

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРОДУКТА ИЗ ЛИЧИНОК БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ

7 Март 2012

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Заявка: 4938002/14, 26.03.1991

Опубликовано: 27.06.1995

Список документов, цитированных в отчете о поиске: Авторское свидетельство СССР N 1284229, кл. А 61К 35/04, 1989.

Заявитель(и):

Институт теоретической и экспериментальной биофизики АН СССР

Автор(ы):

Спиридонов Н.А.,
Рачков А.К.,
Мухин С.А.,
Кондрашова М.Н.

Патентообладатель(и):

Спиридонов Николай Алексеевич

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРОДУКТА ИЗ ЛИЧИНОК БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ

Реферат:

Изобретение относится к биологии и фармакологии. Цель изобретения – получение из личинок большой восковой моли стандартизованного биологически активного продукта, обладающего биостимулирующим, адаптогенным и кардиозащитным действием на основе малоактивных продуктов пчелиной семьи. Для этого экстракцию биологически активного продукта проводят 40%-ным этанолом из личинок моли последнего возраста массой 150 мг и более, выращенных вне улья на темной восковой суши, при 20 – 25°C, в темноте, в течение 20 суток до полной экстракции продукта. 3 ил., 6 табл. Изобретение относится к биологии и фармакологии и может быть использовано для получения биологически активного продукта из личинок большой восковой моли. Большая восковая моль *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae, далее восковая моль) является повсеместно распространенным паразитом пчелиной семьи. Восковую моль разводят и используют для различных целей: в качестве лабораторного хозяина при выращивании насекомых энтомофагов, применяемых для биологической защиты растений в сельском хозяйстве; в качестве тест-объекта для оценки активности и качества бактериальных препаратов; а также в качестве объекта биохимических и физиологических исследований в энтомологии. Для выращивания восковой моли в лабораторных условиях в качестве корма используют пчелиные соты, цветочную пыльцу, пыльцу с добавками пчелиного воска, а также искусственные питательные среды различного состава. Наиболее удобной и широкоиспользуемой при массовом выращивании насекомого является искусственная среда с добавками пчелиного воска и меда, разработанная Марстоном с соавторами и модифицированная Ю.И.Кузнецовой. В лабораторных условиях восковую моль выращивают в чашках Петри, стеклянных банках, снабженных крышками с мелкоячеистой впаянной сеткой. Для массового разведения насекомого используют специальные контейнеры. Известен способ выделения из восковой моли препарата липаз, являющихся пищеварительными ферментами насекомого, которые обладают антимикробным действием по отношению к *Mycobacterium tuberculosis*. Для этого личинок восковой моли, собранных в пчелином улье, растирают и высушивают методом Виллштаттера, затем проводят экстракцию липаз из полученного порошка эмульгирующей смесью, содержащей

