порівнянні з існуючими технологіями, використовуваними для одержання гемодеривату з телячої крові, спосіб відповідно до даного винаходу характеризується більш високою швидкістю і меншим ступенем впливу на навколишнє середовище.

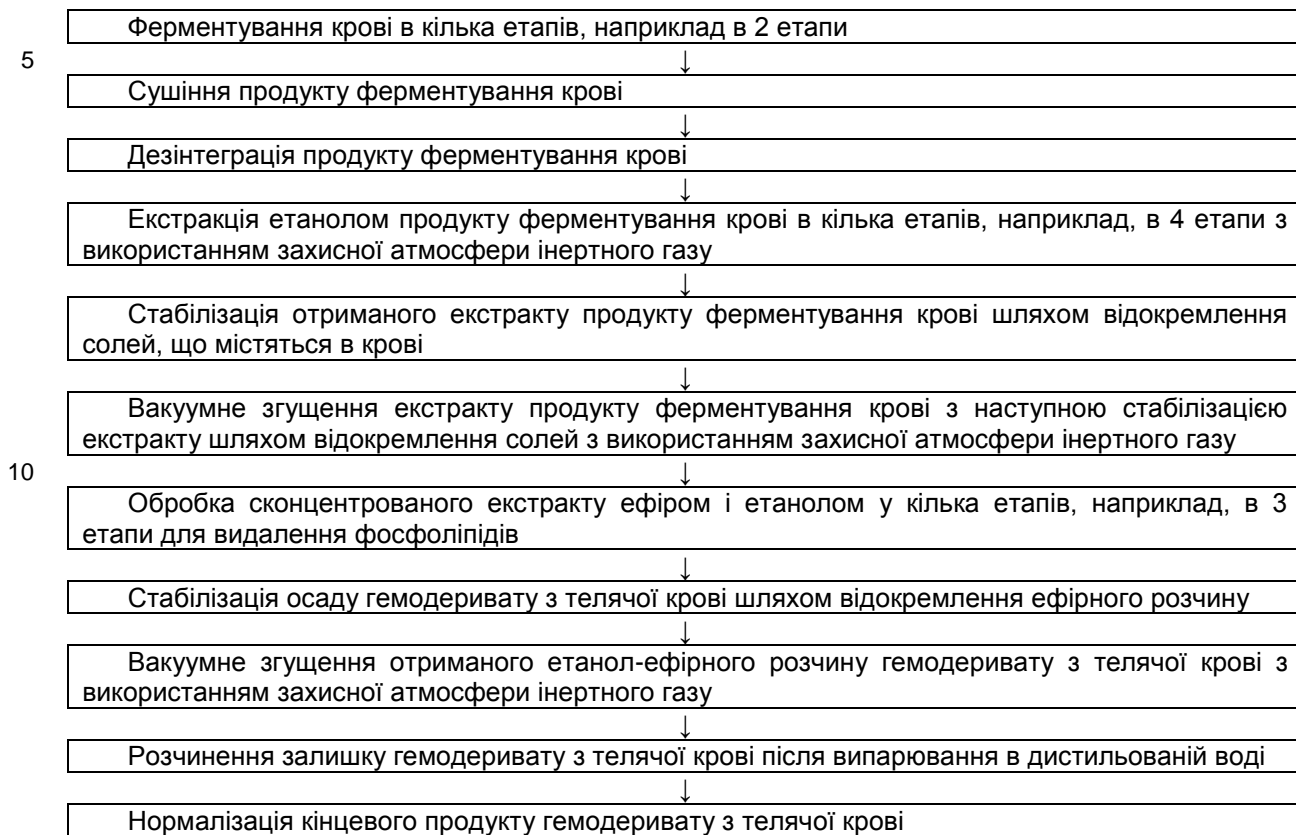
[0023] Екстрагування етанолом продукту ферментування крові і/або вакуумне згущення екстракту продукту ферментування крові і/або вакуумне згущення етанол-ефірного гемодеривату з телячої крові може бути переважно проведене в захисній атмосфері, наприклад, в атмосфері азоту. При подачі азоту в екстракційний апарат або у вакуумний циркуляційний випарник при проведенні процесу екстрагування або вакуумного циркуляційного згущення утворюється потік пухирців в етанолі або екстракті, який перемішує рідину і запобігає виникненню прихованого кипіння екстракту або чистого етанолу. Атмосфера інертного газу над поверхнею екстракту або розчину гемодеривату з телячої крові при проведенні вакуумного згущення слугує для захисту від окисного впливу кисню.

