



Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 17.12.1971 (P. 152229)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.1973

Opis patentowy opublikowano: 10.09.1975

Kl. 30h,2/04

MKP C07g 7/00

Twórcy wynalazku: Maria Górna, Barbara Grabarek, Jerzy Strzelecki
Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Mięsnego,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania albuminy z krwi zwierzęcej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolowania frakcji albuminowej z osocza lub surowicy krwi zwierzęcej, a zwłaszcza wołowej, umożliwiający uzyskanie albuminy o 100% czystości elektroforetycznej.

Przyjęte ogólnie metody izolacji frakcji białkowych opierają się bądź na kolejnych ekstrakcjach alkoholem w temperaturach ujemnych i przez sterowanie takimi wielkościami, jak pH środowiska, siła jonowa, stężenie białka, zdolność tworzenia kompleksów z niektórymi metalami dwuwartościowymi i temperatura pozwalają na uzyskanie pożądaných grup białek, bądź też na wysalaniu tych białek solami nieorganicznymi takimi, jak siarczany amonu i siarczany sodu w pH środowiska, określającym punkt izoelektryczny izolowanej frakcji białkowej.

Ekstrakcja alkoholem jest procesem wieloetapowym, czasochłonnym przebiegającym w temperaturach -5 do -12° co wymaga kosztownych inwestycji. Stosuje się również do izolacji frakcji białkowych w szczególności do globulin z krwi ludzkiej metody łączące w sobie elementy ekstrakcji alkoholem ze strąceniem niektórych białek poprzez tworzenie nierozpuszczalnych kompleksów z cynkiem lub glinem, co przy równoczesnych zmianach pH pozwala na izolowanie poszczególnych frakcji białkowych.

Metody te dotychczas nie zostały przystosowane do izolacji frakcji białkowych krwi zwierząt rzeź-

2

nych, a w postaci oryginalnej nie pozwalają na uzyskiwanie czystych preparatów. Natomiast klasyczne metody izolacji albuminy jako jednej z frakcji białkowych, polegające na wysalaniu jej z roztworu surowicy krwi lub osocza ludzi i zwierząt przy określonej kwasowości środowiska, nie pozwalają na uzyskanie wysokiego stopnia czystości białka. Dzieje się tak dlatego, że podczas dodawania do roztworu surowicy krwi lub osocza soli nieorganicznych mimo intensywnego mieszania istnieją wewnątrz roztworu dość znaczne lokalne zróżnicowania nasycenia, a co za tym idzie wysolone globuliny są zanieczyszczone albuminami, a strącone w $\text{pH} = 4,5$ albuminy są znacznie zanieczyszczone alfa, beta i gama globulinami.

Celem wynalazku było opracowanie prostego, nie wymagającego złożonej aparatury i ujemnych temperatur sposobu izolowania albuminy z krwi zwierzęcej, a zwłaszcza wołowej. Okazało się to możliwe dzięki opracowaniu metody, polegającej na izolowaniu albuminy o 100% czystości elektroforetycznej na drodze oddzielenia 80% globulin poprzez utworzenie ich nierozpuszczalnych kompleksów z cynkiem, a następnie usunięcie pozostałych jeszcze w roztworze głównie alfa i beta globulin przez wysolenie ich siarczanem amonu i wreszcie spowodowanie wypadnięcia czystych albumin z roztworu po ustaleniu pH środowiska na 4,5.

Sposób otrzymywania albuminy z krwi zwierzęcej według wynalazku przedstawia się następująco: Do surowicy lub osocza krwi wołowej o temperaturze od +1 do +4, korzystnie +2°, umieszczonoj w reaktorze, dodaje się soli fizjologicznej w stosunku 1:1, a następnie wolno kroplami z rozdzielacza 0,5 M roztwór dwuwodnego octanu cynku, równocześnie silnie mieszając. Octan cynku tworzy z globulinami nierozpuszczalne kompleksy. Tworzeniu się ewentualnych kompleksów cynku z albuminami zapobiega się przez ustalenie pH roztworu na 7,4, a więc w pobliżu punktu izoelektrycznego globulin i tym samym mniejszej ich rozpuszczalności. W roztworze nad osadem globulin pozostaje frakcja albuminowa z domieszką alfa i beta globulin. Alfa i beta globulinę usuwa się następnie przez wysolenie ich z roztworu siarczanem amonu w pH zbliżonym do 5,4, a więc w granicach ich punktu izoelektrycznego. W roztworze zawierającym tylko albuminy po odwirowaniu alfa i beta globulin ustala się pH na 4,5, w którym to pH albuminy charakteryzują się najmniejszą rozpuszczalnością i wypadają z roztworu nasyconego w 55% siarczanem amonu. Cały proces wysalania siarczanem amonu przeprowadza się w temperaturze pokojowej.

Osad albumin po odwirowaniu i wymieszaniu z solą fizjologiczną w stosunku 1:1 poddaje się dializie wobec soli fizjologicznej, a następnie suszy się ze stanu zamrożenia lub sący jałowo.

Proces otrzymywania albumin sposobem według wynalazku przeprowadzać można przy zastosowaniu zestawu aparaturowego, składającego się z ultratermostatu, zaopatrzonego w dwa pojemniki na stały dwutlenek węgla — jest to chłodzenie I stopnia oraz pompę tłoczącą, ultratermostatu i układu chłodzącego II stopnia. Ultratermostat połączony jest rurką szklaną z układem chłodzącym II stopnia, składającym się z szeregu równolegle ułożonych rur szklanych, obłożonych suchym lodem i izolowanych podwójną warstwą styropianu i folii polistyrenowej. Układ chłodzący II stopnia połączony jest rurką spiralną ze szkła, stanowiącą element chłodzący reaktora. Reaktor ponadto jest zaopatrzony w mieszadło mechaniczne i posiada pokrywę z otworami, w których są zainstalowane dozatory. Reaktor ma odpływ w dnie naczynia. Element chłodzący reaktora połączony jest przewodem gumowym z ultratermostatem, co stanowi zamknięty układ chłodzenia.

