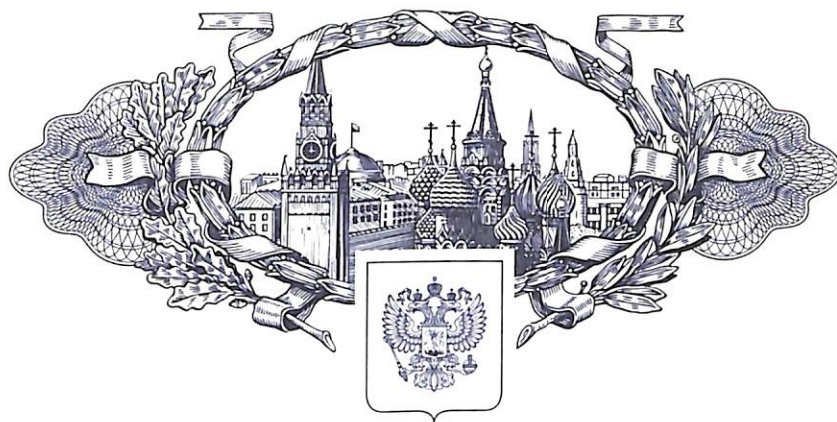


# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2562592

### СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МАСЛЯНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ГОЛОТУРИЙ, ОБЛАДАЮЩЕГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ (ВАРИАНТЫ)

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2013147387

Приоритет изобретения **23 октября 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **12 августа 2015 г.**

Срок действия патента истекает **23 октября 2033 г.**

*Заместитель руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности*

*Л.Л. Кирий*



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2013147387/15, 23.10.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.10.2013Приоритет(ы):  
(22) Дата подачи заявки: 23.10.2013

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2015 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 10.09.2015 Бюл. № 25

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
поиске: RU 2426453 C1, 20.08.2011. RU 2446822  
C2, 10.04.2012. RU 2236155 C2, 20.08.2011. RU  
2244547 C2, 21.01.2005Адрес для переписки:  
690087, г. Владивосток, ГСП, ул. Луговая, 52-Б,  
ФГБОУ ВПО "Дальрыбвтуз", Отдел по охране  
интеллектуальных прав, Первунинской Т.А.(72) Автор(ы):  
Пивненко Татьяна Николаевна (RU),  
Ким Георгий Николаевич (RU),  
Ковалев Николай Николаевич (RU),  
Позднякова Юлия Михайловна (RU),  
Давидович Валентина Владимировна (RU),  
Есипенко Роман Владимирович (RU),  
Михеев Евгений Валерьевич (RU)(73) Патентообладатель(и):  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
"Дальневосточный государственный  
технический рыбохозяйственный  
университет" (RU)(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МАСЛЯНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ГОЛОТУРИЙ, ОБЛАДАЮЩЕГО  
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ (ВАРИАНТЫ)

## (57) Формула изобретения

1. Способ получения масляного экстракта из голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами, включающий подготовку сырьевого материала, измельчение до гомогенного состояния, экстрагирование растительными жирами, отделение экстракта, отличающийся тем, что в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой 20-50 Гц, мощностью 250-300 Вт в течение 5-10 мин, затем гомогенат подкисляют введением 0,1%-1% органических кислот до pH 4,0-5,5 и выдерживают в течение от 40 минут до 2-х часов, после чего нейтрализуют до pH 7,0-7,5, подготовленный таким образом гомогенат перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5 соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C в течение 3-х часов, затем масляный экстракт отделяют.

2. Способ получения масляного экстракта из голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами, включающий подготовку сырьевого материала, измельчение до гомогенного состояния, экстрагирование растительными жирами, отделение экстракта, отличающийся тем, что в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой 20-50 Гц, мощностью 250-

Автор(ы): *Пивненко Татьяна Николаевна (RU), Ким Георгий Николаевич (RU), Ковалев Николай Николаевич (RU), Позднякова Юлия Михайловна (RU), Давидович Валентина Владимировна (RU), Есипенко Роман Владимирович (RU), Михеев Евгений Валерьевич (RU)*

300 Вт в течение 5-10 мин, затем его сушат до остаточной влажности не более 12%, перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5 соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C в течение 3-х часов, затем масляный экстракт отделяют с получением первичного экстракта, далее первичный экстракт используют для экстракции с новой порцией высушенного гомогената при соотношении высушенный гомогенат:первичный экстракт 1:5-1:7 и выдерживают при температуре 55-60°C при постоянном перемешивании 6-10 часов, затем масляный экстракт отделяют.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве органических кислот используют уксусную, молочную или аскорбиновую кислоты.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что сушку гомогената осуществляют на аппаратах сублимационного типа или в вакуум-сушильном аппарате барабанного типа.

