

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLŮVĚHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2009-117**
(22) Přihlášeno: **26.02.2009**
(40) Zveřejněno: **08.09.2010**
(Věstník č. 36/2010)
(47) Uděleno: **28.03.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **09.05.2012**
(Věstník č. 19/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 161

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)
A23J 1/06 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

CZ 279 147; CZ 278 455; CS 228 038.

(73) Majitel patentu:

SVUS Pharma, a. s., Hradec Králové, CZ

(72) Původce:

Trávníček Dušan Ing., Holice, CZ

(74) Zástupce:

Ing. Marie Smrčková, patentový zástupce, Velflíkova 10,
Praha 6, 16000

(54) Název vynálezu:

Způsob biotechnologické výroby bovinního hemoderivátu

(57) Anotace:

Způsob biotechnologické výroby bovinního hemoderivátu, zahrnující tyto kroky v časové návazné sekvenci:

- 1) Fermentace krve v několika fázích, např. ve 2 fázích
- 2) Sušení krevního fermentátu
- 3) Rozdružení krevního fermentátu
- 4) Ethanolicá extrakce krevního fermentátu v několika fázích, např. ve 4 fázích výhodně v ochranné inertní atmosféře
- 5) Stabilizace získaného extraktu krevního fermentátu oddělením krevních solí
- 6) Vakuové zahušťování extraktu krevního fermentátu s následnou stabilizací extraktu oddělením krevních solí výhodně v ochranné inertní atmosféře
- 7) Ethericko-etanolická preparace zahuštěného extraktu v několika fázích, např. ve 3 fázích z důvodu odstranění fosfolipidů
- 8) Stabilizace sraženiny bovinního hemoderivátu oddělením etherického roztoku
- 9) Vakuové zahušťování získaného ethanolicke-etherického roztoku bovinního hemoderivátu, výhodně v ochranné inertní atmosféře
- 10) Rozpouštění odparku bovinního hemoderivátu v destilované vodě
- 11) Standardizace finálního produktu bovinního hemoderivátu.

CZ 303161 B6

Způsob biotechnologické výroby bovinního hemoderivátu

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu biotechnologické výroby bovinního hemoderivátu. Čerstvě odebraná zvířecí krevní hmota, a to čerstvá hovězí krev, se nejprve fermentuje v několika fázích, obvykle ve dvou fázích, za zvýšené teploty topného vzduchu. Získaný krevní fermentát se suší, obvykle při teplotách od 30 do 100 °C. Sušený krevní fermentát se rozdruží. Následně se provádí ethanolicke
 10 lická extrakce krevního fermentátu v několika fázích. Extrakt krevního fermentátu se podrobí jednomu vakuovému zahušťování, obvykle na výslednou koncentraci cca 20krát vyšší než původní, s následným odstraněním nežádoucích látek. Získaný zahuštěný extrakt se podrobí jedné etherické preparaci, při níž se zahuštěný krevní fermentát podrobí srážení diethyletherem a získaná sraženina se oddělí od roztoku nežádoucích fosfolipidů rozpuštěných v etheru. Provádí se standardizace finálního produktu.
 15

Dosavadní stav techniky

20

V českém A.O. č. 228 038 je popsán způsob výroby tkáňového preparátu z rostlinné nebo živočišné tkáně extrakcí těchto tkání ethanolem. Na tkáň se působí ethanolem vícestupňově v rozmezí 3 až 100 dnů za teploty od 10 do 100 °C, s výhodou od 70 do 85 °C. Získaný extrakt se zkoncentruje na 5 až 50 % původního objemu, vysráží se etherem nebo jiným rozpouštědlem. Sraženina se promyje etherem, usuší se a vysušená sraženina se rozpustí.
 25

25

Předností vynálezu je užití získaného preparátu pro léčbu a regeneraci buněk v živých organizmech. Extrakční proces se provádí tak, že se extrahuje extrahovadlem.

30

Nevýhodou takto prováděné extrakce je umístění extrahované látky mimo prostor vařáku, čímž dochází k větším energetickým ztrátám s negativním dopadem na snížení teploty extrakčního procesu. Nevýhodou je také přítomnost oxidační atmosféry při této extrakci, negativně ovlivňující chemickou stabilitu extraktu. Další nevýhodou tohoto vynálezu je nízká selektivita jedноступňové etherické preparace, tj. fyzikální nepřístupnost nežádoucích látek ve sraženině pro působení etheru. Sraženina je kompaktní olejovitou fází. Ve vynálezu je popsán postup, že sraženina účinných látek se vyčistí od nežádoucích fosfolipidních látek dalším přídavkem etheru, čímž poměrně obtížně vzniká emulze, tedy mikročástice sraženiny, zadržující fosfolipidy. Tudiž vyčištění sraženiny od fosfolipidů je obtížné, nedochází ke kvantitativnímu odstranění fosfolipidů ze sraženiny, ale pouze k částečnému odstranění fosfolipidů. Navíc, tento způsob vyžaduje po etherické preparaci zahuštěného ethanolickeho extraktu krevního fermentátu sušení pro odstranění etheru. Vzniká určité nebezpečí výbuchu a úniku etheru do okolí, čímž může dojít k zatížení životního prostředí. Odparek bez přítomnosti etheru se stává mikrobiálně náchylný a je vystaven oxidační atmosféře, takže může dojít k nekontrolovatelnému štěpení odparku vlivem kyslíku.
 35

