

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044709**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.26

(51) Int. Cl. *A01K 67/033* (2006.01)
A23K 50/90 (2016.01)

(21) Номер заявки
202100067

(22) Дата подачи заявки
2019.07.23

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ЛИЧИНОК GALLERIA MELLONELLA С
ВЫСОКОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

(31) а 2018 0081

(32) 2018.09.19

(33) MD

(43) 2021.06.10

(86) PCT/MD2019/000005

(87) WO 2020/060382 2020.03.26

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

ЧУХРИЙ ЧЕСЛАВ (MD)

(74) Представитель:

Ломский С.М. (RU)

(56) RU-C1-2038086

BRASLAVSKY V. B. et al.: Issledovanie elektronnykh spektrov flavonoidov topolia i propoliusa. Meditsinsky almanakh, 2011, N 2(15), p. 141, col. 2, para. 2

CN-A-107182948

JORJAO Adeline L. et al.: From moths to caterpillars: ideal conditions for Galleria mellonella rearing for in vivo microbiological studies. Virulence, 2018, N 9 (1), сс. 383-389, с 386, col. 1, para. 2, DOI:https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871

(57) Изобретение относится к биотехнологии, а именно к получению биомассы личинок *Galleria mellonella*, обладающей высокой биологической активностью. Предлагается способ получения биомассы личинок *Galleria mellonella*, обладающей высокой биологической активностью, на питательной среде следующего состава, в г/кг: пшеничная мука 185-200 г; кукурузная мука 180-190 г; пшеничные отруби 110-130 г; дрожжевой экстракт 15-20 г; сухое молоко 120-140 г; пчелиный мед 75-95 г; глицерин 80-90 г; восковая пыль 40-55 г; пинобанксин 0,02-0,03 г; пиноцембрин 0,02-0,03 г; очищенная вода до 1000 г; личинки собирают на 19-й день для получения биомассы с высокой кератолитической активностью (в 2 раза больше чем в самом близком решении), на 20-й день - с более высокой антиоксидантной активностью (в 1,3 раза) и на 21-й день - с более высокой противовоспалительной активностью (в 1,3 раза).

B1

044709

044709

B1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к получению энтомологической биомассы - личинок *Galleria mellonella* с высокой биологической активностью (например, кератолитической, антиоксидантной, противовоспалительной и т.д.), которая может быть использована в качестве сырья для производства фармацевтических препаратов и косметических средств.

Известен способ получения биомассы личинок *Galleria mellonella*, который включает выращивание личинок первого-второго возраста на питательной среде, которая содержит пшеничную муку (110 г), пекарские дрожжи (100 г), сухое молоко (70 г), воск (50 г), глицерин (80 г), пшеничные отруби (350 г), пчелиный мед (50 г) и воду (160 г); а личинок третьего-четвертого возраста - на среде, которая содержит пшеничные отруби (350 г), пшеничную муку (110 г), пекарские дрожжи (100 г), сухое молоко (70 г), воск (50 г), глицерин (80 г), воду (210 г) [1]. Личинки предназначены для использования в качестве организма-хозяина для различных патогенов в научных исследованиях [1].

Недостатком этого способа является использование бедной питательной среды для выращивания личинок третьего-четвертого возраста, которая не может обеспечить высокую биологическую ценность биомассы.

Также известен способ получения биомассы личинок *Galleria mellonella*, включающий инкубацию личинок последнего возраста или куколок в контейнерах, в темноте в течение 1-3 недель для получения максимального количества яиц, переноса яиц (два раза в неделю) в контейнеры для пищевых продуктов на 20 дней для получения личинок. Питательная среда, используемая для кормления личинок, имеет следующий состав: кукурузная мука 250 г, дрожжевой экстракт 150 г, соевая мука 100 г, сухое молоко 100 г, пчелиный мед 200 г, глицерин 200 г, блоки пчелиного воска. Личинки характеризуются высокой устойчивостью к инфекциям *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* и используются в качестве хозяев при изучении энтомопатогенов [2].

Недостатком способа является то, что полученные личинки существенно различаются по размерам (от 1 до 2 см) и качеству биомассы из-за разного возраста, что недопустимо, когда биомасса используется в качестве сырья для производства косметических или фармацевтических веществ.