[0024] Відповідно до даного винаходу використання гемодеривату з телячої крові у водному розчині етанолу, що містить 50-500 г гемодеривату з телячої крові на 1 літр водного розчину етанолу, що містить 16-19 масових відсотків етанолу, є прийнятним для одержання дієтика, застосовуваного для підвищення імунітету організму людини і для застосування у ветеринарії. Застосування не обмежується винятково дієтетиками або медичними препаратами, а також включає косметичні засоби.

Приклади здійснення даного винаходу

Приклад 1

[0025] Нижче представлений огляд способу біотехнологічного одержання гемодеривату з телячої крові, що містить узагальнену послідовність окремих технологічних операцій у часовій послідовності (карта технологічного процесу):



15

Приклад 2

[0026] Нижче наведений опис конкретного прикладу здійснення, що включає послідовність технологічних операцій.

Ферментування телячої крові у два етапи

20

[0027] Сиру телячу кров дезінтегрують у транспортній ємності високошвидкісною мішалкою на частки, що мають максимальний розмір 30 мм. Відділена кров фільтрується в невеликій ємності з нержавіючої сталі таким чином, щоб висота рівня маси крові становила 2,5-3 см.

[0028] Далі проводять ферментування у два етапи, тобто аутоферментативне розщеплення під дією тепла, часу і ферментів, що містяться в сирій крові.

25

[0029] Процес ферментування на першому етапі протікає в такий спосіб. Ємності із кров'яною масою встановлюють у сушильному апараті, при цьому початкова температура кров'яної маси повинна становити, як мінімум, 30 °С. В одну вибрану ємність занурюють термограф, сушильний апарат закривають, температуру нагрівання внутрішнього простору сушильного апарата встановлюють на значенні, що становить приблизно 75-85 °С, переважно 80 °С, протягом 2-2,5 годин. При включенні в сушильному апараті задається режим внутрішньої циркуляції повітря.

30

[0030] Другий етап ферментування починається в той момент, коли температура кров'яної маси досягає температури в діапазоні 55-65 °С, переважно 60 °С. Із цього моменту температур нагрівачого повітря регулюють таким чином, щоб різниця між температурою кров'яної маси і температурою нагрівачого повітря залишалася постійною протягом усього періоду ферментування, при цьому різниця повинна становити 5 °С. Під час другого етапу ферментування кров'яна маса набуває тягучу (клейку) консистенцію, і на цьому другий етап ферментування закінчується.

35

Висушування продукту ферментування крові

40

[0031] Отриману на попередньому етапі ще не остиглу ферментовану кров'яну масу розрізають на частини, наприклад, розміром 10 × 10 см. Далі продукт ферментування крові піддають висушуванню в сушильному апараті при 60-80 °С, переважно при 70 °С. Висушування

невеликих розрізаних частин продукту ферментування крові проводять у сушильному апарату в режимі регульованої вентиляції.

[0032] Швидкість вентиляції внутрішнього простору сушильного апарата регулюється кривою висушування, що завершується через 120-160 годин, переважно через 132-156 годин, у результаті чого досягають кінцевого вміст вологи в інтервалі від 1 до 10 % у продукті ферментування крові, переважно 2-3 %.

