



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37844 (13) A

(51) 7 A61D19/02, A61K35/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІЗ ЖОВТКА АНТИШОКОВОГО КОМПОНЕНТА ДЛЯ СПЕРМИ

(21) 2000042320

(22) 24.04.2000

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Павленко Людмила Миколаївна, Павленко Михайло Петрович

(73) Інститут тваринництва Української академії аграрних наук

(57) Спосіб одержання із жовтка антишокового компонента для сперми, що включає екстрагування із жовтка антишокового компонента органічним розчинником, розділення одержаної суміші на фракції і відгонку розчинника, який **відрізняється** тим, що перед екстрагуванням жовток піддають глибокому заморожуванню в рідкому азоті з подальшим відтаванням.

Винахід відноситься до області сільського господарства, зокрема - до штучного осіменіння сільськогосподарських тварин, і може бути використаний в біологічній промисловості, а також в репродуктології людини.

Відомо одержання для сперми бугая екстракту як антишокового компонента з жовтка, мозку тварин і сої (див.: Милованов В.К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных. - М., 1962. - С. 57).

Однак запропонована методика отримання екстракту не є технологічною і не забезпечує потрібної якості одержаного компонента.

Найближчим прототипом є спосіб одержання антишокового компонента із жовтка, описаний в а.с. "Среда для криоконсервации спермы" № 2623106 (13-15) (заявл. 01.06.78, зареєстр. в ГРИ СССР 07.03.80), який включає змішування нативного жовтка у співвідношенні 1:3 з сірчаноокислим ефіром, витримку суміші протягом 24 годин при температурі 18-22°C, розділення суміші на фракції і відгонку екстрагенту із надосадової рідини.

Однак відомий спосіб екстрагування не забезпечує раціонального вилучення із жовтка антишокового компонента, що призводить до додаткових витрат цінної сировини і зниження активності екстракту.

Це пояснюється тим, що при екстрагуванні під дією органічного розчинника відбувається денатурація високомолекулярних з'єднань жовтка, насамперед білків. При цьому значна частина жовткових кульок виявляється включеною в твердій дисперсній системі і стає недоступною для контакту з екстрагентом, що утруднює вихід з них антишокового компонента.

Задачею винаходу є збільшення виходу екстракту жовтка, підвищення його біологічної актив-

ності і зниження витрат сировини при виготовленні антишокового компонента.

Поставлену задачу досягають тим, що у способі, який включає екстрагування із жовтка антишокового компонента органічним розчинником, розділення одержаної суміші на фракції і відгонку розчинника, згідно з винаходом, перед екстрагуванням жовток піддають глибокому заморожуванню в рідкому азоті з подальшим відтаванням.

Застосування кріобробки нативного жовтка використано для попереднього руйнування жовткових кульок і створення умов для спонтанного виходу з них антишокового компонента в міжклітинне середовище, що базується на внутрішньоклітинній кристалізації води і механічному ушкодженню кристалами льоду плазматичних мембран. Цей ефект установлено нами при мікрофотографуванні суспензії жовтка до і після заморожування його в рідкому азоті, що показано на фіг. 1 та 2.

На фіг. 1 в мазку жовтка до кріобробки чітко видно кульки однакових розмірів, рівномірно розташованих у полі зору мікроскопу, а на фіг. 2 в мазку жовтка після кріобробки видно деструктивні зміни жовткових кульок і вихід їх складових компонентів у зовнішнє середовище, що значно підвищує ефективність екстрагування і максимальне вилучення з жовтка антишокового компонента.

Приклад 1. Взяли жовток свіжих курячих яєць, розфасували його по 50 мл в чотири пакети з поліетиленової плівки розміром 60x100 мм, товщина прошарку жовтка становила 10 мм. Пробу 1 занурювали безпосередньо в рідкий азот на 30 хвилин, пробу 2 розміщували на поверхні рідкого азоту, пробу 3 - над рівнем азоту на 10 см, а проба 4 - контроль - не підлягала заморожуванню.

(19) UA (11) 37844 (13) A

Відтаювали пакети з жовтком на водяній бані при температурі +18...+2°C. Після відтавання кожну пробу жовтка екстрагували етиловим спиртом 96°C в співвідношенні 1:3, розділяли суміш на фракції і з надосадової рідини видаляли екстрагент на водяній бані при температурі +60...+90°C до зникнення запаху екстрагенту.

Результати проведених досліджень наведені в табл. 1.

Дані табл. 1 свідчать, що заморожування нативного жовтка зануренням безпосередньо в рідкий азот сприяє найбільш високому виходу антишокового компоненту з одиниці об'єму.

Середній вихід екстракту жовтка (антишокового компоненту) в досліді склав 17% проти 12,4% в контролі, що було вище в 1,3 раза на користь досліді.

Приклад 2. Вивчали вплив витримки жовтка в рідкому азоті на вихід екстракту з 50 г нативного жовтка.