40

V českém patentu CZ 279 147 je popsán způsob biotechnologické výroby prostředku, stimulující obranyschopnost organismu, extrakcí krevní zvířecí hmoty. Za čerstva odebraná zvířecí krevní hmota se podrobí enzymatickému štěpení ve 2 fázích. Nejprve při teplotě v rozmezí 80 až 85 °C po dobu 3 hodin, ve druhé fázi při teplotě 70 až 75 °C po dobu 48 hodin. Potom se získaná hmota suší při teplotě 75 až 80 °C a maximální vlhkosti 35 % po dobu 120 až 160 hodin, dezintegruje se na velikost zrn 500 μm. Potom se provede extrakční flotace ve vznosu krevní hmoty cirkulací extrakčního činidla, kterým jsou alifatické alkoholy do 4 atomů uhlíku s maximálním obsahem vody do 5 % za jeho současného ohřívání na teplotu 50 až 55 °C. Trvalý kontakt extrahovaného média s extrakčním činidlem se zajišťuje udržováním např. dezintegrovaného fermentátu ve vznosu. Z takto získaného extraktu se odstraní preparací lipidické podíly. Standardizace konečného produktu je provedena pouze úpravou koncentrace účinných látek ve vodném roztoku, není řešena mikrobiologická stabilita konečného produktu.
 45
 50
 55

Výhodou tohoto vynálezu je nízká energetická náročnost v oblasti ethanolické extrakce, protože z procesu je významně vyloučeno kondenzační teplo extrahovačla. Při řízené fermentaci zřejmě dochází k vyšší produkci účinných látek, než u vynálezu předchozího.

Nevýhodou tohoto vynálezu je, že extrakční proces se provádí maceračním způsobem, při němž se vyextrahované krevní soli nevylučují na topném registru, ale prochází celým technologickým procesem až do finálního produktu. Nežádoucí krevní sole se nevylučují z důvodu nízké koncentrace extraktu, což je způsobeno použitím vysokého přebytku extrahovačla – ethanolu vzhledem k extrahované látce – fermentované krvi. Toto negativum patent řeší vychlazovacím procesem, který však není dostatečně účinný z hlediska odstraňování nežádoucích krevních solí. Jedná se o krátký proces při nízké teplotě, takže se dá předpokládat, že vlastní proces vylučování nežádoucích látek probíhá s nízkou účinností. Navíc po etherické preparaci, se sraženina rozpouští v destilované vodě, takže jsou přítomna celkem tři rozpouštědla, stopově ethanol, významně diethyl-ether a dominantně destilovaná voda. Po následném vakuovém odpaření etheru, případně i ethanolu vznikne převážně vodný roztok, který je náchylný k mikrobiálnímu rozvoji. I v tomto případě jednostupňová etherická preparace je nedostačující ve smyslu získávání čistého finálního produktu. Další nevýhodou je, že fermentace ve druhé fázi probíhá po relativně dlouhou dobu cca 48 hodin kolem 70 až 75 °C, což má zřetelný vliv na ekonomiku procesu fermentace. Rozdružení krevního fermentátu na velikost částic do 0,5 mm je nutné pro následující proces extrakce, prováděný macerací ve vlnosu. Konečný produkt vykazuje vizuálně krystalickou strukturu, díky postupu výroby podle tohoto vynálezu, vzhledem k vysokému zastoupení krevních solí.

Společnou nevýhodou obou uvedených vynálezů, založených na bovinním fermentu je přítomnost nežádoucích látek, které ředí koncentraci účinné látky, a některé z nich mohou podléhat oxidaci případně žluknutí konečného produktu.

Podstata vynálezu

Uvedené nevýhody se odstraní nebo podstatně omezí způsobem biotechnologické výroby bovinního hemoderivátu podle tohoto vynálezu. Čerstvě odebraná zvířecí krevní hmota se nejprve fermentuje v několika fázích, získaný krevní fermentát se suší, sušený krevní fermentát se rozdruží, následně se provádí ethanolická extrakce krevního fermentátu v několika fázích, krevní fermentát se podrobí jednomu vakuovému zahušťování s následnou stabilizací pro odstranění nežádoucích látek. Zahuštěný extrakt se podrobí etherické preparaci, při níž se zahuštěný krevní fermentát podrobí srážení etherem, a získaná sraženina se oddělí od roztoku nežádoucích látek rozpuštěných v etheru.

Podstata tohoto vynálezu spočívá v tom, že při fermentaci, bezprostředně získaná zvířecí krevní hmota, přednostně hovězí krev, se vloží do vaniček s výškou hladiny krevní hmoty 2,5 až 3 cm, a zahřívá se postupně až dosáhne ve své hmotě teploty 55 až 65 °C, s výhodou 60 °C, poté nastává druhá fáze fermentace, při níž se teplota okolního topného vzduchu sníží, z teploty kolem 80 °C v první fázi fermentace, na 65 až 75 °C, s výhodou 70 °C. Po dosažení této teploty probíhá druhá fáze fermentace, při níž se udržuje konstantní teplotní rozdíl 5 °C mezi topným vzduchem a teplotou krevní hmoty, po dobu 5 až 20 hodin, s výhodou 12 hodin, při ní probíhá autoenzymatické štěpení krevní hmoty. Během druhé fáze fermentace se změní veškerá krevní hmota na gumovitou konzistenci, čímž je druhá fáze fermentace ukončena.

Definovaná výška hladiny krevní hmoty je optimální pro efektivní průběh enzymatických procesů. Výška hladiny byla stanovena experimentálně. Pokud by byla výška hladiny vyšší, mělo by to pozitivnější vliv na enzymatické procesy, ale přestup tepla v první fázi fermentace by byl nedostačující pro rychlé docílení teploty. Při nižší hladině by docházelo ke zkrácení fermentačního procesu, a tudíž i k nižšímu využití vkládaného materiálu.