Відокремлення продукту ферментування крові

[0033] Далі висушений продукт ферментування крові дезінтегрують на частки з оптимальним розміром, що становлять 1-10 мм, переважно 2-4 мм, що є найбільш прийнятним для наступних технологічних операцій.

Екстрагування етанолом продукту ферментування крові у чотири етапи

[0034] Безперервне екстрагування отриманого на попередніх етапах висушеного продукту ферментування крові проводять із використанням постійно чистого етанолу в екстракторі типу Сокслет при 60-78 °С, переважно ближче до верхньої межі, що становить 78 °С, в 96 % етанолі. Більш висока температура дозволяє прискорити екстрагування висушеного продукту ферментування крові.

[0035] Ферментовану кров поміщають в екстракційну камеру з перфорованим дном і переливом, розміщеним вище рівня речовини, що екстрагується. До продукту ферментування крові додають 96 % етанол у кількості, що становить, як мінімум, 1/3 від ваги продукту для забезпечення протікання реакції. Чим більше додають етанолу, тим швидше і більш ефективно протікає процес екстрагування, хоча надлишкова кількість етанолу негативно впливає на економічність процесу екстрагування, і може виникнути ситуація, при якій надлишкова кількість етанолу є винятково великою, і видалення такої надлишкової кількості є трудомістким. Таким чином, висушений продукт ферментування крові покривають шаром 96 % етанолу таким чином, щоб приблизно 35 % від загальної кількості етанолу перебувало в зоні кипіння, у той час як інший частина – в екстракційній камері.

[0036] Процес першого екстрагування протікає в такий спосіб: через перші 3-40 годин екстрагування, переважно через 24 години, перший отриманий екстракт вивантажують із бойлера в екстракційний резервуар, розміщений зовні екстрактора. Потім зону кипіння екстрактора очищують тепловою водою для змиву вилучених солей.

[0037] У бойлер екстрактора знову заливають 96 % етанол і далі проводять другий і два наступні етапи екстрагування продукту ферментування крові для завершення процесу. Процес екстрагування завершується через 20-60 годин, переважно через 48 годин після закінчення другого етапи екстрагування, у результаті чого одержують другий екстракт продукту ферментування крові, і через ще 50-90 годин, переважно на 72-ій годині після завершення третього етапу екстрагування, у результаті чого одержують третій екстракт продукту ферментування крові. При проведенні другого і третього процесів екстрагування здійснюють ті ж самі операції, як і на першому етапі екстрагування, який завершився через 24 години після початку роботи екстрактора. Це означає, що кількість доданого етанолу на третьому етапі екстрагування дорівнює кількості етанолу на другому етапі.

[0038] Отримані другий і третій екстракти продукту ферментування крові вивантажують в екстракційний резервуар після завершення кожного з етапів екстрагування.

[0039] Останній четвертий процес екстрагування завершується через 150-400 годин, переважно через 240 годин. Після зазначеного останнього четвертого процесу екстрагування останній четвертий екстракт вивантажують в екстракційний резервуар. Це означає, що чотири процеси екстрагування дозволяють одержати чотири об'єднані екстракти продукту ферментування крові в екстракційному резервуарі.

[0040] Зазначені чотири тимчасові етапи екстрагування були вибрані як оптимальні в плані одержання екстракту. Більш короткі строки окремих етапів екстрагування можуть привести до скорочення виходу екстракту продукту ферментування крові. Більш тривалі строки окремих етапів екстрагування можуть привести до зайвого теплового навантаження на вже екстраговані екстракційні фракції, які повинні перебувати в бойлері екстрактора при температурі кипіння з метою одержання потоку чистого етанолу для наступного екстрагування.

[0041] Ідеальне вагове відношення завантаженого продукту ферментування крові до доданого 96 % етанолу становить 1/3-20/1 для всіх етапів екстрагування.

