



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42436 (13) A

(51) 7 C12P21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИРОБНИЦТВА АЛЬБУМІНУ БИЧАЧОГО СИРОВАТКОВОГО (БСА)

(21) 2001021256

(22) 21 02 2001

(24) 15 10 2001

(33) UA

(46) 15 10 2001, Бюл. № 9, 2001 р.

(72) Резуненко Євген Володимирович, Кучерявенко Олексій Олександрович, Кучерявенко Олександр Олександрович, Таран Тетяна Володимирівна

(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК, UA

(57) Спосіб виробництва альбуміну бичачого сироваткового (БСА), що включає виділення альбумінової фракції із сироватки крові великої рогатої худоби, який відрізняється тим, що виділення проводять методом хроматографії з використанням макропористих, кремнеземвмісних сорбентів марки "СХ-50", з подальшою регенерацією сорбентів розчином Комаровського та зрівноваженням хроматографічної колонки за допомогою 0,05 М калій-фосфатного буферного розчину з рН-7,2

Винахід відноситься до медичної, ветеринарної, мікробіологічної, вірусологічної та біотехнологічної промисловостей і може бути використаний для виробництва напівсинтетичних живильних середовищ при культивуванні мікроорганізмів, зокрема, лептоспір, у лабораторних умовах, для виготовлення профілактичних та діагностичних препаратів

Відомий спосіб адсорбційної хроматографії білків на макропористих кремнеземах. Його використовують для виділення біополімерів із складних сумішей. Цей спосіб дозволяє одержати біополімер у чистому вигляді і сконцентрувати його. Для виділення альбуміну використовують силікагелі типу Spherosil марок ХОА, ХОВ та ХОС. Проте виділений таким чином альбумін не використовується як препарат, який включають до складу середовищ для культивування лептоспір, так як він містить домішки інших білків [1].

Відомий спосіб одержання альбуміну із сироватки крові овець для культивування лептоспір висолюванням сірчанокислим амонієм. Кров збирають на м'ясокомбінатах при забої овець, дефібрінують і сепарують її. До сироватки додають 1:1 насичений розчин сірчанокислового амонію. Осаджені глобуліни видаляють фільтруванням через бельтінтканину або центрифугуванням. Потім сироватку підкислюють соляною кислотою до рН 4,6-4,8 і додають до повного насичення порошок сірчанокислового амонію. Білково-солевий осад концентрують пресуванням і очищають від солей діалізом в проточній воді. Розчин альбуміну очищають центрифугуванням і послідовною фільтрацією спочатку через пластини марки "Ф", а потім "СФ". Стериль-

ний альбумін фасують у флакони і зберігають при температурі 2°C (прототип) [2].

Недоліком способу є те, що в деяких серіях альбуміну міститься до 20 % високо ненасичених токсичних для лептоспір жирних кислот. Таким способом отримують препарат з вмістом 65-82 % чистого альбуміну. Крім альбуміну в альбуміновій фракції, виділений таким чином, міститься 10-16 видів інших білків. Також містяться в деяких серіях 25 % баластних високомолекулярних білків, що може призводити до неможливості стерилізуючої фільтрації, недостатнього нагромадження біомаси або відсутності росту культур та збільшення реактогенності вакцин, що виготовляють на середовищах з використанням такого альбуміну [3].

В основу винаходу поставлена задача розробити технологічний спосіб одержання чистого альбуміну бичачого сироваткового, який можна використовувати для культивування лептоспір з метою підтримки штамів, виготовлення вакцин проти лептоспірозу і діагностикумів. Для досягнення задачі винаходу використали спосіб, що включає виділення альбумінової фракції із сироватки крові великої рогатої худоби, згідно винаходу, виділення проводять методом хроматографії з використанням макропористих кремнеземвмісних сорбентів марки "СХ-50", з подальшою регенерацією сорбентів розчином Комаровського та зрівноваженням хроматографічної колонки за допомогою 0,05 М калій-фосфатного буферного розчину з рН-7,2.

Спосіб здійснюють наступним чином: проводять регенерацію сорбентів марки "СХ-50" розчином Комаровського. На водяній бані кремнезем із розчином Комаровського доводять до кипіння і кип'ятять на малому вогні 1 год. Підготовленим та-

(19) UA (11) 42436 (13) A

ким чином, кремнеземом наповнюють хроматографічну колонку рівномірно і щільно, проводять зрівноваження колонки за допомогою 0,05 М калій-фосфатного буферного розчину з рН-7,2, в колонку заливують сироватку крові великої рогатої худоби (рН 7,2), об'єм якої становить 1/5 об'єму колонки. Об'єм колонки розраховують за формулою  $V_{\text{кол}} = S \times H$ , де  $S$  - це площа колонки, яка визначається за формулою  $S = \pi r^2 / 4$ , де  $r$  - радіус колонки, а  $H$  - висота колонки.

Збирають фракції при довжині хвилі  $\lambda$ -280 нм, та значенні показника оптичної густини (ОГ) 0,05. Об'єднують отримані фракції в одну, заміряють ОГ і визначають імунологічну чистоту методом електрофорезу у поліакрилідному гелі (ПААГ).