Fermentace podle tohoto vynálezu je časově poměrně krátká, tudíž i ekonomicky výhodná vzhledem ke stávajícímu stavu techniky. Definování optimální hodnoty teploty ve hmotě řeší rychlý nástup pasterizační teploty, tj. vyloučení mikrobiálního znečištění a nastartování autoenzymatického štěpení krevní hmoty ve druhé fázi fermentace. Když by tato teplota byla vyšší, zkrátí by se neúměrně fermentační čas druhé fáze. Pokud by tato teplota byla nižší, probíhala by druhá fáze fermentace s nižší účinností a s vysokou pravděpodobností nežádoucího mikrobiálního rozvoje. Definované časové intervaly obou fází fermentace byly získány dlouhodobými provozními zkouškami.

Získaný krevní fermentát se suší při řízeném větrání dle sušicí křivky při teplotě 60 až 80 °C po dobu 120 až 160 hodin, s výhodou při teplotě 70 °C a době 140 hodin, až na konečný obsah vlhkosti do 10 %, s výhodou 2 až 3 % vlhkosti. Řízené větrání po ukončení druhé fáze fermentace se optimalizuje s ohledem na ekonomiku provozu, při zachování kvality získaného fermentátu. Definované teploty i časy sušení jsou výsledkem dlouhodobých experimentálních zkoušek. Definovaná vlhkost je optimální z hlediska minimálního zavádění vody do technologického procesu následné extrakce.

Vysušený krevní fermentát se následně rozdruží na velikost částic 1 až 10 mm, s výhodou 2 až 4 mm. Nárokovaná velikost částic je optimální pro následný extrakční proces s ideálními reologickými vlastnostmi, tj. aby odpor vrstvy částic byl malý vůči průtoku extrahovadla v procesu následné extrakce, ale zároveň aby se neprodložovala doba extrakce, která by nastala s částicemi o velikosti větší než 4 mm.

Rozdružený krevní fermentát se podrobí kontinuální extrakci v několika fázích, s výhodou ve 4 fázích, permanentně čistým ethanolem v extraktoru Soxhletova typu, přičemž hmotnostní poměr vloženého krevního fermentátu k přidávanému čistému ethanolu je 1/3 až 20/1 pro všechny fáze extrakce, s celkovou extrakční dobou 200 až 400 hodin, s výhodou 240 hodin, při teplotě 70 až 78 °C, během opakované extrakce se extrakty krevních fermentátů spojují. Extrakce krevního fermentátu v několika fázích podle tohoto vynálezu je výhodná k získávání stále čistého extrakčního činidla, jehož působení na krevní fermentát při teplotě blízké varu umožní snížit množství použitého ethanolu v procesu a využít koncentrování získávaného extraktu v prostoru vařáku, a to s průběžným oddělováním vylučovaných nežádoucích krevních solí. Pro tento způsob je extraktor Soxhletova typu s ohřevem extrahovaného fermentátu ideální. Z každé extrakce se získá extrakt, který se soustřeďuje v jedné jímací nádobě. Počet extrakcí v počtu 4 je výhodný a odzkoušený jako dostačující pro získání co nejvyššího množství vyextrahovaných látek. Definovaný rozsah teplot je optimální pro rychlost extrakcí a použitá doba je nutná z pohledu širokého spektra extrahovaných žádoucích látek.

Spojené extrakty krevního fermentátu se podrobí jeho stabilizaci oddělením od krevních solí, a to při teplotě okolí po dobu 24 až 120 hodin, s výhodou 72 hodin, přičemž celková doba stabilizace se míní od počátku získání posledního extraktu krevního fermentátu. Stabilizace má za účel odstranit nežádoucí krevní sole, které se v průběhu času vylučují během jednotlivých operací.

Po následném vakuovém zahuštění se stabilizovaný zahuštěný extrakt krevního fermentátu podrobí etherické preparaci v několika fázích pro získání sraženiny bovinního hemoderivátu, přičemž každá takto vzniklá sraženina se podrobí rozpouštění v ethanolu v množství, až dojde ke kvantitativnímu rozpouštění sraženiny bovinního hemoderivátu do vzniku pravého roztoku bovinního hemoderivátu k následné etherické preparaci, a roztok nad dekantovanou sraženinou, obsahující nežádoucí fosfolipidy rozpustné v diethyletheru, se odděluje. Lipidy, které jsou uzavřeny v olejovité sraženině bovinního hemoderivátu, jsou rozpouštěním v ethanolu zpřístupněny na další působení etheru.

Po opakované preparaci se získaná sraženina bovinního hemoderivátu stabilizuje za účelem oddělení zbytkového nežádoucího etheru od této sraženiny.

55

Stabilizovaná sraženina bovinního hemoderivátu se nejdříve rozpustí v ethanolu do pravého roztoku, který se následně vakuově zahušťuje při teplotě 25 až 40 °C, s výhodou při teplotě 28 °C, do získání destilátu prostého etheru. Rozpouštění v ethanolu je výhodné oproti rozpouštění ve vodě, tím, že se vytváří roztok mikrobiálně stabilní, a to až do konečné fáze, tj. do technologického kroku standardizace. Při daných teplotách se snadno odpařuje z ethanolického roztoku již nežádoucí ether.

Získaný odparek bovinního hemoderivátu se rozpustí destilované vodě na koncentraci 50 až 500 g na 1 litr roztoku. Získaný vodně-ethanolický roztok se odstředí na chlazené centrifuze pro odstranění nerozpuštěných látek, a vzniklý supernatant po oddělení sedimentu nerozpuštěných látek se standardizuje na koncentraci bovinního hemoderivátu 50 až 500 g na 1 litr roztoku a na požadovanou koncentraci ethanolu v rozmezí 16 až 19 % hmotn. Teprve v tomto technologickém kroku se poprvé využije jako rozpouštědlo destilovaná voda, a to z toho důvodu, že konečná koncentrace ethanolu musí být na úrovni deklarovaných 16 až 19 % hmotn., které zabezpečují mikrobiální stabilitu roztoku. Zároveň případně vzniklé nerozpustné látky v tomto vodně-alkoholickém prostředí se odstraní výhodně odstředěním na chlazené odstředivce. Chlazení odstředivky se používá z hlediska nebezpečí zahřátí bovinního hemoderivátu při odstřeďování, což by mohlo vést k jeho termické degradaci.