Также известен способ получения личинок *Galleria mellonella*, заключающийся в том, что яйца насекомых помещают в пластиковые ящики с питательной средой, где они развиваются в течение 51 дня. Используемая питательная среда имеет следующий состав: 118 г пшеничной муки, 206 г пшеничных отрубей, 118 г сухого молока, 88 г пивных дрожжей, 24 г воскового порошка, 175 мл меда и 175 мл глицерина. Полученные личинки используются в качестве организма-хозяина для выращивания энтомофаговых нематод [3].

Недостаток этого способа заключается в 51-дневной продолжительности процесса роста, что приводит к значительному удорожанию технологии выращивания насекомых.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является способ получения биомассы личинок *Galleria mellonella* [4] для использования в качестве сырья для производства косметических и фармацевтических препаратов, обладающих кератолитическим эффектом. Этот процесс включает в себя три последовательных этапа: 1. Подготовка условий для прохождения полного жизненного цикла в условиях искусственного выращивания. Для выращивания насекомых используются помещения площадью 20 м². Стены окрашены специальной смесью, которая обеспечивает возможность дезинфекции дезинфицирующими растворами. В помещениях, где инкубируют яйца, температуру поддерживают на уровне 26±2°C, а влажность - 70%. Помещения, в которых выращивают личинки, оборудованы темными коробками и обеспечены автоматическими системами контроля температуры и влажности. В этих помещениях поддерживают температуру 30-31°C и влажность 80%;

2. Выращивание насекомых

Сразу после вылупления личинки переносят из инкубационных комнат в помещения, предназначенные для выращивания личинок. Личинки помещают в темные контейнеры, где поддерживаются необходимые условия, а насекомые получают необходимое питание - питательная среда следующего состава: экстракт желтой кукурузы 174,0-206,0 г, экстракт красной кукурузы 183,0-214,0 г, глюкоза 70,0-85,0 г, фруктоза 65,0-81,0 г, сахароза 4,0-4,8 г, мальтоза 4,0-5,0 г, казеин 117,0-148,0, ретинол (витамин А) 2500-3000 Ед, токоферола ацетат (витамин Е) 40-58 Ед, витамин С 0,05-0,06 г, рибофлавин (витамин В₂) 0,0014-0,0017 г, пантотенат кальция (витамин В₅) 0,005-0,01, тиамин (Витамин В₁) 0,002-0,003 г, пиридоксин 0,003-0,004 г, биотин 0,00002-0,00003 г, ниацин (витамин В₃) 0,0002-0,0003 г, пинобанксин 0,015-0,020 г, пиноцембрин 0,010-0,015 г, глицерин 120,0-139,0 г, NaNO₃ 0,8-1,1 г, KН₂PO₄ 1,7-2,0 г, NaCl 1,5-2,0 г, CaCl₂ 0,2-0,5, MgSO₄ * 7H₂O 0,05-0,1 г, ZnSO₄ * 7H₂O 0,005-0,01 г, MnSO₄ * 5H₂O 0,007-0,015 г, CuSO₄ * 5H₂O 0,007-0,008 г, FeCl₃ * 6H₂O 0,0100-0,0175 г, ЭДТА 0,006-0,0075 г, желтый воск 250-350 г, очищенная вода - до 1000 г.

3. Сбор личинок

Личинки собирают при вступлении в 7-ой возраст, сразу же после линьки. Эта биомасса используется для получения активного комплекса обладающего кератолитическим действием.

Недостатком этого способа является применение очень сложной питательной среды, состоящей из более 30 компонентов, а также сбор личинок сразу после линьки, когда количество ферментов, обладающих кератолитическим эффектом, уменьшается в результате их использования в процессе удаления

старого экзоскелета.

Также недостатком всех описанных выше способов является то, что развитие личиночной стадии насекомого *Galleria mellonella*, который включает от 3 до 10 линек (в зависимости от приведенного примера), происходит в одних и тех же контейнерах, в которые были помещены яйца или личинки первого - второго возраста. Это приводит к накоплению продуктов жизнедеятельности насекомых и снижению выхода биомассы.