Для цього приготували 3 проби за вищеписаною методикою. Проба 1 не підлягала заморожуванню, пробу 2 заморожували шляхом занурення в азот і витримки в рідкому азоті 30 хвилин, пробу 3 заморожували шляхом занурення в азот і витримували жовток в рідкому азоті 24 години. Результати досліді наведені в табл. 2.

Дані табл. 2 свідчать, що при зануренні жовтка в рідкий азот і кріобробці жовтка протягом 30 хвилин вихід екстракту з одиниці об'єму збільшився в 1,5 раза порівняно з контролем, де жовток не підлягав заморожуванню; вихід екстракту з жовтка після його 24-годинного замо-

рожування вірогідно не відрізнявся від виходу екстракту, кріобробленого 30 хвилин.

З метою визначення біологічної активності і захисної дії антишокового компоненту, одержаного при різних режимах заморожування нативного жовтка, вивчено його вплив на сперму бугаїв-плідників після деконсервації.

Приклад 3. Еякуляти ділили на чотири рівні проби: контроль-проба 1, дослід-проби 2, 3, 4.

За контроль брали стандартне лактозо-жовтково-гліцерінове середовище. Сперму дослідних проб розбавляли середовищем, до складу якого входило 3% антишокового компоненту, екстракт якого отримали з жовтка після кріобробки впродовж 30 хвилин.

Результати досліджень представлені в табл. 3.

Результати табл. 3 свідчать, що кріобробка жовтка перед екстрагуванням не впливає негативно на захисні якості антишокового компоненту, одержаного із заморожено-відталого жовтка. Біологічні показники якості сперми, законсервованої в середовищі з вмістом дослідних зразків антишокового компоненту, були ідентичні як між собою, так і порівняно з контролем.

Таким чином, використання запропонованого способу одержання із жовтка антишокового компоненту для сперми забезпечує, порівняно з існуючими способами, збільшення виходу із жовтка в 1,3-1,5 раза активної речовини без зниження її антишовкових властивостей і дає змогу раціонально використовувати високоцінну сировину.

Таблиця 1

Вплив різних умов заморожування жовтка на вихід антишокового компоненту (n=10)

	Контроль (нативний жовток)	Дослід – умови обробки жовтка		
		занурення в рідкий азот	розміщення на поверхні рідкого азоту	розміщення над рівнем азоту на висоті 10 см
Одержано екстракту жовтка	6,2 г	8,5 г	8 г	7,8 г
	12,4%	17,0%	16%	15,6%

Таблиця 2

Вплив тривалості кріобробки жовтка на вихід антишокового компоненту після екстрагування

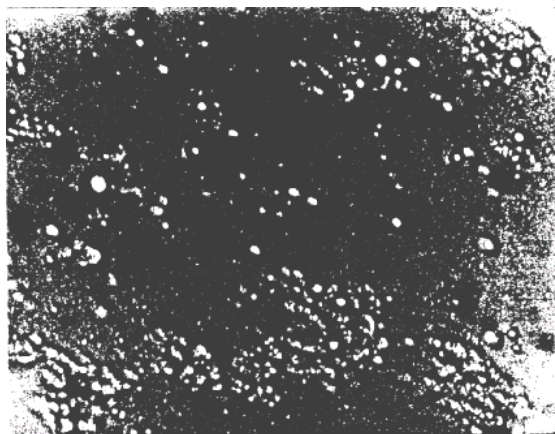
Способи обробки жовтка	Номери зразків							Маса, г	%
	1	2	3	4	5	6	7		
Кількість жовтка, використаного в досліді	50	50	50	50	50	50	50	350	
Кількість екстракту, г									
Жовток без кріобробки (проба 1), г	4,4	6,0	6,1	6,1	6,6	6,4	5,1	38,7	11
Кріобробка жовтка 30 хв (проба 2), г	6,6	9,1	7,5	9,9	9,9	7,3	7,5	57,8	16,4
Кріобробка жовтка 24 хв (проба 3), г	6,7	9,6	7,3	9,0	10,0	7,7	8,6	58,9	16,8

Вплив антишокового компоненту, одержаного із заморожено-відталого жовтка
на біологічні показники сперми після деконсервації

Показники сперми	Контроль	Умови кріобробки жовтка рідким азотом ($t=196^{\circ}\text{C}$)		
		занурення	експозиція на поверхні	експозиція 10 см над рівнем
Рухливість спермій після кріоконсервації (бали), $M \pm m$	$4,1 \pm 0,21$	$4,2 \pm 0,02$	$4,1 \pm 0,01$	$4,1 \pm 0,15$
Показник абсолютної виживаності - S_a , $M \pm m$	$14,1 \pm 0,25$	$14,1 \pm 0,25$	$14,2 \pm 0,31$	$14,5 \pm 0,28$
Виживаність спермій в годинах, t , $M \pm m$	$8,0 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,5$	$8,0 \pm 0,4$	$8,0 \pm 0,2$
Вірогідність різниці - P	-	$<0,5$	-	-



Фіг. 1



Фіг. 2

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22