R U 2 5 6 2 5 9 2 C 2

Изобретение относится к области получения биологически активных средств, обладающих антиоксидантными и иммунозащитными свойствами, из голотурий, которые могут быть использованы в качестве биологически активной добавки к пище, в ветеринарии и косметике.

5 Голотурии, или морские кубышки, или морские огурцы (класс Holothuroidea) - класс беспозвоночных животных типа иглокожих. Виды, употребляемые в пищу, носят общее название «трепанг» (ru.wikipedia.org>Википедия>) Трепанги (от малайского tripang) - промысловые съедобные голотурии из родов *Holothuria*, *Stichopus*, *Cucumaria* и так далее (fitoterapiya.ru>MAIN/NARODNAYA/TREPANG).

10 Антиоксидантные свойства голотурий кукумари *Cucumaria japonica* и трепанга японского *Apostichopus japonicus* исследованы довольно широко. Показано, что антиоксидантными свойствами обладают как сублимированные продукты, так и экстракты из трепанга [Zhong Y., Khan M.A., Shanidi F., Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*) // Journal of agricultural and food chemistry. - V. 55. - №4. - 2007. - P. 1188-1192.; Mulyndin V.A., Kovalev V.V. Effect of extraction of internal organs of the holothurian *cucumaria japonica* on the indices of nonspecific resistance // Russian journal of marine biology. - V. 27. - №6. - 2001. - P. 406-408]. Антиоксидантные свойства трепанга связывают с присутствием тритерпеновых гликозидов (ТГ), фенольных веществ, пигментов, пептидов [Sun P., Yi Y. -H, Li L., Tang H.F. Resource, chemical structure and characteristics of triterpene glycosides from sea cucumber (order aspidochiritida) // Chinese journal of natural medicines. - V. 5. - №6. - 2007. - P. 463-469; Pan S.K., Yao D.R., Zhou M.Q., Wu S.J. Hydroxyl radical scavenging activity of peptide from sea cucumber using enzyme complex isolated from the digestive tract of sea cucumber // African journal of biotechnology. - V. 11. - №5. - 2012. - P. 1214-1219]. Отмечается, что антиоксидантный эффект зависит от технологии получения экстрактов и сохранения нативной структуры компонентов.

Иммунозащитные свойства препаратов из трепанга описаны в медицинских источниках.

30 В литературе имеются данные по оценке механизмов исцеляющего действия комплексных экстрактов из трепанга как биостимулятора жизнестойкости макроорганизма при инфекционном процессе.

35 Комплексная характеристика антимикробного действия экстрактов из трепанга японского по отношению к разным группам микроорганизмов и показана их эффективность в условиях прямого контакта с возбудителем. Установлено тормозящее действие комплексных экстрактов из трепанга японского на гиперчувствительность немедленного типа и стимулирующее - на гиперчувствительность замедленного типа в процессе развития аллергии.

40 Научно определены пути биостимуляции защитных сил организма через энтеральные пути введения комплексных экстрактов из трепанга японского и перспективы их использования как пищевых добавок.

45 Доказана избирательность антимикробного эффекта экстрактов и преимущественного действия в отношении определенных видов кишечной группы, что определяет возможность и целесообразность их применения в лечебно-профилактических целях без нарушения гомеостатического равновесия между - нормальными обитателями кишечника и без формирования дисбактериоза.

Изучено влияния на клеточно-гуморальные факторы неспецифической резистентности подопытных животных к инфекции, исследование воздействия на клеточно-гуморальные механизмы специфического прививочного иммунитета, на развитие аллергии

5 немедленного и замедленного типов, проверку интеграции всех названных параметров на модели экспериментального сальмонеллеза у мышей с проведением визуального наблюдения за животными, микроскопического и бактериологического контроля за скоростью и динамикой освобождения организма от возбудителя [Mulyndin V.A., Kovalev V.V. Effect of extraction of internal organs of the holothurian *cucumaria japonica* on the indices of nonspecific resistance // Russian journal of marine biology. - V.27. - №6. - 2001. - P.406-408; Акулин В.Н., Павель К.Г., Слуцкая Т.Н., Тимчишина Г.Н., Якуш Е.В. Эффективность биологически активных добавок из голотурий и совершенствование технологии их получения // Изв. ТИПРО. - Т.170. - 2012. - с. 291-298; Любавская Т.А. Антимикробные и иммуномодулирующие свойства комплексных экстрактов из трепанга японского // Автореф. Дис. Канд. Мед. Наук. Владивосток, 1996, 29 С.]

10 Таким образом, благодаря содержанию каротиноидов и ТГ в заявляемом продукте обеспечивается его антиокислительные и иммунозащитные свойства.