[0042] Екстрагування етанолом відповідно до зазначеного способу дозволяє одержати відносно концентрований об'єднаний екстракт продукту ферментування крові, який у порівнянні, наприклад, з екстрактом, одержуваним відповідно до процедури, описаної в чеських патентах CS 228 038 і 279 147, є в 7-8 раз більш концентрованим, хоча при цьому кількості завантаженого продукту ферментування крові є однаковими.

[0043] Зазначений процес екстрагування етанолом може проводитися в захисній атмосфері інертного газу, наприклад, в атмосфері азоту, яка виключає виникнення прихованого кипіння етанолу, або отриманого екстракту і при цьому, зокрема, проявляється позитивний вплив інертної атмосфери, тобто, на хімічну стабільність екстрагованих речовин.

5 Стабілізація екстракту продукту ферментування крові шляхом відокремлення солей, що містяться в крові

[0044] Об'єднаний екстракт продукту ферментування крові, отриманий відповідно до зазначеного способу, стабілізують в екстракційному резервуарі протягом 24-120 годин, переважно протягом 72 годин, при кімнатній температурі для відокремлення небажаних солей, що містяться в крові, наприклад, ферроціанідів і інших солей. Ефективність стабілізації підвищується зі збільшенням тривалості процесу. Процес стабілізації навіть може протікати протягом одного року, однак це є економічно недоцільним. Далі відфільтровують небажані солі, що містяться в крові, або очищений розчин екстракту продукту ферментування крові перекачують в інший резервуар.

15 Вакуумне згущення екстракту продукту ферментування крові

[0045] Відфільтрований екстракт продукту ферментування крові поступово перекачують із екстракційного резервуара у вакуумний циркуляційний випарник. У випарнику етанол випарюють із екстракту при 40-70 °C, переважно при 50-60 °C.

20 [0046] Згущення здійснюють при відношенні 1:5-1:40, переважно 1:20, при цьому мають на увазі відношення кінцевого сконцентрованого екстракту в завантаженому екстракті, тобто концентрація відповідає, наприклад, переважно 20-кратній концентрації екстракту продукту ферментування крові. Безпосередньо після завершення випарювання сконцентрований екстракт, що неохолов, вивантажують із зони кипіння випарника в дистиляційний прийомний резервуар, у якому він проходить стабілізацію.

25 [0047] Вакуумне згущення екстракту продукту ферментування крові може бути проведене в захисній атмосфері інертного газу, наприклад, в атмосфері азоту. Це дозволяє запобігти виникненню прихованого кипіння екстракту. Інертна атмосфера, зокрема, забезпечує хімічну стабільність екстрагованих речовин.

30 Стабілізація сконцентрованого екстракту продукту ферментування крові шляхом відокремлення солей

[0048] Стабілізацію отриманого сконцентрованого екстракту продукту ферментування крові здійснюють протягом 24-120 годин, переважно протягом 72 годин при кімнатній температурі. Зазначену стабілізацію також проводять для видалення небажаних фракцій солей, що залишилися і містяться в крові і які осідають на дні або осаджуються на стінках стабілізаційної посудини. У процесі стабілізації небажані фракції солей, що залишилися і містяться в крові, кристалізуються на дні або на стінках стабілізаційної посудини. Небажані солі, що містяться в крові, видаляють фільтруванням, або очищений розчин екстракту продукту ферментування крові відкачують.

40 Ефірно-етанолова обробка сконцентрованого екстракту продукту ферментування крові в три етапи

[0049] Далі зазначений сконцентрований і стабілізований екстракт продукту ферментування крові відфільтровують від осаджених небажаних солей, що містяться в крові. Отриманий етаноловий фільтрат екстракту продукту ферментування крові вливають у посудину із пропелерною мішалкою для відокремлення фосфоліпідів. Обробку проводять шляхом багаторазового осадження екстракту продукту ферментування крові 100 % діетиловим ефіром, у результаті чого утворюється осад, що містить гемодериват з телячої крові і розчин над осадом, що містить небажані фосфоліпіди, розчинні в діетиловому ефірі, які відокремлюються від осаду на кожному етапі обробки. Осад гемодеривату з телячої крові розчиняють в етанолі.