Hlavní výhodou tohoto vynálezu je získání velmi kvalitního, mikrobiálně a chemicky stabilního produktu, s vysokým obsahem bovinního hemoderivátu a s minimálním nebo žádným obsahem nežádoucích fosfolipidů a krevních solí, a to postupem, který od fáze ethanolické extrakce je vždy chráněn před mikrobiálním znečištěním a oxidačním působením vzduchu. Je vyloučen jakýkoliv proces výskytu pouze vodného roztoku, tedy vody jakožto rozpouštědla, který je v případě výskytu biologických látek vysoce citlivý na mikrobiální rozvoj. Vlivem stále dodávaného čerstvého rozpouštědla při procesu extrakce se získává extrakt o vyšší koncentraci s nesporným pozitivním vlivem na následné postupné vylučování nežádoucích organických solí. Opakovaná etherická preparace založená na periodickém vzniku a rozpouštění sraženiny bovinního derivátu do pravého roztoku umožňuje téměř kvantitativní odstranění lipidních látek. Vzhledem ke stávajícím technikám získání bovinního hemoderivátu je způsob podle tohoto vynálezu rychlejší, a ekologicky šetrnější.

Ethanolická extrakce krevního fermentátu a/nebo vakuové zahušťování extraktu krevního fermentátu, a/nebo vakuové zahušťování ethanolicko-etherického bovinního hemoderivátu, může s výhodou probíhat v ochranné např. dusíkové atmosféře. Vstup dusíku do zařízení extraktoru nebo do vakuové cirkulační odparky, v průběhu procesu extrakce nebo vakuového cirkulačního zahušťování, vytváří v ethanolu respektive v extraktu, proud bublin, které promíchávají kapalinu a zamezují výskytu utajeného varu extraktu popřípadě čistého ethanolu. Atmosféra nad hladinou extraktu či nad hladinou roztoku bovinního hemoderivátu při vakuovém zahušťování zároveň plní ochrannou funkci inertního plynu před oxidačním působením kyslíku.

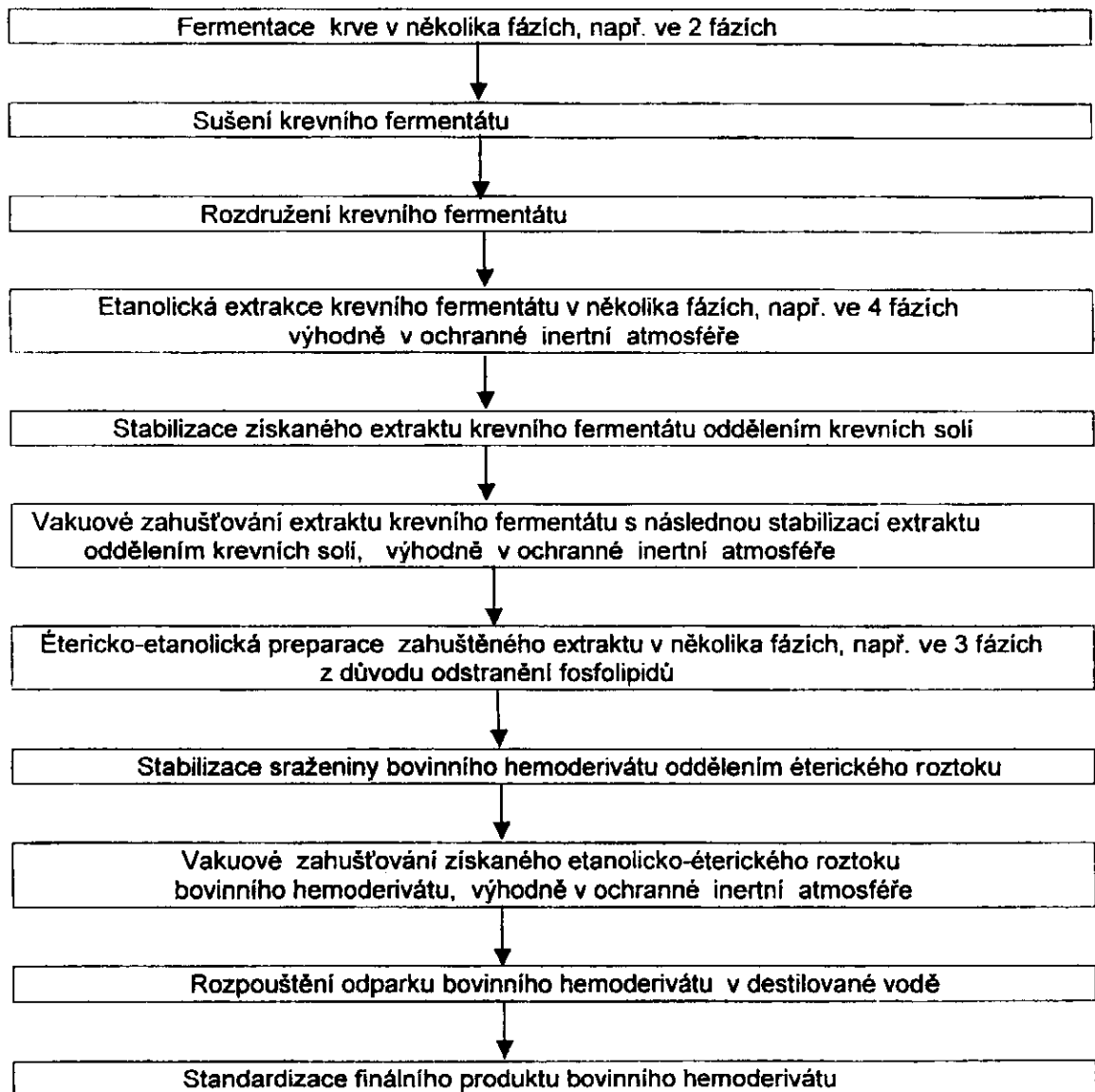
Použití bovinního hemoderivátu ve vodně-ethanolickém roztoku, s obsahem 50 až 500 g bovinního hemoderivátu na 1 litr vodně-ethanolického roztoku, obsahujícího 16 až 19 % hmotn. ethanolu, je vhodné pro přípravu dietetického prostředku pro zvýšení imunity organismu pro humánní a veterinární účely. Humánním účelem se rozumí nejen dietetické přípravky či léčiva, též kosmetika.