15 Известен способ получения каротиноидного комплекса из морских звезд, включающий использование морских звезд вида *Patiria pectinifera* в качестве сырья, которые обезвоживают этиловым спиртом, затем экстрагируют этиловым спиртом с добавлением пищевой кислоты и аскорбиновой кислоты, далее экстракт фильтруют, концентрируют в вакууме, затем полученный концентрат разбавляют дистиллированной водой и пропускают через колонку с полихромом-1, далее сорбент промывают градиентом этилового спирта, а целевой продукт элюируют этиловым спиртом, затем элюат упаривают в вакууме, полученный концентрат растворяют в этиловом спирте, отстаивают, центрифугируют, затем этанольный раствор упаривают в вакууме при определенных условиях [патент RU 2469732].

25 Недостатками данного изобретения является многостадийность и длительность процесса, применение этилового спирта, что усложняет требования к производству биологически активных добавок, а также отсутствие ТГ.

30 Известен способ обогащения рыбного жира биологически активными веществами из позвоночных гидробионтов, в котором используют БАВ морских беспозвоночных гидробионтов, таких как голотурии, морские ежи, крабы или креветки. Из внутренних органов или панцирей этих животных готовят концентраты, которые экстрагируют 96% этиловым спиртом, нагретым до 45-60°C при активном перемешивании до полного растворения концентрата. Спирт приливают в соотношении концентрат БАВ:спирт 1:10. Полученный экстракт фильтруют в горячем виде, фильтрат отстаивают, используют верхний слой отстоя, добавляют к нему нагретый до температуры экстрагирования 35 рыбный жир в соотношении экстракт БАВ:рыбный жир 1:50, активно перемешивают смесь в течение часа при той же температуре, затем отстаивают и фильтруют в горячем виде [патент RU 2162647].

40 К недостаткам данного изобретения можно так же, как и в предыдущем патенте, следует отнести применение спирта, остатки которого могут обнаруживаться в конечном продукте. Применение спирта усложняет технологию и требует соблюдения специальных требований к работе с органическими растворителями.

45 Известно изобретение «Продукты каротиноидолипидный, протеинсодержащий фракций морского огурца и способы их применения», заключающееся в том, что проводят отделение внутренностей трепанга, предварительно обрабатывается достаточным количеством кислоты, чтобы рН уровень кислотности ткани находился в пределах от около 4 до около 5,5, предпочтительно в пределах от около 4,3 до около 4,7, затем материал внутренностей смешивается с ацетоном, спиртом или подобным растворителем в пропорции 3:1 растворитель к материалу и затем взбалтывается 24

часа, ацетон или другой растворитель декантируется от оставшегося материала внутренностей, и затем материал внутренностей промывается 4 часа или более растворителем для удаления оставшихся каротиноидосодержащих липидов. Оставшийся материал внутренностей центрифугируется для того, чтобы очистить оставшийся растворитель, или нагревается в закрытом резервуаре, и растворитель регенерируется способами, использующими извлечение растворителя, известные в этой области. Содержащий пигменты ацетон или другой растворитель закачивается в пленочный испаритель, известный специалистам в химии масел, пигменты удерживаются и концентрируются, а растворитель регенерируется. Полученная в результате липидная пигментная фракция является смешанным каротиноидосодержащим материалом, включающим кантаксантин и астаксантин и называемым здесь Красный Жир. В примере с *Cucumaria frondosa* основным каротиноидом является кантаксантин [патент RU 2234928].

Недостатком данного изобретения является применение пожароопасных растворителей и многостадийность и длительность процесса.

Наиболее близким к заявляемому техническому решению является «Способ получения комплекса жирорастворимых каротиноидов из гидробионтов и продуктов их переработки», используемый в качестве пищевых добавок с лечебно-профилактическими свойствами, добавок в рацион рыб, в частности лососевых, для ускорения процесса пигментации, включающий разделку сырья, измельчение до размеров частиц от 0,1 до 50 мм, экстракцию разогретым до 15-40°C рыбным жиром или жиром растительного происхождения в соотношении сырье:жир 1:1-1:3 при непрерывном перемешивании в течение 30-40 минут и температуре 15-40°C. Степень экстрагирования регистрируют по увеличению оптической плотности экстракта [патент RU 2278556].

Недостатками данного изобретения является низкое содержание в препарате целевого продукта (каротиноидов), вследствие недостаточной степени экстракции, отсутствие тритерпеновых гликозидов. Содержание каротиноидов в продукте, полученном по способу-прототипу, составляет от 0,49 до 3,15 мг/100 г.

Задача изобретения заключается в создании способа получения масляного экстракта из голотурий, обладающего биологически активными свойствами, а именно экстракта, сочетающего антиоксидантную и иммунозащитную направленность за счет содержания каротиноидов и тритерпеновых гликозидов.