50% глицерина и 1,5% карбокселя, затем липазы осаждают ацетоном и подвергают лиофилизации. Недостатком данного способа является ограниченность спектра биологической активности получаемого препарата. Известен способ получения из восковой моли экстракта, оказывающего ростстимулирующее влияние на лимфобластоидные клетки линии Raji в культуре. Согласно способу, личинок восковой моли, собранных в пчелином улье, подвергают экстракции 40%-ным этанолом при 20-25°C в темноте в течение 20 суток. Недостатком способа является невозможность получения значительных количеств препарата ввиду экономической нецелесообразности разведения личинок восковой моли в пчелином улье, что приводит к ослаблению и гибели пчелиной семьи. Кроме того, способ не обеспечивает получения воспроизводимого по биологической активности продукта вследствие неконтролируемости условий выращивания личинок и поглощаемого ими корма. Другие способы получения биологически активных препаратов из личинок восковой моли из литературы не известны. Цель настоящего изобретения повышение выхода и стабилизации биологической активности продукта, а также обладающего адаптогенным, кардиозащитным действием. Для этого способ, включающий экстрагирование личинок восковой моли, предусматривает выращивание личинок вне улья, а в качестве корма использование темной восковой суши, содержащей продукты многолетней жизнедеятельности пчелиной семьи. Изобретение основывается на впервые обнаруженных и изученных биологических свойствах темной восковой суши, которая является продуктом многолетней активности пчелиной семьи. Темная восковая сушь образуется из пчелиных сот после выращивания в последних нескольких поколений расплода пчел в течение 3-4 лет. По химическому составу она существенно отличается от пчелиных сот, светлой восковой сушки и очищенного воска, традиционно используемых для выращивания восковой моли. Темная восковая сушь содержит меньшее по сравнению со светлой сушью количество воска (40-55% вместо 70% при влажности 2,2-3,8% вместо 01,-0,5%). Установлено, что, помимо воска, она содержит продукты жизнедеятельности пчел (остатки маточного молочка, личиночные оболочки, покровы пчелиного расплода, углеводы, пептиды, азотсодержащие вещества, серотонин подобные соединения), а также флавоноиды и ароматические кислоты растительного происхождения. Присутствие этих компонентов делает темную восковую сушь полноценной питательной средой для личинок восковой моли и позволяет обходиться без использования цветочной пыльцы, меда и других дорогостоящих пищевых добавок. Установлено также, что темная восковая сушь, не обладающая сама по себе существенной биологической активностью, подвергается метаболической трансформации личинками восковой моли и превращается в биологически активный продукт, обладающий широким спектром действия. Продукт, полученный предлагаемым способом, содержит несколько биологически активных компонентов. Его химический состав отличается от состава экстракта, получаемого аналогичным способом из личинок восковой моли, выращенных на искусственном корме, а также от состава экстракта темной восковой сушки. Исследования, проведенные на различных биологических моделях, показали, что экстракт личинок восковой моли, полученный предлагаемым способом, обладает широким спектром биологической активности, адаптогенным, ростстимулирующим и кардиозащитным действием, а также стимулирует окислительный метаболизм сердечной и сосудистой тканей. Вместе с тем экстракт, получаемый из личинок восковой моли, выращенных на искусственном корме, а также экстракт темной восковой сушки не проявляют биологической активности. В отличие от известного препарата липаз из личинок восковой моли (аналог) продукт, получаемый предлагаемым способом не обладает антимикробным действием по отношению к *Mycobacterium tuberculosis* и другим микроорганизмам. Ниже приведен конкретный пример осуществления предлагаемого способа. Биологический материал для разведения восковой моли (кладки яиц, личинки, коконы, бабочки) собирали на пасеках в летний период. Определение насекомого проводили по справочнику болезней и вредителей пчел. В дальнейшем постоянное культивирование восковой моли проводили в лабораторно-производственных условиях. Для выращивания личинок восковой моли использовали контейнер размером 30x30x40 см, снабженный крышкой и вентиляционной щелью, затянутой мелкоячеистой металлической сеткой с размером отверстий менее 1 мм. В контейнер помещали 500 г темной восковой сушки (темно-бурого и черного цвета, непросвечивающей в доньшках, содержащей 40-55% воска при влажности 2,2-3,8%) и кладку яиц восковой моли (около 500 яиц). Выращивание личинок проводили при 20-25°C и относительной влажности 80% в течение 35 суток. Для экстракции биологически активных веществ отбирали личинок, достигших последней стадии развития перед окукливанием, массой 150 мг и более. Отобранных личинок (100 г) помещали в широкогорлый сосуд, удаляли паутину и остатки восковой сушки. Затем личинок переносили в экстракционный сосуд объемом 600 мл с