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad 1

Způsob biotechnologické výroby bovinního hemoderivátu, je uveden pro přehlednost v následujícím přehledu, který shrnuje celý postup jednotlivých technologických operací v časově návazné souslednosti:

10



Konkrétní příkladné provedení je dále popsáno po jednotlivých technologických operacích, navazujících na sebe.

15

Fermentace hovězí krve ve dvou fázích

Surová hovězí krev se v přepravní nádobě vysokoobrátkovým míchadlem rozdruží na částice o maximální velikosti 30 mm. Rozdružená krev se rozlije do nerezových vaniček tak, aby výška hladiny hmoty byla 2,5 až 3 cm.

20

Dále následuje fermentace ve dvou fázích, tj. autoenzymatické štěpení za působení tepla, času a enzymů obsažených v surové krvi.

5 Fermentace v první fázi probíhá následovně. Vaničky s krevní hmotou se vloží do sušárny, přičemž výchozí teplota krevní hmoty by měla být minimálně 30 °C. Do vybrané vaničky se ponoří registrační teploměr, sušárna se uzavře, nastaví se teplota ohřevu vnitřního prostoru sušárny na hodnotu kolem 75 až 85 °C, s výhodou 80 °C, po dobu 2 až 2,5 hodiny. Sušárna se zapne s režimem vnitřní cirkulace vzduchu.

10 Druhá fáze fermentace nastává v době, kdy teplota v krevní hmotě dosáhne teploty v rozsahu 55 až 65 °C, s výhodou 60 °C. Od této chvíle se teplota topného vzduchu řídí tak, aby rozdíl mezi teplotou krevní hmoty a topného vzduchu byl po celou dobu fermentace konstantní s diferencí 5 °C. V této druhé fázi fermentace se krevní hmota přemění v gumovitou konzistenci, čímž je ukončena druhá fáze fermentace.

15 Sušení krevního fermentátu

20 Získaná fermentovaná krevní hmota se za tepla rozřeže na díly např. 10 x 10 cm. Následně se získaný krevní fermentát podrobí sušení v sušárně při teplotě 60 až 80 °C, s výhodou 70 °C. Sušení rozřezaných dílků krevního fermentátu se tak provádí v sušárně při řízeném větrání.

Míra odvětrávání vnitřní atmosféry sušárny se řídí sušicí křivkou, jejíž průběh je ukončen po 120 až 160 hodinách s výhodou po 132 až 156 hodinách na konečný obsah vlhkosti do 1 až 10 % v krevním fermentátu, s výhodou 2 až 3 % vlhkosti.

25 Rozdružení krevního fermentátu

30 Vysušený krevní fermentát se následně rozdruží na optimální velikost částic 1 až 10 mm, s výhodou 2 až 4 mm, nejvhodnější pro následné technologické procesy.

Ethanolická extrakce krevního fermentátu ve čtyřech fázích

35 Kontinuální extrakce takto získaného vysušeného krevního fermentátu se provádí stále čistým ethanolem, v ekstraktoru Soxhletova typu, při teplotě 60 až 78 °C, s výhodou blíže k horní hranici 78 °C, v 96% ethanolu. Při vyšší teplotě se vysušený krevní fermentát lépe extrahuje.

40 Do extrakčního koše, s perforovaným dnem a přepadem nad úrovní extrahované látky, se vloží fermentovaná krev. Ke krevnímu fermentátu se přidá minimálně 1/3 hmotnosti 96% ethanolu, aby proběhla žádaná extrakce. Čím víc se přidá ethanolu, tím rychleji a účinněji proběhne extrakce, ale s příliš velkým přebytkem ethanolu se zhoršuje ekonomika extrakce a může nastat situace velkého přebytku ethanolu, který se potom musí obtížně odstraňovat. Takže vysušený krevní fermentát se převrství 96% ethanolem s tím, že z celkového ethanolu se cca 35 % nachází v prostoru vařáku, zbytek v extrakčním koši.

45 První extrakce probíhá tak, že po prvních 3 až 4 hodinách, s výhodou 24 hodinách extrakce se získaný první extrakt z vařáku vypustí do zásobníku extraktu, nacházející se mimo extraktor. Prostor vařáku extraktoru se poté vyčistí teplou vodou od vyloučených solí.