50 [0050] При більш детальному розгляді, перший етап обробки екстракту продукту ферментування крові здійснюють при впливі діетилового ефіру, при цьому діетиловий ефір додають частинами при постійному перемішуванні до сконцентрованого екстракту продукту ферментування крові відносно об'єму до кількості 1:1-20:1, переважно у відношенні при подвійній кількості останнього. При проведенні першого етапу ефірної обробки екстракту продукту ферментування крові одержують відокремлений осад, що вільно седиментує, гемодеривату з телячої крові і відокремлюють розчин етанолу і ефіру, що перебуває над осадом.

60 [0051] Другий етап обробки осаду гемодеривату з телячої крові проводять шляхом дії етанолу таким чином, щоб забезпечувалось розчинення осаду гемодеривату з телячої крові, отриманого на першому етапі, в 96 % етанолі, використовуючи при цьому таку кількість етанолу, при якій відбувається кількісне розчинення осаду гемодеривату з телячої крові і утворення

справжнього розчину. Далі знову проводять осадження із зазначеного розчину з використанням діетилового ефіру з утворенням осаду гемодеривату з телячої крові. Розчин, що утворився і знаходиться над осадом, відокремлюють.

5 [0052] На третьому етапі обробки використовують осад, отриманий на другому етапі, який розчиняють в 96 % етанолі, при цьому етанол використовують знову в такій кількості, щоб забезпечувалось утворення розчину і наступне випадіння з нього осаду за допомогою діетилового ефіру. Розчин, що знаходиться над осадом, відокремлюють.

Стабілізація осаду гемодеривату з телячої крові шляхом відокремлення ефірного розчину

10 [0053] Утворений таким способом осад стабілізують протягом 10-40 годин, переважно протягом 24 годин при 10-40 °C, переважно при 20-30 °C для досягнення максимально можливого відокремлення осаду гемодеривату з телячої крові від діетилового ефіру, що містить останні фракції небажаних фосфоліпідів. Існує можливість того, що при попередній операції був досягнутий майже кількісний вихід, і над осадом гемодеривату з телячої крові не утворюється розчин. Проте, практично постійно присутній розчин діетилового ефіру. Розчин, що

15 утворюється, відокремлений від осаду, відкачують і далі осад гемодеривату з телячої крові обробляють із використанням нижченаведеного способу. Ідеальне вагове співвідношення ферментованої крові до доданого 96 % етанолу становить 1/3-20/1 для всіх чотирьох етапів екстрагування, залежно від якісної складової використовуваної сирової крові.

Вакуумне згущення етанол-ефірного розчину гемодеривату з телячої крові

20 [0054] Осад, одержаний при попередній операції, розчиняли в 96 % етанолі, при цьому використовували таку кількість, яка дозволяла одержати розчин. Зазначений розчин поміщали в ротаційний вакуумний випарник і повітря з випарника витісняли, створюючи понижений тиск і подаючи захисний газ, наприклад, азот. Суміш залишкового діетилового ефіру і частину етанолу випарювали з розчину в ротаційному вакуумному випарнику при 25-40 °C, переважно

25 при 28 °C. Ціль випарювання полягає в максимальному випарюванні діетилового ефіру, при цьому кількість випареного етанолу підтримується на мінімальному рівні. Випарювання завершується по досягненню нульового вмісту діетилового ефіру в парах над розчином, що випарюється. Дана операція забезпечує стійкість до мікробного впливу за рахунок дії висококонцентрованого етанолу в розчині. Випарювання у вакуумі одночасно дозволяє

30 захистити активну речовину, тобто гемодериват з телячої крові, від окисної дії повітря.