Albumina zwierzęca, a zwłaszcza wołowa, otrzymana sposobem według wynalazku, charakteryzuje się 100% czystością elektroforetyczną, ma barwę białą i jest całkowicie rozpuszczalna w wodzie i soli fizjologicznej. Wydajność procesu waha się w granicach 50—55%.

Przykład I. Do trzydziestu litrów surowicy lub osocza krwi wołowej o temperaturze +2°, rozcieńczonej w stosunku 1:1 ochłodzoną solą fizjologiczną dodano z rozdzielacza wolno po kropili, stale mieszając, 4 l ochłodzonego do +2° 0,5 M dwuwodnego octanu cynku. Następnie, nie przestając mieszać, przez dodatek około 1 l 1 M roztworu nieorganicznego wodorotlenku ustalono pH roztworu na 7,4. W tym czasie pozostawiono płyn,

wolno mieszając do następnego dnia. Następnie odwirowano osad, a do roztworu dodano z rozdzielacza, silnie mieszając, nasycony roztwór siarczanu amonu aż do osiągnięcia 55% nasycenia roztworu, zawierającego albuminy oraz około 20% alfa i beta globulin. Te ostatnie jako charakteryzujące się mniejszą od albumin rozpuszczalnością wypadają z roztworu szczególnie w pH = 5,4. Proces wysalania alfa i beta globulin prowadzono w temperaturze pokojowej. Po odwirowaniu osadu alfa i beta globulin w roztworze poprzez zmianę pH na 4,5 spowodowano wypadnięcie osadu albumin. W tym celu dodawano wolno z wkraplacza 0,75 l 1 M roztworu kwasu nieorganicznego, np. HCl. Uzyskany osad odwirowano w ciągu 20 minut przy 3000 obrotów na minutę. Odwirowany osad ważono, a następnie rozcieńczano w stosunku 1:1 solą fizjologiczną i w woreczkach z tomofanu dializowano wobec soli fizjologicznej. Po dializie roztwór, zawierający około 15% białka frakcji albuminowej, suszono w próżni ze stanu zamrożenia.

W celu zapewnienia prawidłowego przebiegu wyżej opisanego procesu technologicznego przeprowadzono go, umieszczając surowicę lub osocze krwi wołowej rozcieńczone solą fizjologiczną w reaktorze o pojemności 100 l, wyposażonym w mieszadło mechaniczne oraz spiralę z rurki szklanej, przez którą przepływała mieszanina chłodząca, pozwalająca na uzyskiwanie w czasie izolacji frakcji białkowych temperatur w granicach +2 do +3° wewnątrz roztworu. Przez tę spiralę w czasie izolowania frakcji białkowych przepływał roztwór 10% glicerolu w wodzie. Roztwór glicerolu był częściowo ochłodzony w ultratermostacie, zaopatrzonym w dwa pojemniki zawierające stały dwutlenek węgla. Z ultratermostatu 10% roztwór glicerolu był przepompowywany do systemu równolegle ułożonych rurek ze szkła Simax, obłożonych stałym dwutlenkiem węgla i izolowanych szczelnie od otaczającej atmosfery dwoma warstwami styropianu oraz folią, co umożliwiało utrzymanie temperatury roztworu glicerolu w granicach -15° w ciągu godzin, nawet po zużyciu się stałego dwutlenku węgla w pojemnikach ultratermostatu. Roztwór glicerolu po przepłynięciu przez zestaw rurek obłożonych suchym lodem w pojemniku styropianowym i po osiągnięciu -15° sphywał dalej rurką szklaną, umieszczoną wewnątrz reaktora, a stanowiącą element chłodzący reaktora. Z reaktora roztwór glicerolu przewodem wracał do ultratermostatu, gdzie ponownie ulegał schłodzeniu i był dalej przepompowywany opisaną już drogą.

Przykład II. Postępowano, jak w przykładzie I, do momentu otrzymania osadu, zawierającego albuminę o 100% czystości elektroforetycznej w postaci nierozpuszczalnego kompleksu z rodnikiem amonowym. Następnie osad ważono, rozcieńczano solą fizjologiczną w stosunku 1:2 i nanoszono na kolumnę chromatograficzną napełnioną amberlitem IRC-50 podstawionym sodem. Po przepuszczeniu przez kolumnę rozpuszczalną albuminę poddawano procesowi suszenia ze stanu zamrożenia w próżni.

Przykład III. Postępowano, jak w przykładzie I, do momentu otrzymania 15% roztworu rozpuszczalnych albumin o 100% czystości elektroforetycznej, a następnie otrzymany roztwór sączono jałowo.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania albuminy z krwi zwierzęcej, a zwłaszcza wołowej, o 100% czystości elektroforetycznej, **znamienny** tym, że roztwory białek surowicy lub osocza krwi zwierzęcej poddaje się

działaniu soli cynku w temperaturze +1 do +4°, korzystnie +2°, przy pH około 7,4, następnie odwirowuje się powstały osad, składający się z nierozpuszczalnych kompleksów globulin z cynkiem, po czym pozostałe jeszcze głównie alfa i beta globuliny usuwa się z roztworu przez wysolenie ich siarczanem amonu i odwirowanie, a pozostały roztwór zakwasza się przy pomocy kwasu mineralnego do uzyskania pH = 4,5 po czym powstały osad albumin po odwirowaniu i wymieszaniu z solą fizjologiczną w stosunku 1:1 poddaje się dializie, następnie liofilizuje lub sączy jałowo.