50 Do vařáku extraktoru se znovu nalije 96% ethanol. Druhá a další dvě extrakce dosud nevyextrahovaného krevního fermentátu pokračují. Extrakční proces je přerušen po 20 až 60 hodinách, s výhodou ve 48. hodině pro ukončení druhé fáze extrakce, kdy se získá druhý extrakt krevního fermentátu, a dalších 50 až 90 hodinách, s výhodou ve 72. hodině pro ukončení třetí fáze extrakce, při němž se získá třetí extrakt krevního fermentátu. Při druhé i třetí extrakci se provádí stejné operace jako v první fázi extrakce, ukončené po 24 hodinách provozu extraktoru. Tj. i množství přidávaného ethanolu ve třetí fázi extrakce je shodné jako u druhé fáze.

Získaný druhý i třetí extrakt krevního fermentátu se vždy po ukončení příslušné extrakce vypustí do zásobníku extraktu.

5 Poslední čtvrtá extrakce je ukončena ve 150 až 400 hodinách, s výhodou ve 240. hodině. Po této poslední čtvrté extrakci se poslední čtvrtý extrakt vypustí do zásobníku extraktu. Tedy, po čtyřech extrakcích se takto získají čtyři spojené extrakty krevního fermentátu v zásobníku extraktu.

10 Zvolené časy extrakce jsou voleny tak, aby byly optimální z hlediska získávání extraktu. Při nízkých časech jednotlivých fází extrakcí je nebezpečí nižší výtěžnosti extraktu krevního fermentátu. Při delších časech jednotlivých fází extrakcí jsou zbytečně termicky zatěžovány již vyextrahované podíly extrakce, které se musí udržovat ve vařáku extraktorů při teplotě varu, aby se získaly čisté ethanolové páry pro následnou extrakci.

15 Ideální hmotnostní poměr vložené fermentované krve k přidávanému 96% ethanolu je 1/3 až 20/1 pro všechny čtyři fáze extrakce.

20 Takto provedenou ethanolovou extrakcí se získá poměrně koncentrovaný spojený extrakt krevního fermentátu, který, např. ve srovnání s postupem dle CS 228 038 a CZ 279 147, je 7 až 8x koncentrovanější, při stejném množství vloženého krevního fermentátu.

25 Tato ethanolická extrakce se může provádět v ochranné inertní např. dusíkové atmosféře, čímž se vyloučí výskyt utajeného varu ethanolu, popř. vzniklého extraktu, a současně se projeví kladné účinky inertní atmosféry na zejména chemickou stabilitu vyextrahovaných látek.

Stabilizace extraktu krevního fermentátu oddělením krevních solí

30 Takto získaný spojený extrakt krevního fermentátu se v zásobníku extraktu stabilizuje po dobu 24 až 120 hodin, s výhodou 72 hodin, při teplotě okolí, z důvodu oddělení nežádoucích krevních solí, např. kyanoželeznatanů atp. Čím déle stabilizace probíhá, tím je účinnější. Stabilizace může probíhat třeba i rok, avšak je to ekonomicky nevýhodné. Nežádoucí krevní soli se následně odfiltrují nebo se odčerpá vyčeřený roztok extraktu krevního fermentátu do jiného zásobníku.

Vakuové zahuštění extraktu krevního fermentátu

35 Ze zásobníku extraktu se odčerpá přefiltrovaný extrakt krevního fermentátu postupně do vakuové cirkulační odparky. Zde se z extraktu odpařuje přebytečný ethanol při teplotě 40 až 70 °C, s výhodou 50 až 60 °C.

40 Zahuštění se provede v poměru 1:5 až 1:40, s výhodou v poměru 1:20, a to v poměru konečného zahuštěného koncentrovaného extraktu ku vloženému extraktu, tj. jedná se např. o výhodné 20násobné zkoncentrování extraktu krevního fermentátu. Bezprostředně po ukončení odpařování se takto zahuštěný extrakt za tepla vypustí z varného prostoru odparky do předlohy, kde se podrobí stabilizaci.

45 Vakuové zahušťování extraktu krevního fermentátu se může provádět v ochranné inertní, např. dusíkové atmosféře. Zamezí se tak vzniku utajeného varu extraktu. Inertní atmosféra podporuje zejména chemickou stabilitu vyextrahovaných látek.

50 Stabilizace zahuštěného extraktu krevního fermentátu oddělením krevních solí

55 Stabilizace získaného zahuštěného extraktu krevního fermentátu se provádí po dobu 24 až 120 hodin, s výhodou 72 hodin, při teplotě okolí. Tato stabilizace se provádí též za účelem odstranění zbylých nežádoucích podílů krevních solí, které klesnou na dno či se vylučují na stěnách stabilizační nádoby. Při stabilizaci dochází k vykryštalizování zbylých nežádoucích podílů

krvních solí na dně či stěnách stabilizační nádoby. Nežádoucí krevní soli se odstraní filtrací nebo odčerpáním vyčereného roztoku extraktu krevního fermentátu.

Ethericko-ethanolická preparace zahuštěného extraktu krevního fermentátu ve třech fázích

Tento zahuštěný a stabilizovaný extrakt krevního fermentátu se následně zfiltruje od nežádoucích vyloučených krevních solí. Získaný ethanolický filtrát extraktu krevního fermentátu se nalije do nádoby s vrtulovým míchadlem pro provádění separace fosfolipidů. Preparace se provádí několikanásobným sražením extraktu krevního fermentátu 100% diethyletherem, a vznikne sraženina obsahující bovinní hemoderivát, a roztok nad sraženinou, obsahující nežádoucí fosfolipidy, rozpustné v diethyletheru, které se od sraženiny v každé fázi preparace oddělí. Sraženina bovinního hemoderivátu se rozpouští v ethanolu.