Поставленная задача достигается тем, что в способе получения масляного экстракта из голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами, включающем подготовку сырьевого материала, измельчение, экстрагирование растительными жирами, отделение экстракта, согласно изобретению в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой 20-50 Гц, мощностью 250-300 Вт в течение 5-10 минут, затем гомогенат подкисляют введением 0,1-1,0% растворов органических кислот до pH 4,0-5,5 и выдерживают в течение от 40 минут до 2-х часов, после чего нейтрализуют до pH 7,0-7,5, подготовленный таким образом гомогенат перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5, соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C, в течение 3-х часов, затем масляный экстракт отделяют; в качестве органических кислот используют уксусную, молочную или аскорбиновую кислоты.

Также поставленная задача достигается тем, что в способе получения масляного экстракта из голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами, включающем подготовку сырьевого материала, измельчение до

гомогенного состояния, экстрагирование растительными жирами, отделение экстракта, согласно изобретению, в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой 20-50 Гц, мощностью 250-300 Вт в течение 5-10 мин, затем его сушат до остаточной влажности не более 12%, перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5, соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C, в течение 6-10 часов, затем масляный экстракт отделяют, с получением первичного экстракта, далее первичный экстракт используют для экстракции с новой порцией высушенного гомогената при соотношении высушенный гомогенат:первичный экстракт 1:5-1:7 и выдерживают при температуре 55-60°C, при постоянном перемешивании 6-10 часов, затем масляный экстракт отделяют; сушку гомогената осуществляют на аппаратах сублимационного типа или в вакуум-сушильном аппарате барабанного типа.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в разработке способа получения масляного экстракта из голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами; масляный экстракт, содержит каротиноиды и тритерпеновые гликозиды и за счет этого проявляет антиоксидантные и иммунозащитные свойства.

Для получения масляного экстракта из внутренностей голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами используют внутренности голотурий свежие/свежемороженые или высушенные до остаточной влажности не более 12%.

Для ускорения процесса экстракции и увеличения эффективности извлечения биологически активных веществ в изобретении применяют операцию обработки сырьевого материала ультразвуком при 20-50 Гц, мощности 250-300 Вт/см в течение 5-10 минут.

Необходимость таких параметров вытекает из исследований выполненных авторами настоящей заявки, касающихся выявления зависимости концентрации каротиноидов в экстрактах, приведенных в таблице 1.

Мощность ультразвукового воздействия, Вт/см	Время воздействия, минуты	Температура гомогената, °C	Концентрация, мг/100 мл
0	-	Без изменений	7
200	5	37	6
	10	42	10
250	3	35	7
	5	40	14
	10	42	15
300	15	50	15
	3	45	15
	5	48	15
350	10	58	14
	15	74	9
	3	72	10
450	5	80	8
	10	86	5
	15	93	2

Ультразвуковая обработка экстрактов проводилась с помощью прибора IKASONIC U 50 control. с интенсивностью воздействия (мощностью) 250-300 Вт/см в течение 5-10 минут.

Мощность ультразвукового воздействия влияет на температуру обрабатываемого сырья. Как известно из литературных источников увеличение температуры более 60°C не благоприятно для сохранения нативной структуры каротиноидов и усиливает окислительные процессы в жирах. Поэтому при исследовании влияния ультразвукового воздействия на температуру обрабатываемого сырья подбирали мощность и продолжительность, не вызывающие повышения температуры выше указанного значения.

В условиях мощности 250-300 Вт/см в течение 5-10 минут увеличение температуры не превышает заданных значений и концентрация экстрагируемых каротиноидов наиболее высока. Снижение мощности приводит к снижению концентрации каротиноидов, а ее увеличение вызывает их частичное разрушение. Снижение времени воздействия ниже 5 минут приводит к снижению концентрации каротиноидов, а его увеличение более 10 минут не приводит к увеличению содержания биологически активных веществ в растворе, а вызывает их разрушение.

В первом варианте способа используют гомогенат из свежих или мороженых внутренностей, который подкисляют до 4,0-5,5 добавлением 0,1-1,0% раствора органической кислоты (лимонной, уксусной, молочной) и выдерживают в течение 40 минут - 2 часов, в результате чего разрушаются каротиноид-белковые связи, что обеспечивает более полную последующую экстракцию каротиноидов, одновременно снижается микробное обсеменение. Гомогенат нейтрализуют до pH 7,0-7,5 0,5 М раствором бикарбоната натрия для того, чтобы не допустить окисления жиров используемых для экстракции, чему может способствовать кислая среда.

Свежие/свежемороженые внутренности, обработанные кислотой и нейтрализованные, экстрагируют растительным маслом в соотношении сырье:экстрагент 1:3-1:5 при температуре 55-60°C, в течение 3 часов.