Задача, решаемая настоящим изобретением, заключается в разработке нового эффективного способа получения биомассы личинок *Galleria mellonella* с высокой биологической активностью.

Сущность изобретения заключается в том, что предлагается способ получения биомассы личинок *Galleria mellonella* с высокой биологической активностью, заключающийся в подготовке условий для выращивания личинок в искусственных условиях, выращивании личинок на питательной среде и сборе личинок, а питательная среда для личинок *Galleria mellonella* имеет следующий состав, г/кг:

Пшеничная мука 185-200 г
 Кукурузная мука 180-190 г
 Пшеничные отруби 110-130 г
 Дрожжевой экстракт 15-20 г
 Сухое молоко 120-140 г
 Пчелиный мед 75-95 г
 Глицерин 80-90 г
 Восковой порошок 40-55 г
 Пинобанксин 0,02-0,03 г
 Пиноцембрин 0,02-0,03 г
 Очищенная вода до 1000 г,

в течение периода выращивания личинок проводят не менее 2-х переносов на свежую питательную среду, а личинки собирают на 19-й день для получения биомассы с высокой кератолитической активностью, на 20-й день для получения биомассы с высокой антиоксидантной активностью и на 21-й день для получения биомассы с высокой противовоспалительной активностью.

Технический результат изобретения по сравнению с наиболее близким решением состоит в том, что способ получения биомассы личинок *Galleria mellonella* включает более простую и менее дорогую среду, которая обеспечивает получение большего количества биомассы (149,7-160,0 мг биомассы в среднем на 1 г по сравнению с 113,6-121,3 для прототипа) с более высокой биологической активностью. При этом затраты на питательную среду снижаются на 75%.

Технический результат изобретения обусловлен также тем, что по сравнению с наиболее близким решением для получения биомассы с высокой кератолитической активностью личинки *Galleria mellonella* собирают на 19-й день перед шестой линькой, а не после нее, что обеспечивает рост данного показателя в два раза. Для получения биомассы с высокой антиоксидантной активностью (в 1,3 раза больше чем в самом близком решении) личинки собирают на 20-й день, а для получения биомассы с высокой противовоспалительной активностью (в 1,3 раза больше чем в самом близком решении) - на 21-й день.

Примеры применения изобретения

Пример 1. Получение биомассы личинок *Galleria mellonella* с кератолитической активностью

Куколки *Galleria mellonella* достают из холодильника, где хранились при температуре 3-5°C и оставляют при комнатной температуре на 2 ч. По истечении этого времени куколки переносят в закрытые контейнеры, содержащие небольшое количество питательной среды (1/10 объема контейнера) для их последующего развития и перехода в фазу имаго и откладки яиц. Для инициации вылупления личинок из яиц в темных контейнерах поддерживают температуру 27°C и относительную влажность 75%. Через 48 ч после помещения куколок в контейнеры появляются личинки первого возраста. Процесс контролируется на протяжении периода времени, за который обеспечивается 80%-ый выход, но не более 6 ч.

Используемая питательная среда имеет следующий состав, г/кг:

Пшеничная мука 185 г
 Кукурузная мука 180 г
 Пшеничные отруби 110 г
 Дрожжевой экстракт 15 г
 Сухое молоко 120 г
 Пчелиный мед 75 г
 Глицерин 80 г
 Восковой порошок 40 г
 Пинобанксин 0,02 г
 Пиноцембрин 0,02 г
 Очищенная вода до 1000 г

Подготавливаются новые контейнеры с питательной средой. Через 6 ч после начала вылупления личинки первого поколения выбираются пинцетом из контейнеров, в которых они появились, и помещаются в подготовленные контейнеры. Рост личинок длится 19 дней со дня первого переноса. Темпера-

тура контейнера поддерживается на уровне 27°C, а относительная влажность составляет 75% в темных условиях. В течение данного периода на 7-й день и 14-й день проводят два переноса личинок на свежую питательную среду.