притертой стеклянной пробкой и добавляли 450 мл 40%-ного этилового спирта-ректификата. Экстракцию проводили при 20-25°C в темноте при периодическом перемешивании в течение 21 суток до полной экстракции продукта. Затем экстракт фильтровали через бумажный фильтр. Получили 420 мл экстракта. Полученный продукт представляет собой прозрачную жидкость красновато-желтого цвета, содержащую около 1% сухого вещества и обладающую характерной флуоресценцией (440 нм при длине волны возбуждающего света 350 нм). Экстракт хранили в темноте при 4°C, при этом биологическая активность сохранялась в течение года. Исследование химического состава полученного продукта. Химический состав полученного продукта исследовали различными биохимическими методами с использованием тонкослойной хроматографии, газовой хроматографии, диск-электрофореза, аминокислотного и элементного анализа, ЯМР, УФ- и люминесцентной спектроскопии. Фракционирование продукта проводили на колонке с сефадексом LH-20 (фиг.1). В составе продукта обнаружены следующие компоненты:

белки и пептиды (2% сухого вещества), в том числе кислые пептиды, содержащие связанный ароматический компонент, а также щелочная сериновая протеаза (фракция 1);

свободные аминокислоты (50-60% сухого вещества), (фракции 2-5, табл.1);

низкомолекулярный ростстимулирующий фактор (фракция 3);

низкомолекулярные ароматические соединения (фракция 7);

липиды, в том числе жирные кислоты (табл.2);

углеводы. Одновременно тем же способом готовили экстракт личинок, выращенных на среде, разработанной Марстоном с соавторами и модифицированной Ю.И.Кузнецовой. Среда содержала следующие компоненты (г/кг): отруби 100, мука пшеничная 110, мука кукурузная 140, дрожжи 130, молоко сухое 130, глицерин 210, мед 100, воск 80. Получили продукт, представляющий собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета, содержащую около 1% сухого вещества и не обладающую флуоресценцией. Химический состав экстракта исследовали теми же методами. Фракционирование экстракта проводили на колонке с сефадексом LH-20 (фиг.2). В экстракте личинок восковой моли, выращенных на искусственном корме, обнаружены:

небольшие количества белка (фракция 1);

свободные аминокислоты глицин, аланин, серин, треонин, глутамат, аспартат, валин, гистидин, пролин и др. (фракции 2-5);

липиды;

углеводы. Готовили также экстракт темной восковой суши. Темную восковую сушь (100 г) измельчали, помещали в экстракционный сосуд и добавляли 450 мл 40%-ного этилового спирта-ректификата. Экстракцию проводили в тех же условиях в течение 21 суток, затем экстракт фильтровали через бумажный фильтр. Получили продукт, представляющий собой темно-коричневую прозрачную жидкость, содержащую 2,5% сухого вещества и обладающую характерной флуоресценцией (440-460 нм при длине волны возбуждающего света 350 нм). Химический состав экстракта исследовали теми же методами. Фракционирование экстракта проводили на колонке с сефадексом LH-20 (фиг.3). В экстракте темной восковой суши обнаружены:

ароматические кислоты;

флавоноиды;

углеводы;

липиды. Из фиг. 1-3 видно, что хроматографические профили элюции экстрактов личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши и искусственной питательной среде, а также экстракта темной восковой суши, были различны. Различия наблюдались как в составе, так и в относительном содержании хроматографических фракций. Результаты проведенных анализов свидетельствуют о различии химического состава исследуемых образцов.

Биологически активный продукт из личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши, содержит активные компоненты, отсутствующие в экстракте личинок восковой моли, выращенных на искусственном корме и экстракте темной восковой суши:

кислые пептиды, содержащие связанный ароматический компонент (фракция 1);

низкомолекулярный ростстимулирующий фактор (фракция 3);

низкомолекулярные ароматические соединения (фракция 7). Определение биологической активности