Необходимость таких параметров вытекает из исследований выполненных авторами настоящей заявки, касающихся выявления зависимости экстракции каротиноидов из свежих и мороженых внутренностей голотурий от температурного режима, времени и соотношения сырье:экстракт, сведения о которых приведены в таблицах 2, 3 и 4. Исследования касались каротиноидов как наиболее лабильных БАВ данного сырья.

Температура, °C	Концентрация, мг/100 мл
20	4
40	9
50	13
60	15

Примечание - более высокую температуру не использовали из-за возможности разрушения каротиноидов.

Соотношение	Концентрация, мг/100 мл	Объем экстракта, мл	Общее количество каротиноидов, мг
1:1	19	62	1178
1:3	15	125	1875
1:5	9	213	1920
1:10	5	370	1850

Из таблицы следует, что при соотношении 1:1 концентрация каротиноидов наибольшая. Однако при отделении экстракта от осадка происходит значительная потеря объема экстракта, поскольку значительная часть используемого для экстракции

масла остается в водно-масляной фазе и осадке. При экстрагировании свежих или мороженых внутренностей образуется 3 фазы: осадок, водно-масляная эмульсия и масляный экстракт. Для того чтобы при фильтровании не происходило смешивание водно-масляной фазы и экстракта перед фильтрацией необходимо провести декантацию. При декантации также наблюдается частичная потеря объема экстракта. Снижение концентрации каротиноидов в экстракте происходит только за счет увеличения объема экстракта (его разбавления). При этом общее количество каротиноидов (объем, умноженный на концентрацию) примерно одинаково.

Время, час	Концентрация, мг/100 мл
2	12
3	15
6	15
10	15

Как следует из данных таблицы, оптимальное время экстрагирования 3 часа, увеличение времени экстрагирования не имеет технологического смысла.

Во втором варианте способа, при использовании сушеных внутренностей, проводят сублимирование гомогената после его обработки ультразвуком в вышеуказанных условиях. Обработка сырья ультразвуком осуществлялась, как описано в первом варианте. Далее внутренности, экстрагируют растительным маслом в соотношении сырье: экстрагент 1:3-1:5 при температуре 55-60°C, в течение 3-10 часов. При этом образуется две фазы: осадок и экстракт, который легко отделяется фильтрованием. После этого проводят вторичную экстракцию, используя новую порцию сушеных внутренностей и полученный первичный экстракт в качестве экстрагента. Условия экстракции следующие: соотношение сырье:экстрагент 1:5-1:10 при температуре 55-60°C, в течение 3-10 часов. Полученный вторичный экстракт фильтруют.

Необходимость таких параметров вытекает из исследований выполненных авторами настоящей заявки, касающихся выявления зависимости экстракции каротиноидов из свежих и мороженых внутренностей голотурий от температурного режима, времени и соотношения сырье:экстракт, сведения о которых приведены в таблицах 5, 6, 7 и 8.

Температура, °C	Концентрация, мг/100 мл
20	11
40	17
50	22
60	25

Как следует из данных таблицы, оптимальное температура экстрагирования 60°C, увеличение температуры неблагоприятно для сохранения нативной структуры каротиноидов.

Соотношение	Концентрация, мг/100 мл	Объем, мл	Общее количество, мг
1:1	18	540	9720
1:3	15	740	11100
1:5	12	900	10800
1:10	7	920	6440

Как следует из данных таблицы, оптимальные соотношения - 1:3 и 1:5.

Соотношение	Концентрация, мг/100 мл	Объем, мл	Общее количество, мг
1:3	25	720	18000
1:5	26	850	22620
1:7	23	870	20010
1:10	20	920	18400

Как следует из данных таблицы, оптимальные соотношения - 1:5 и 1:7. Увеличение соотношения приводит к некоторому снижению концентрации каротиноидов, но увеличивает выход (объем) продукта.

Время, час	Концентрация, мг/100 мл
2	9
4	12
6	15
10	16

Как следует из данных таблицы, оптимальное время экстрагирования 6-10 часов, увеличение времени экстрагирования не имеет технологического смысла, снижение времени - не обеспечивает максимальной концентрации.

Заявляемое техническое решение соответствует критерию «новизна», поскольку вся совокупность существенных признаков изобретения, содержащихся в независимом пункте формулы, не известна из уровня техники.

Заявляемое техническое решение, по мнению заявителя, соответствует критерию «изобретательский уровень», поскольку оно явным образом не следует из уровня техники, так как по результатам анализа технических решений того же назначения, не выявлены решения имеющие признаки совпадающие с его отличительными признаками для достижения технического результата указанного заявителем.

Заявляемое техническое решение соответствует критерию «промышленное применение», поскольку заявленный способ соответствует указанному назначению, и может использоваться в пищевой промышленности так самостоятельный продукт, так и как компонент для производства пищевых биологически активных добавок.