Для получения биомассы личинок с высокой кератолитической активностью сбор личинок происходит на 19-й день культивирования, до начала 6-ой линьки личинок. Личинки дважды промывают четырехкратными объемами физиологического раствора и еще дважды четырехкратными объемами очищенной воды.

В полученной биомассе определяют качественные и количественные показатели. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Таблица 1

Параметр	Согласно самому близкому решению	Согласно предложенному способу
Стоимость одного кг питательной среды	100%	25%
Количество биомассы	113,6±6,2	149,7±2,9
личинок (мг) полученных с одного г среды		
Кератолитическая активность, Ед/мг сухого вещества	1,96 ±0,05	4,05±0,04

Данные в табл. 1 доказывают, что использование упрощенной среды приводит к значительному снижению затрат на производство личинок (затраты на питание в предлагаемом решении составляют 25% от стоимости среды-прототипа), а количества биомассы, произведенной с использованием одного грамма среды больше на 31,8% по сравнению с прототипом. Также увеличивается кератолитическая активность биомассы в два раза.

Пример 2. Получение биомассы личинок *Galleria mellonella* с высокой антиоксидантной активностью

Куколки *Galleria mellonella* достают холодильника, где хранились при температуре 3-5°C и оставляют при комнатной температуре на 2 ч. По истечении этого времени куколки переносят в закрытые контейнеры, содержащие небольшое количество питательной среды (1/10 объема контейнера) для их последующего развития и перехода в фазу имаго и откладки яиц. Для инициации вылупления личинок из яиц в темных контейнерах поддерживают температуру 27°C и относительную влажность 75%. Через 48 ч после помещения куколок в контейнеры появляются личинки первого возраста. Процесс контролируется на протяжении периода времени, за который обеспечивается 80%-ый выход, но не более 6 ч.

Используемая питательная среда имеет следующий состав, г/кг:

Пшеничная мука 200 г
 Кукурузная мука 190 г
 Пшеничные отруби 130 г
 Дрожжевой экстракт 20 г
 Сухое молоко 140 г
 Пчелиный мед 95 г
 Глицерин 90 г
 Восковой порошок 55 г
 Пинобанксин 0,03 г
 Пиноцембрин 0,03 г
 Очищенная вода до 1000 г

Подготавливаются новые контейнеры с питательной средой. Через 6 ч после начала вылупления личинки первого поколения выбираются пинцетом из контейнеров, в которых они появились, и помещаются в подготовленные контейнеры. Рост личинок длится 20 дней со дня первого переноса. Температура контейнера поддерживается на уровне 27°C, а относительная влажность составляет 75% в темных условиях. В течение данного периода на 7-й день и 14-й день проводят два переноса личинок на свежую питательную среду.

Для получения биомассы личинок с высокой антиоксидантной активностью сбор личинок происходит на 20-й день культивирования. Личинки дважды промывают четырехкратными объемами физиологического раствора и еще дважды четырехкратными объемами очищенной воды.

В полученной биомассе определяют качественные и количественные показатели. Полученные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2

Параметр	Согласно самому близкому решению	Согласно предложенному способу
Стоимость одного кг питательной среды	100%	25%
Количество биомассы личинки (мг) полученных с одного г среды	118,4	156,1
Антиоксидантная активность, Тролокс мг- эквивалент / г биомассы	28,4±0,2	36,8±0,6

Данные в табл. 2 показывают, что количество биомассы, полученной с использованием одного грамма среды, увеличивается на 31,7% по сравнению с прототипом. Также увеличивает антиоксидантная активность биомассы в 1,3 раза.

Пример 3. Получение биомассы личинок *Galleria mellonella* с противовоспалительной активностью

Куколки *Galleria mellonella* достают из холодильника, где хранились при температуре 3-5°C и оставляют при комнатной температуре на 2 ч. По истечении этого времени куколки переносят в закрытые контейнеры, содержащие небольшое количество питательной среды (1/10 объема контейнера) для их последующего развития и перехода в фазу имаго и откладки яиц. Для инициации вылупления личинок из яиц в темных контейнерах поддерживают температуру 27°C и относительную влажность 75%. Через 48 ч после помещения куколок в контейнеры появляются личинки первого возраста. Процесс контролируется на протяжении периода времени, за который обеспечивается 80%-ый выход, но не более 6 ч.