При хроматографічному розділенні сироватки крові глобуліни першими осідають на кремнезем, а альбумін - інертний білок, безперешкодно виходить із колонки. Крім імуноглобулінів на колонці сорбуються токсичні елементи. Усунення фактора токсичності є дуже важливим при культивуванні лептоспир.

Методом електрофорезу встановили, що альбумін, одержаний методом висолювання сірчано-кислим амонієм, містить ще фракцію глобулінів, а альбумін, одержаний методом хроматографії, є чистим препаратом (див. фіг. 1).

Порівняльні результати використання альбумінів, що досліджувались в поживних середовищах для культивування лептоспир, представлені у таблиці.

Наведені дані середнього нагромадження лептоспир у середовищі ЕМЖН з альбуміном, виготовленим методом висолювання сірчано-кислим амонієм та альбуміном, виготовленим методом хроматографії з використанням макропористих кремнеземвмісних сорбентів марки "СХ-50".

З даних таблиці, середнє нагромадження біомаси лептоспир при використанні альбуміну виготовленого методом хроматографії становить  $430 \pm 2,4$ , що в 1,6 разів більше, ніж при використанні альбуміну, виготовленого методом висолювання сірчано-кислим амонієм -  $275 \pm 2,8$ .

Альбумін, виділений методом хроматографії з використанням макропористих кремнеземів, є чистим препаратом, не містить домішок інших білків, придатний для виготовлення живильних середовищ для культивування лептоспир і на їх основі виготовлення якісних вакцин і діагностиків.

Альбумін, виготовлений цим методом, є дешевим (за рахунок використання сироватки крові великої рогатої худоби, яка на м'ясокомбінатах є відходом виробництва), виготовлення його є технологічним процесом.

На графічних матеріалах зображена електрофореграма альбуміну, одержаного двома способами. На фіг. 1 (позиція 1) зображено фракцію альбуміну, виготовленого методом хроматографії з використанням макропористих кремнеземвмісних сорбентів марки "СХ-50". На фіг. 2 зображено, що альбумін, виготовлений методом висолювання сірчано-кислим амонієм, містить фракцію альбуміну (позиція 2) та фракцію глобулінів (позиція 3).

Джерела інформації

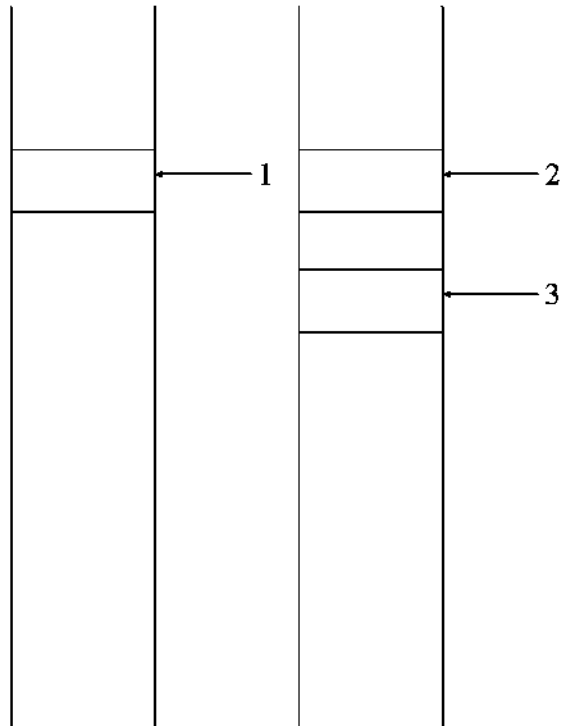
1. Коликов В.М., Мгедлишвили Б.В. Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах - Ленинград, Наука, 1986 г.

2. Малахов Ю.А. Лептоспироз животных - Москва - 1992 г.

3. И.А. Артюшина, А.С. Фоменко, Г.И. Ежов, С.К. Артюшин. Изучение вариабельности липидного и белкового состава альбуминовой фракции сыворотки // Комплексные гигиенические исследования в практику здравоохранения - Новокузнецк, 1981 - С. 439-440.

Таблиця

Штамп лептоспир	Середовище ЕМЖН з альбуміном, виготовленим методом висолювання сірчано-кислим амонієм	Середовище ЕМЖН з альбуміном, виготовленим методом хроматографії з використанням макропористих кремнеземвмісних сорбентів марки "СХ-50"
493 Poland	$217 \pm 3,2$	$421 \pm 1,3$
Kabura	$277 \pm 2,1$	$456 \pm 1,9$
Perepelicyн	$198 \pm 3,3$	$339 \pm 2,9$
Pomona	$251 \pm 1,1$	$445 \pm 0,9$
Moskva V	$372 \pm 3,2$	$435 \pm 1,8$
Hond Utrecht IV	$249 \pm 2,3$	$427 \pm 3,4$
M 20	$354 \pm 3,6$	$462 \pm 3,8$
Jes Bratislava	$280 \pm 3,7$	$451 \pm 3,2$



**Фіг. 1**

**Фіг. 2**

---

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

---

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2002 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

---