Общими с прототипом являются следующие признаки: подготовка сырьевого материала, измельчение до гомогенного состояния, экстрагирование растительными жирами, отделение экстракта,

Отличительными признаками являются следующие:

для первого варианта - в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой 20-50 Гц, мощностью 250-300 Вт в течение 5-10 мин, затем гомогенат подкисляют введением 0,1% - 1% органических кислот до pH 4,0-5,5 и выдерживают в течение от 40 минут до 2-х часов, после чего нейтрализуют до pH 7,0-7,5, подготовленный таким образом гомогенат перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5 соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C, в течение 3-х часов, затем масляный экстракт отделяют.

для второго варианта - в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой

20-50 Гц, мощностью 250-300 Вт в течение 5-10 мин, затем его сушат до остаточной влажности не более 12%, перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5 соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C, в течение 3 часов, затем масляный экстракт отделяют, с получением первичного экстракта, далее первичный экстракт используют для экстракции с новой порцией высушенного гомогената при соотношении высушенный гомогенат:первичный экстракт 1:5-1:7 и выдерживают при температуре 55-60°C, при постоянном перемешивании 6-10 часов, затем масляный экстракт отделяют.

Способ осуществляют следующим образом.

Для получения продукта из свежих/свежемороженых внутренностей (первый вариант) промытые внутренности измельчают до однородного состояния и проводят обработку ультразвуком при 20-50 Гц, мощности 250-300 Вт в течение 5-10 мин для ускорения процесса экстракции и увеличения эффективности извлечения биологически активных веществ. Гомогенат внутренностей подкисляют с помощью 0,1% - 1% уксусной, молочной или аскорбиновой кислоты до pH от 4,0 до 5,5 для подавления микробного разложения, деминерализации массы и более полного извлечения биологически активных веществ. Свежие/свежемороженые внутренности, обработанные кислотой и нейтрализованные, экстрагируют растительным маслом в соотношении сырье:экстрагент 1:3-1:5 при температуре 55-60°C, в течение 3 часов. При экстракции мороженых внутренностей образуется 3 фазы: осадок; водно-масляная эмульсия; собственно масляный экстракт. Затем проводят декантацию экстракта, избегая попадания водно-масляной эмульсии в экстракт, и его фильтрацию.

При использовании сушеных внутренностей (второй вариант) проводят сушку гомогената после его обработки ультразвуком в вышеуказанных условиях. Сушку проводят на аппаратах сублимационного типа или в вакуум-сушильном аппарате барабанного типа, не доводя температуру конечного продукта выше 45-55°C, при остаточной влажности сухого продукта не более 12%. Далее внутренности, экстрагируют растительным маслом в соотношении сырье:экстрагент 1:3-1:5 при температуре 55-60°C, в течение 6-10 часов. При этом образуется две фазы: осадок и экстракт, который легко удаляется фильтрованием. После этого проводят вторичную экстракцию, используя новую порцию сушеных внутренностей и полученный первичный экстракт. Условия экстракции следующие: соотношение сырье:экстрагент 1:5-1:7 при температуре 55-60°C, в течение 6-10 часов. Полученный вторичный экстракт фильтруют.

Масляный экстракт, полученный любым из вариантов предлагаемого способа, представляет собой ярко-желтую или оранжевую жидкость, содержащую сложную смесь каротиноидов от 15 до 25 мг/100 мл и смесь тритерпеновых гликозидов общей суммой от 1300 до 2000 мкг/мл.

Примеры конкретного выполнения

Пример 1

1 кг свежемороженых внутренностей дальневосточного трепанга (*Apostichopus japonicus*) измельчают и подвергают обработке ультразвуком при 25 Гц и мощности 250 Вт/см в течение 10 мин. К гомогенату добавляют раствор 1% раствор лимонной кислоты до pH 4,7, выдерживают 2 ч при температуре 20°C и нейтрализуют 0,5 М раствором бикарбоната натрия до pH 7,0. К гомогенату добавляют 4 л растительного масла и выдерживают в течение 10 часов при температуре 55°C. Масляный слой отделяют декантированием, фильтруют через нутч-фильтр и направляют на упаковывание.

Конечный продукт характеризуется содержанием каротиноидов - 15 мг/100 мл и

гликозидов - 1300 мкг/мл.