Используемая питательная среда имеет следующий состав, г/кг:

Пшеничная мука 190 г
 Кукурузная мука 180 г
 Пшеничные отруби 125 г
 Дрожжевой экстракт 18 г
 Сухое молоко 130 г
 Пчелиный мед 90 г
 Глицерин 90 г
 Восковой порошок 55 г
 Пинобанксин 0,03 г
 Пиноцембрин 0,03 г
 Очищенная вода до 1000 г

Подготавливаются новые контейнеры с питательной средой. Через 6 ч после начала вылупления личинки первого поколения выбираются пинцетом из контейнеров, в которых они появились, и помещаются в подготовленные контейнеры.

Рост личинок длится 21 дней со дня первого переноса. Температура контейнера поддерживается на уровне 27°C, а относительная влажность составляет 75% в темных условиях.

В течение данного периода на 7-й день и 14-й день проводят два переноса личинок на свежую питательную среду.

Для получения биомассы личинок с высокой противовоспалительной активностью сбор личинок происходит на 21-й день культивирования. Личинки дважды промывают четырехкратными объемами физиологического раствора и еще дважды четырехкратными объемами очищенной воды.

В полученной биомассе определяют качественные и количественные показатели. Полученные результаты приведены в табл. 3.

Таблица 3

Параметр	Согласно самому близкому решению	Согласно предложенному способу
Стоимость одного кг питательной среды	100%	25%
Количество биомассы личинки (мг) полученных с одного г среды	121,3±2,7	160,0±0,8
Снижение количества высвобожденного IL ₈ (%) к контролю)	28,5±0,7	37,1±0,2

Данные в табл. 3 демонстрируют, что количество биомассы, полученной с использованием одного грамма среды, увеличивается на 31,9% по сравнению с прототипом. Также наблюдался более высокий

уровень противовоспалительной активности, выражающийся в снижении уровня провоспалительного фактора - интерлейкина 8 (снижение в предлагаемом способе на 37,1% по сравнению со снижением на 28,5% для прототипа).

Источники:

1. Исмаилов В.Я., Ширинян Ж.А., Квасенков О.И. Способ разведения *Galleria mellonella*, Патент RU 2210210, publicat la 20.08.2003.

2. Adeline L. Jorjao, Luciane D. Oliveira, Liliana Scorzoni, Livia Mara A. Figueiredo-Godoi, Marcia Cristina A. Prata, Antonio Olavo C Jorge & Juliana C Junqueira (2018) From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies, *Virulence*, 9:1, 383-389.

3. C.van Zyl, A.P.Malan. Cost-Effective Culturing of *Galleria mellonella* and *Tenebrio Molitor* and Entomopathogenic Nematode Production in Various Hosts. *African Entomology* 23(2):361-375, 2015.

4. Ciuhrii V. Complex de origine entomologica in propilenglicol cu aciune cheratolitica, procedeu de obtinere a acestuia, produse farmaceutice si cosmetice pe baza lui (variante). Brevet de inventie, MD 4198, BOPI nr.2, 2013.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения биомассы личинок *Galleria mellonella* с высокой биологической активностью, заключающийся в подготовке условий для выращивания личинок в искусственных условиях, выращивании личинок на питательной среде и сборе личинок, а питательная среда для личинок *Galleria mellonella* имеет следующий состав, г/кг: пшеничная мука 185-200 г; кукурузная мука 180-190 г; пшеничные отруби 110-130 г; дрожжевой экстракт 15-20 г; сухое молоко 120-140 г; пчелиный мед 75-95 г; глицерин 80-90 г; восковой порошок 40-55 г; пинобанксин 0,02-0,03 г; пиноцембрин 0,02-0,03 г; очищенная вода до 1000 г; и в течение периода выращивания личинок проводят не менее 2-х переносов на свежую питательную среду, а личинки собирают на 19-й день для получения биомассы с высокой кератолитической активностью, на 20-й день для получения биомассы с высокой антиоксидантной активностью и на 21-й день для получения биомассы с высокой противовоспалительной активностью.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