[0055] Вакуумне випарювання є кращим не тільки в плані видалення ефіру, але і у плані захисту гемодеривату з телячої крові одночасно від теплового навантаження і окисної дії повітря. Створення вакууму у вакуумному випарнику дозволяє знизити температуру кипіння розчину, що випарюється, гемодеривату з телячої крові. Використання атмосфери інертного газу, наприклад, азоту у випарнику дозволяє запобігти окисному впливу кисню на гемодериват з

35 телячої крові.

Розчинення залишку гемодеривату з телячої крові після випарювання в дистильованій воді

40 [0056] Отриманий залишок після випарювання із частковим вмістом етанолу аналізують для визначення в ньому вмісту етанолу і сухої речовини або визначають вміст сухої речовини в гемодериваті з телячої крові. Залежно від вмісту сухої речовини залишок після випарювання розбавляють стерильною дистильованою водою до одержання водного розчину етанолу. Кількість води підбирають відповідно до необхідної концентрації гемодеривату з телячої крові, тобто, кінцевого продукту звичайно в діапазоні 50-500 г гемодеривату з телячої крові на 1 літр розчину.

45 Нормалізація кінцевого продукту гемодеривату з телячої крові

[0057] Далі отриманий у такий спосіб розчин охолоджують до 2-15 °C, переважно до 4-8 °C і центрифугують в охолоджуваній центрифугі при 3-20 G, переважно при 15 G протягом 30-90 хвилин, переважно 60 хвилин. Центрифугування дозволяє вилучити всі небажані нерозчинені речовини, що утворюються при седиментації. Надосадкову рідину, тобто розчин над осадом, що

50 містить гемодериват з телячої крові, модифікують розчином етанолу, як для одержання необхідної концентрації гемодеривату з телячої крові на 1 літр розчину, так і для досягнення концентрації етанолу в інтервалі 16 - 19 масових відсотків, і одержують кінцевий продукт. Даний вміст етанолу забезпечує стійкість кінцевого продукту до мікробного впливу.

55 [0058] Кінцевий продукт гемодеривату з телячої крові візуально характеризується аморфною структурою, обумовленою способом його одержання відповідно до даного винаходу, при цьому в процесі одержання продукту забезпечується повне видалення небажаних домішок або скорочення вмісту таких домішок до мінімальної кількості.

Допоміжні операції

60 [0059] Етанол-ефірний розчин, що містить ліпіди, ректифікують для відновлення розчинників.

[0060] Екстраговану ферментовану кров піддають вакуумному висушуванню також з метою відновлення розчинника, тобто етанолу.

Використання гемодеривату з телячої крові

[0061] Спосіб одержання гемодеривату з телячої крові призначений для виготовлення природного дієтика, використовуваного в якості харчової добавки або медичного препарату, для підвищення імунітету організму людини і для застосування у ветеринарії. При використанні людиною препарат може знайти застосування в області дієтології, фармацевтики і косметики. Гемодериват з телячої крові може бути використаний у різних формах, таких як розчини, наприклад, для перорального використання, для ін'єкцій або у формі таблеток, капсул або у формі кремів і пін.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб біотехнологічного одержання гемодеривату з телячої крові, що включає наступні етапи:

- свіжоодержану телячу кров спочатку ферментують у кілька етапів, в основному у два етапи, при підвищеній температурі нагрівачого повітря,
- отриманий продукт ферментування крові висушують,
- висушений продукт ферментування крові дезінтегрують,
- потім проводять екстрагування продукту ферментування крові етанолом у кілька етапів,
- продукт ферментування крові піддають вакуумному згущенню в основному до кінцевої концентрації, що в 20 раз перевищує початкову концентрацію, і далі відокремлюють небажані речовини,
- отриманий сконцентрований екстракт піддають одноступінчастій обробці ефіром, у процесі якої сконцентрований продукт ферментування крові піддають ефірному осадженню, і отриманий осад відокремлюють від розчину небажаних речовин, розчинених в ефірі,
- нарешті, проводять нормалізацію кінцевого продукту, доводячи гемодериват з телячої крові у воді до необхідної концентрації,

який **відрізняється** тим, що:

- для ферментування безпосередньо отриману телячу кров заповнюють у невеликі ємності таким чином, щоб рівень кров'яної маси досягав висоти 2,5-3 см, кров'яну масу поступово нагрівають доти, доки температура крові не досягне 55-65 °С у своїй масі, переважно 60 °С, і далі починається другий етап ферментування, у процесі якого температура навколишнього нагрівачого повітря, знижується приблизно з 80 °С на першому етапі ферментування до 65-75 °С, переважно 70 °С, і по досягненні зазначеної температури протікає другий етап ферментування, протягом якого між температурою нагрівачого повітря і температурою кров'яної маси підтримується постійний температурний перепад, що становить 5 °С, і протягом другого етапу відбувається аутоферментативне розщеплення крові, доки вся кров'яна маса не набуде тягучої консистенції продукту ферментування крові,
- отриманий продукт ферментування крові висушують із використанням керованої вентиляції відповідно до кривої висушування при 60-80 °С протягом 120-160 годин, переважно при 70 °С протягом 140 годин доти, доки не буде досягнутий кінцевий вміст вологи, що становить приблизно 10 %, переважно 2-3 %,
- далі висушений продукт ферментування крові розділяють на частки розміром 1-10 мм, переважно 2-4 мм,
- відокремлений продукт ферментування крові піддають безперервному екстрагуванню в кілька етапів, переважно в 4 етапи шляхом впливу постійно чистого етанолу в екстракторі типу Сокслет при загальному часі екстрагування, що становить 150-400 годин, переважно 240 годин при 70-78 °С, при цьому екстракти продуктів ферментування крові поєднують у процесі повторного екстрагування,
- отримані таким способом об'єднані екстракти продукту ферментування крові піддають стабілізації шляхом відокремлення небажаних солей крові при кімнатній температурі протягом 24-120 годин, переважно 72 годин, при цьому загальний час стабілізації відраховують від початку процесу одержання останнього екстракту продукту ферментування крові,
- після проведення наступного вакуумного згущення стабілізований сконцентрований екстракт продукту ферментування крові піддають ефірній обробці в кілька етапів, для одержання осаду гемодеривату з телячої крові, при цьому кожний з осадів, одержуваний у результаті проведення процесу, розчиняють у такій кількості етанолу доти, доки не відбудеться кількісне розчинення гемодеривату з телячої крові і не утвориться справжній розчин гемодеривату з телячої крові для

наступної ефірної обробки, і відокремлюють розчин, що містить розчинені в ефірі небажані фосфоліпіди, над відфільтрованим осадом,

- після зазначеної повторної обробки отриманий осад гемодеривату з телячої крові стабілізують, для відокремлення залишкового небажаного ефіру від зазначеного осаду,

5 - отриманий таким способом гемодериват з телячої крові спочатку розчиняють в етанолі з утворенням справжнього розчину і далі зазначений розчин піддають вакуумному згущенню при 25-40 °С, переважно при 28 °С, з одержання дистиляту ефіру, після чого проводять нормалізацію кінцевого продукту.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що:

10 у процесі нормалізації кінцевого продукту отриманого після випарювання, залишок гемодеривату з телячої крові розчиняють у дистильованій воді до необхідної концентрації, що становить 50-500 г на 1 літр розчину, отриманий водний розчин етанолу центрифугують в охолоджуваній центрифугі для видалення нерозчинених речовин і утворення надосадової рідини, після відокремлення осадженням нерозчинних речовин, нормалізують до концентрації

15 гемодеривату з телячої крові 50-500 г на 1 літр розчину і до необхідної концентрації етанолу в діапазоні від 16 до 19 мас. %.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що:

екстрагування етанолом продукту ферментування крові і/або вакуумне згущення екстракту продукту ферментування крові, і/або вакуумне згущення етанол-ефірного гемодеривату з

20 телячої крові проводять у захисній атмосфері інертного газу, наприклад в атмосфері азоту.

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601