1. Исследование адаптогенных свойств. Для определения адаптогенных свойств экстрактов использовали тест на предельную продолжительность плавания. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Две группы животных получали экстракт личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши и искусственной питательной среде, подкожно в дозе 0,2 мл/200 г массы тела ежедневно в течение 30 дней. Две другие группы животных получали экстракт личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши, перорально в дозе 0,1 мл/200 г массы тела ежедневно в течение того же периода времени. Контрольные животные получали эквивалентное количество 40%-ного этанола. На 1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 сутки определяли продолжительность предельного плавания крыс с грузом 20 г. Полученные результаты представлены в табл.3 и 4. Из данных таблиц видно, что экстракт личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши, обладает выраженным адаптогенным действием, значительно удлиняя время предельного плавания крыс, как при подкожном, так и при пероральном введении. Экстракт личинок восковой моли, выращенных на искусственной питательной среде, а также экстракт темной восковой суши не проявляли выраженных аптогенных свойств. **2. Влияние на окислительный метаболизм тканей.** Исследование биологической активности экстракта проводили на 24 белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г. Две группы животных получали экстракт личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши, перорально в течение 30 дней в дозах 0,01 и 0,1 мл/день/200 г массы тела. Контрольная группа крыс получала эквивалентное количество 40%-ного этанола. Через два часа после последнего введения экстракта определяли основные показатели окислительного обмена тканей

животных содержание лактата, пирувата и отношение НАД/НАД⁺Н (коэффициент восстановленности пиридиновых нуклеотидов). Полученные результаты представлены в табл. 5. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что введение животным экстракта вызывает значительное повышение содержания пирувата в тканях сердца, аорты и печени при одновременном снижении уровня метаболита в крови. Содержание лактата несколько

уменьшалось (сердце, аорта) или оставалось близким к контролю. Отношение НАД/НАД⁺Н изменялось в сторону повышения окисленности-аэробизации. Полученные результаты указывают на выраженное усиление окислительного обмена и энергетических процессов в сердечной и сосудистой ткани под действием экстракта личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши. **3. Исследование кардиопротекторных свойств.** Исследование биологической активности экстракта проводили на 34 лягушках весом 30 г. Две группы животных получали экстракт личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши, перорально в дозе 0,05 мл/30 г массы тела в течение 7 и 14 дней. Контрольные животные получали эквивалентное количество 40%-ного этанола. Через два часа после последнего введения экстракта определяли устойчивость сердечной мышцы лягушек к строфантину по стандартной методике. Полученные результаты представлены в табл.6. Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что экстракт личинок восковой моли, выращенных на темной восковой суши, обладает кардиозащитным действием, повышая устойчивость сердечной мышцы лягушки к токсическому действию строфантина. Таким образом, приведенные примеры показывают, что предлагаемый способ позволяет получать биологически активный продукт из личинок восковой моли с использованием в качестве исходного субстрата малоактивных продуктов пчелиной семьи. Получаемый продукт обладает широким спектром биостимулирующего действия. Предлагаемый способ в сравнении с известными имеет следующие преимущества: простота выращивания восковой моли в лабораторно-производственных условиях и ее высокая плодовитость обеспечивают возможность получения биологически активного продукта в промышленных масштабах; способность восковой моли к круглогодичному размножению обеспечивает возможность получения биологически активного продукта вне зависимости от времени года;

использование стандартного питательного сырья для выращивания личинок (темно-бурая и черная непросвечивающая в доньшках восковая сушь 3-го сорта) в контролируемых лабораторно-производственных условиях позволяет получать стандартизованный продукт. Благодаря дешевизне используемого питательного субстрата, относящегося к восковому сырью низшей категории, достигается невысокая стоимость производства продукта (около 25 руб./л). Сырьевые потребности крупномасштабного производства продукта могут быть удовлетворены существующими объемами производства низкосортного воскового сырья. Для производства продукта не требуется разработки специального оборудования. Формула изобретения

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПРОДУКТА ИЗ ЛИЧИНОК БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ путем экстракции личинок моли *Galleria mellonella* L 40%-ным этиловым спиртом при 20-25°C в темноте, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода и стабилизации биологической активности продукта, обладающего также адаптогенным и кардиопротекторным действием, в качестве сырья для получения продукта используют личинки, выращенные вне улья за счет кормления темной восковой сушью при 20-25°C, при этом целевой продукт содержит свободные аминокислоты 50-60% моносахариды и дисахариды 2-4,7% нуклеотиды и нуклеозиды 1,5% высокомолекулярные соединения 1-2% жирные кислоты 0,1% минеральные вещества 7,1-9%