Podrobněji: První fáze preparace extraktu krevního fermentátu se provádí působením diethyletheru tak, že za stálého míchání se přidává po částech diethylether, a to v poměru objemového množství 1:1 až 20:1 k zahuštěnému extraktu krevního fermentátu, s výhodou v poměru dvojnásobku. Touto první fází etherické preparace extraktu krevního fermentátu se získá vyloučená sraženina bovinního hemoderivátu, který se ponechá volně sedimentovat, ethanolicko-etherický roztok nad sraženinou se od sraženiny oddělí.

Druhá fáze preparace sraženiny bovinního hemoderivátu se provádí působením ethanolu, která probíhá tak, že sraženina bovinního hemoderivátu z první fáze se rozpustí v 96% ethanolu, a to v takovém množství ethanolu, až dojde ke kvantitativnímu rozpuštění sraženiny bovinního hemoderivátu do pravého roztoku. Vzniklý roztok se opět sráží diethyletherem do vzniku sraženiny bovinního hemoderivátu. Takto vzniklý roztok nad sraženinou se oddělí.

Ve třetí fázi preparace se použije sraženina ze druhé fáze, ta se rozpustí v 96% ethanolu, opět v množství až dojde ke vzniku roztoku a vzniklý roztok se opět sráží diethyletherem. Vzniklý roztok nad sraženinou se oddělí.

Stabilizace sraženiny bovinního hemoderivátu oddělením etherického roztoku

Takto vzniklá sraženina se stabilizuje po dobu 10 až 40 hodin, s výhodou 24 hodin, při teplotě 10 až 40 °C, s výhodou 20 až 30 °C, za účelem maximálního oddělení sraženiny bovinního hemoderivátu od diethyletheru, který obsahuje poslední podíly nežádoucích fosfolipidů. Může se stát, že předchozí operace preparace proběhla téměř kvantitativně, a žádný roztok nad sraženinou bovinního hemoderivátu ani nevznikne. Většinou však obvykle roztok diethyletheru vzniká. Případně vzniklý roztok, oddělený od sraženiny se odčerpá, a takto získaná sraženina bovinního hemoderivátu se dále zpracovává následným postupem. Ideální poměr hmotnostní vložené fermentované krve k přidávanému 96% ethanolu je 1/3 až 20/1 pro všechny čtyři fáze extrakce, v závislosti na kvalitativní variabilitě vstupní surové krve.

Vakuové zahuštění ethanolicko-etherického roztoku bovinního hemoderivátu

Získaná sraženina se rozpustí v 96% ethanolu, a to v takovém množství, aby vznikl roztok. Tento roztok se vloží do vakuové rotační odparky, a následně se vytěsní vzduch z odparky kombinací podtlaku a přívodem ochranné atmosféry, např. dusíkem. Na vakuové rotační odparce se ze získaného roztoku odpaří směs zbytkového diethyletheru a s částí ethanolu při teplotě 25 až 40 °C, s výhodou 28 °C. Cílem tohoto odpařování je dosažení maximálního odpaření diethyletheru a minima odpařeného ethanolu. Odpaření je ukončeno při nulovém obsahu diethyletheru v parách nad odpařovaným roztokem. Tento postup vlivem vysoké koncentrace ethanolu v roztoku zajišťuje mikrobiální stabilitu. Zároveň prováděné odpařování při vakuu ochraňuje účinnou látku, bovinní hemoderivát, před oxidačním vlivem vzduchu.

5 Takto provedené vakuové odpařování je výhodné nejen pro odstranění diethyletheru, ale současně i ochraňuje bovinní hemoderivát před termickým namáháním a oxidačním působením vzduchu. Vakuová atmosféra ve vakuové odparce snižuje teplotu varu odpařovaného roztoku bovinního derivátu. Využití případné inertní atmosféry, např. dusíkové atmosféry v odparce
zabraňuje oxidačnímu působení kyslíku na bovinní hemoderivát.

Rozpuštění odparce bovinního hemoderivátu v destilované vodě

10 Získaný odparek obsahující částečně ethanol se zanalyzuje na obsah ethanolu a stanoví se jeho sušina, respektive stanoví se obsah sušiny bovinního hemoderivátu. Podle tohoto obsahu sušiny se odparek zředí sterilní destilovanou vodou na roztok vodně-ethanolický. Množství vody se volí tak, aby vznikla požadovaná koncentrace bovinního hemoderivátu, jako konečného výrobku, obvykle v intervalu 50 až 500 g bovinního hemoderivátu na 1 litr roztoku.

15 Standardizace finálního produktu bovinního hemoderivátu

Poté se takto získaný roztok ochladí na 2 až 15 °C, s výhodou 4 až 8 °C, a odstředí se na chlazené centrifuze při 3 až 20 G, s výhodou 15 G, po dobu 30 až 90 minut, s výhodou 60 min. Tím se odstraní veškeré nežádoucí nerozpuštěné látky, které vytvoří sediment, který se odstraní. Supernatant, roztok nad sedimentem, který obsahuje bovinní hemoderivát, se upraví roztokem ethanolu
20 jednak na koncentraci bovinního hemoderivátu na 1 litr roztoku a jednak na koncentraci ethanolu, obvykle v intervalu 16 až 19 hmotn. %, čímž se získá finální výrobek. Daný obsah ethanolu zajišťuje mikrobiální stabilitu finálního produktu.

25 Konečný produkt bovinního hemoderivátu vykazuje vizuálně amorfní strukturu, díky postupu výroby podle tohoto vynálezu, při němž se obsah nežádoucích příměsí odstraní nebo podstatně omezí na minimum.

Vedlejší operace

30 Lihetherický roztok s obsahem lipidů se rektifikuje za účelem obnovy rozpouštědla.

Vyextrahovaná fermentovaná krev se vakuově vysouší též z důvodu obnovy rozpouštědla ethanolu.