#### Пример 2

1 кг свежемороженых внутренностей дальневосточного трепанга измельчают и подвергают обработке ультразвуком при 35 Гц и мощности 250 Вт/см в течение 8 мин. Затем внутренности сушат на сублимационной сушке. Высушенные внутренности смешивают с 5 л растительного масла. Смесь выдерживают в течение 5 часов при температуре 60°C. Масляный экстракт отделяют, фильтруют через нутч-фильтр. К первичному экстракту добавляют новую порцию высушенных внутренностей трепанга в соотношении 500 мл первичного масляного экстракта: 100 г высушенных внутренностей. Вторичную экстракцию проводят в течение 6 ч при 60°C. Масляный экстракт фильтруют через нутч-фильтр и направляют на упаковывание. Конечный продукт характеризуется содержанием каротиноидов - 20 мг/100 мл и гликозидов - 2000 мкг/мл.

#### Пример 3

1 кг свежемороженых внутренностей кукумарии измельчают и подвергают обработке ультразвуком при 30 Гц и мощности 250 Вт/см в течение 10 мин. К смеси добавляют 1% раствор аскорбиновой кислоты до pH 4,5. Смесь выдерживают 1 ч при температуре 20°C и нейтрализуют 0,5 М раствором бикарбоната натрия до pH 7,0. К гомогенату добавляют 3 л растительного масла. Смесь выдерживают в течение 3 часов при температуре 60°C. Масляный слой отделяют декантированием, фильтруют через нутч-фильтр и направляют на упаковывание. Конечный продукт характеризуется содержанием каротиноидов - 19 мг/100 мл и гликозидов - 1200 мкг/мл.

#### Пример 4

2 кг кукумарии-сырца разделяют, собирая внутренности, измельчают их и подвергают обработке ультразвуком при 40 Гц и мощности 250 Вт/см в течение 5 мин. Затем внутренности сушат на сублимационной сушке. 0,6 кг высушенных внутренностей смешивают с 3 л растительного масла. Смесь выдерживают в течение 10 часов при температуре 60°C. Масляный экстракт отделяют, фильтруют через нутч-фильтр. К первичному экстракту добавляют порошок сушеных внутренностей трепанга в соотношении 700 мл первичного масляного экстракта: 100 г сушеных внутренностей. Вторичную экстракцию проводят в течение 7 ч при 60°C. Масляный экстракт фильтруют через нутч-фильтр и направляют на упаковывание. Конечный продукт характеризуется содержанием каротиноидов - 25 мг/100 мл и гликозидов - 1800 мкг/мл.

Полученный по настоящему способу масляный экстракт исследован в отношении проявления его антиоксидантного и иммунозащитного как иммуностимулирующего действия.

Для исследования иммуностимулирующей и антиоксидантной активности масляного экстракта из голотурий, полученного заявляемым способом, использовали неинbredных мышей массой 14-16 г, находившихся на стандартной диете в боксированных помещениях с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. Для исследования животных разделили на две группы: контрольную и опытную (по 8 особей в группе).

Мышам из опытной группы в течение 21 дня вводили перорально масляный экстракт из голотурий в дозе 0,5 мкл на мыш. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор. Через 21 день мышам вводили внутрибрюшинно 1 мл стерильного 1% раствора пептона, через 4 часа (для получения популяции нейтрофилов) под эфирным наркозом в брюшную полость вводили по 4 мл раствора Хэнкса без

фенолового красного с гепарином (5 ЕД/мл), в течение 2 мин массировали брюшко, затем отсасывали содержимое брюшной полости, центрифугировали однократно при 1000 об./мин. Надосадочную жидкость сливали, клетки ресуспендировали в растворе Хэнкса, довели до концентрации  $2 \times 10^6$ /мл, исследовали фагоцитарную, как иммуностимулирующую, активность перитонеальной полости мышей (по отношению к *Staphylococcus aureus*, штамм 209) (Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология в клинической практике. М.: Наука, 1990. 224 с.)

Взвесь клеток, предварительно проинкубированных с циклофосфаном, в объеме 100 мкл соединяли со 100 мкл *S. aureus* в соотношении 1:20, инкубировали 30 мин при 37°C, затем центрифугировали при 200 g 5 мин, из осадка готовили мазки, фиксировали метанолом, окрашивали азур-П-эозином и микроскопировали, определяя фагоцитарный показатель (ФП) - процент клеток, участвующих в фагоцитозе и фагоцитарное число (ФЧ) - среднее число микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом.

Результаты исследования приведены в таблице 9.

Таблица 9

#### Исследование влияния масляного экстракта из голотурий на фагоцитарную активность нейтрофилов перитонеальной полости мышей.

Исследуемая группа животных	Доза	ФП, %	ФЧ
Контроль	-	64±4,2	1,98±0,3
Масляный экстракт из голотурий	0,5 мкл/мышь	83±6,6	2,6±0,3

Результаты показывают, что использование масляного экстракта: повышает значения ФП и ФЧ по отношению к контролю, то есть обладает иммуностимулирующими свойствами.

Для определения антиоксидантной активности использовали плазму крови мышей вышеуказанных групп.

Общую антиоксидантную активность плазмы крови (АОА) определяли по величине торможения перекисного окисления липидов в модельной системе, содержащей желточные липопротеиды (Бородин Е.А., Арчаков А.И. Стабилизация и реактивация цитохрома Р-450 фосфатидилхолином при перекисном окислении липидов // Биологические мембраны. 1987. №7. С. 719-728.).

Для этого в пробы плазмы крови, взятые у контрольных и опытных животных, вносили 0,1 мл суспензии желточных липопротеидов и 7,0 мл фосфатного буфера (pH 7,5), 1,0 мл 25 мМ раствора FeSO<sub>4</sub>. Интенсивно перемешивали, отбирали по 2 мл, добавляли 0,1 мл раствора ионола и оставляли при комнатной температуре на 30 мин (опыт 0, контроль 0). Пробирки с оставшейся частью реакционной смеси инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации пробы перемешивали, отбирали по 2 мл в чистые пробирки, добавляли 0,1 мл раствора ионола (опыт t, контроль t). Добавляли в обе серии проб (инкубированных и не инкубированных) 1,0 мл трихлоруксусной кислоты. Встряхивали и центрифугировали пробы при 3000 об/мин 15 мин. Переносили в чистые стеклянные пробирки с пробками по 2,0 мл супернатанта, добавляя 1,8 мл раствора тиобарбитуровой кислоты. Инкубировали пробы 15 мин в кипящей водяной бане, затем охлаждали под струей холодной воды. Добавляли 2 мл хлороформа, интенсивно перемешивали. Центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин. Измеряли оптическую плотность водной фазы (верхний слой) контрольной и опытных проб на спектрофотометре при длине волны 532 нм против дистиллированной воды.



Общую АОА плазмы выражали в процентах. Первоначально определяли разницу  $\Delta E$  между показателями до и после инкубации:

$$\Delta E_{оп} = E_{оп t} - E_{оп о}; \Delta E_{к} = E_{к t} - E_{к о},$$

где

$E_{оп о}, E_{к о}$  - экстинции проб до инкубации,

$E_{оп t}, E_{к t}$  - экстинции проб после инкубации.

Конечная формула расчета:

$$AOA, \% = [\Delta E_{к} - \Delta E_{оп} / \Delta E_{к}] \times 100\%.$$

Таблица 10

**Влияние экстракта из голотурий на антиокислительную активность плазмы крови мышей**

Исследуемая группа животных	Доза	АОА, %
Контроль	-	15,2±3,5
Масляный экстракт из голотурий	0,5 мкл/мышь	26,5±3,6

Полученные результаты, приведенные в таблице 10, свидетельствуют о том, что масляный экстракт из голотурий «тормозит» перекисное окисления липидов в модельной системе, содержащей желточные липопротеиды, то есть обладает антиокислительными свойствами.

**Формула изобретения**

1. Способ получения масляного экстракта из голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами, включающий подготовку сырьевого материала, измельчение до гомогенного состояния, экстрагирование растительными жирами, отделение экстракта, отличающийся тем, что в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой 20-50 Гц, мощностью 250-300 Вт в течение 5-10 мин, затем гомогенат подкисляют введением 0,1%-1% органических кислот до pH 4,0-5,5 и выдерживают в течение от 40 минут до 2-х часов, после чего нейтрализуют до pH 7,0-7,5, подготовленный таким образом гомогенат перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5 соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C в течение 3-х часов, затем масляный экстракт отделяют.

2. Способ получения масляного экстракта из голотурий, обладающего антиоксидантными и иммунозащитными свойствами, включающий подготовку сырьевого материала, измельчение до гомогенного состояния, экстрагирование растительными жирами, отделение экстракта, отличающийся тем, что в качестве сырьевого материала используют внутренности голотурий, на которые после гомогенизирования воздействуют ультразвуком с частотой 20-50 Гц, мощностью 250-300 Вт в течение 5-10 мин, затем его сушат до остаточной влажности не более 12%, перемешивают с растительным маслом в соотношении 1:3-1:5 соответственно, полученную смесь выдерживают при температуре 55-60°C в течение 3-х часов, затем масляный экстракт отделяют с получением первичного экстракта, далее первичный экстракт используют для экстракции с новой порцией высушенного гомогената при соотношении высушенный гомогенат:первичный экстракт 1:5-1:7 и выдерживают при

температуре 55-60°C при постоянном перемешивании 6-10 часов, затем масляный экстракт отделяют.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве органических кислот используют уксусную, молочную или аскорбиновую кислоты.

4. Способ по п. 2, отличающийся тем, что сушку гомогената осуществляют на аппаратах сублимационного типа или в вакуум-сушильном аппарате барабанного типа.