35

Použití bovinního hemoderivátu

40 Způsob výroby bovinního hemoderivátu je určen pro přípravu přírodního dietetického prostředku, jakožto doplňku stravy případně léčiva, pro zvýšení obranyschopnosti organismů, pro humánní a veterinární účely. Humánní oblastí se rozumí oblast výživy a farmaceutická oblast, a též oblast kosmetická. Bovinní hemoderivát může být využit v různých formách, od roztoku např. pro použití per os, injekční formou, nebo ve formě tablet, kapslí, případně ve formě krémů a pěn.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Způsob biotechnologické výroby bovinního hemoderivátu,
- při němž se čerstvě odebraná zvířecí krevní hmota, a to čerstvá hovězí krev, nejprve fermentuje v několika fázích, obvykle ve dvou fázích, za zvýšené teploty topného vzduchu,
 - 10 – získaný krevní fermentát se suší,
 - sušený krevní fermentát se rozdruží,
 - následně se provádí ethanolicá extrakce krevního fermentátu v několika fázích,
 - 15 – krevní fermentát se podrobí jednomu vakuovému zahušťování, obvykle na výslednou koncentraci cca 20krát vyšší než původní, s následným odstraněním nežádoucích látek,
 - získaný zahuštěný extrakt se podrobí jedné etherické preparaci, při níž se zahuštěný krevní fermentát podrobí srážení etherem, a získaná sráženina se oddělí od roztoku nežádoucích látek rozpuštěných v etheru,
 - 20 – nakonec se provádí standardizace konečného produktu na koncentraci bovinního hemoderivátu ve vodě,

25

vyznačující se tím, že

- při fermentaci, bezprostředně získaná zvířecí krevní hmota, přednostně hovězí krev, se vloží do vaniček s výškou hladiny krevní hmoty 2,5 až 3 cm, krevní hmota se zahřívá postupně, až dosáhne zahřívání krev ve své hmotě teploty 55 až 65 °C; s výhodou 60 °C, poté nastává druhá fáze fermentace, při níž se teplota okolního topného vzduchu sníží, z teploty kolem 80 °C v první fázi fermentace, na 65 až 75 °C, s výhodou 70 °C, a po dosažení této teploty probíhá druhá fáze fermentace, při níž se udržuje konstantní teplotní rozdíl 5 °C mezi topným vzduchem a teplotou krevní hmoty, při ní probíhá autoenzymatické štěpení krevní hmoty, až veškerá krevní hmota přejde do gumovité konzistence krevního fermentátu,
- 30 – získaný krevní fermentát se suší při řízeném větrání dle sušicí křivky při teplotě 60 až 80 °C po dobu 120 až 160 hodin, s výhodou při teplotě 70 °C a době 140 hodin, na konečný obsah vlhkosti do 10 %, s výhodou 2 až 3 %,
 - vysušený krevní fermentát se následně rozdruží na velikost částic 1 až 10 mm, s výhodou 2 až 4 mm,
 - rozdružený krevní fermentát se podrobí kontinuální extrakci v několika fázích, s výhodou ve 4 fázích, permanentně čistým ethanolem v extraktoru Soxhletova typu, přičemž hmotnostní poměr vloženého krevního fermentátu k přidávanému čistému ethanolu je 1/3 až 20/1 pro všechny fáze extrakce, s celkovou extrakční dobou 150 až 400 hodin, s výhodou 240 hodin, při teplotě 70 až 78 °C, během opakované extrakce se extrakty krevních fermentátů spojují,
 - 45 – takto získané spojené extrakty krevního fermentátu se podrobí stabilizaci tohoto fermentátu oddělením nežádoucích krevních solí, při teplotě okolí po dobu 24 až 120 hodin, s výhodou 72 hodin, přičemž celková doba stabilizace se míní od počátku získání posledního extraktu krevního fermentátu,
 - 50

- po následném vakuovém zahuštění se stabilizovaný zahuštěný extrakt krevního fermentátu podrobí etherické preparaci v několika fázích pro získání sraženiny bovinního hemoderivátu, přičemž každá takto vzniká sraženina se podrobí rozpouštění v ethanolu v množství, až dojde ke kvantitativnímu rozpouštění bovinního hemoderivátu do vzniku pravého roztoku bovinního hemoderivátu k následné etherické preparaci, a roztok nad dekantovanou sraženinou, obsahující nežádoucí fosfolipidy rozpustné v etheru, se odděluje,
 - po této opakované preparaci se získaná sraženina bovinního hemoderivátu stabilizuje za účelem oddělení zbytkového nežádoucího etheru od této sraženiny,
 - takto stabilizovaná sraženina bovinního hemoderivátu se nejdříve rozpustí v ethanolu do pravého roztoku, který se následně vakuově zahušťuje při teplotě 25 až 40 °C, s výhodou při teplotě 28 °C, do získání destilátu prostého etheru,
- načež se provede standardizace konečného produktu.

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že při standardizaci konečného produktu se získaný odparek bovinního hemoderivátu rozpustí v destilované vodě na požadovanou koncentraci 50 až 500 g na 1 litr roztoku, získaný vodně-ethanolickeý roztok se odstředí na chlazené centrifuze pro odstranění nerozpuštěných látek, a vzniklý supernatant po oddělení sedimentu nerozpuštěných látek se standardizuje na koncentraci bovinního hemoderivátu 50 až 500 g na 1 litr roztoku a na koncentraci ethanolu v rozmezí 16 až 19 % hmotn.

3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že ethanolickeá extrakce krevního fermentátu a/nebo vakuové zahušťování extraktu krevního fermentátu, a/nebo vakuové zahušťování ethanolickeo-etherickébo bovinního hemoderivátu probíhá v ochranné inertní atmosféře, např. dusíkové atmosféře.

Konec dokumentu
