

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la obținerea biomasei de larve de *Galleria mellonella* cu activitate cheratolică, antioxidantă și antiinflamatoare înaltă, care poate fi utilizată în calitate de materie primă pentru fabricarea preparatelor farmaceutice și cosmetice.

Este cunoscut un procedeu de obținere a biomasei de larve de *Galleria mellonella*, care include creșterea larvelor de vârstă 1-2 pe mediu nutritiv, ce conține făină de grâu (110 g), drojzii de panificație (100 g), lapte praf (70 g), ceară (50 g), glicerol (80 g), tărâțe de grâu (350 g), miere de albine (50 g) și apă (160 g); iar a larvelor de vârstă 3-4 - pe mediu ce conține tărâțe de grâu (350 g), făină de grâu (110 g), drojzii de panificație (100 g), lapte praf (70 g), ceară (50 g), glicerol (80 g), apă (210 g) [1]. Larvele obținute sunt destinate utilizării în calitate de gazdă pentru diferiți patogeni în cadrul cercetărilor științifice.

Dezavantajul acestui procedeu constă în utilizarea unui mediu nutritiv sărac pentru larvele de vârstă a 3-4-a, care nu poate asigura o valoare biologică înaltă a biomasei.

Este cunoscut un procedeu de obținere a biomasei de larve de *Galleria mellonella*, care include incubarea larvelor de ultima vârstă ori a pupelor în containere la întuneric timp de 1-3 săptămâni pentru obținerea unui număr maximal de ouă, transferarea ouălor (de două ori pe săptămână) în containere cu hrană și menținerea lor timp de 20 de zile pentru obținerea larvelor. Mediul nutritiv utilizat pentru hrănirea larvelor are următoarea componență: făină de porumb 250g, extract de drojzii 150g, făină de soia 100g, lapte praf 100g, miere de albine 200g, glicerol 200g, blocuri de ceară de albine. Larvele obținute sunt caracterizate prin rezistență înaltă față de infecțiile cu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* și *Candida albicans* și sunt utilizate în calitate de gazde în studiul entomopatogenilor [2].

Dezavantajul procedurii constă în faptul că larvele obținute se deosebesc esențial după dimensiuni (de la 1 la 2 cm) și calitatea biomasei din cauza vârstei diferite, ceea ce este inacceptabil în cazul utilizării biomasei în calitate de materie primă pentru obținerea substanțelor cosmetice ori farmaceutice.

Mai este cunoscut procedeu de obținere a larvelor de *Galleria mellonella* care constă în aceea că ouăle de insecte sunt plasate în cutii de plastic cu mediu nutritiv, unde se dezvoltă timp de 51 de zile. Mediul nutritiv utilizat are următoarea componență: 118 g făină de grâu, 206 g tărâțe de grâu, 118 g lapte praf, 88 g drojdie de bere, 24 g pulbere de ceară, 175 ml miere și 175 ml glicerol. Larvele obținute sunt utilizate în calitate de gazdă pentru obținerea nematodelor entomofage [3].

Dezavantajul acestui procedeu constă în durata de 51 de zile a procesului de creștere, ceea ce duce la o scumpire semnificativă a tehnologiei de creștere a insectelor.

Cea mai apropiată soluție de obiectul revendicat este procedeu de obținere a biomasei de larve de *Galleria mellonella* [4] în scopul utilizării acesteia în calitate de materie primă pentru producerea preparatelor cosmetice și farmaceutice cu efect cheratolic. Acest procedeu include trei etape succesive: 1. Pregătirea condițiilor pentru realizarea ciclului vital în crescătorie. Crescătorie de insecte prezintă încăperi cu suprafața de 20m². Pereții sunt vopsiți cu o rășină specială care oferă posibilitatea dezinfectării cu soluții dezinfectante. În încăperile în care se efectuează incubarea ouălor se menține temperatura de 26±2°C și umiditate de 70%. Încăperile în care are loc creșterea larvelor sunt echipate cu camere obscure cu sisteme automate de menținere a temperaturii și umidității. În aceste camere se menține temperatura de 30-31°C și umiditatea de 80%; 2. Creșterea insectelor. Imediat după ecloziunea larvelor din ou, larvele se transferă din încăperile de incubare în cele destinate creșterii larvelor. Larvele se introduc în camerele obscure în care se mențin condițiile necesare, iar insectelor li se asigură hrana necesară – mediu nutritiv cu următoarea componență: extract din porumb galben 174,0- 206,0g, extract din porumb roșu 183,0-214,0g, glucoză 70,0-85,0g, fructoză 65,0- 81,0g, sucroză 4,0- 4,8g, maltoză 4,0-5,0g, cazeină 117,0-148,0g, retiol (vitamina A) 2500 -3000 UI, tocoferol acetat (vitamina E) 40-58 UI, vitamina C 0,05-0,06 g, riboflavina (vitamina B2) 0, 0014-0,0017g, pantotenat de calciu (vitamina B5) 0,005-0,01g, tiamină (vitamina B1) 0,002-0,003g, piridoxină 0,003-0,004g, biotină 0,00002-0,00003g, niacină (vitamina B3) 0,0002-0,0003g, pinobanksin 0,015-0,020g, pinocembrin 0,010- 0,015g, glicerol 120,0-139,0g, NaNO₃ 0,8-1,1g, KH₂PO₄ 1,7-2,0g, NaCl 1,5-2,0g, CaCl₂ 0,4-0,5g, MgSO₄*7H₂O 0,05-0,1g, ZnSO₄*7H₂O 0,005-0,01g, MnSO₄*5H₂O 0,007-0,015g, CuSO₄*5H₂O 0,007-0,008g, FeCl₃*6H₂O 0,0100- 0,0175g, EDTA 0,0060-0,0075g, ceară galbenă 250-350g, apă purificată - până la echilibrarea a 1000g. 3. Colectarea larvelor. Larvele se separă la intrarea lor în cea de-a VII-a vârstă, imediat după năpârlire. Această biomasă este utilizată pentru obținerea unui complex activ cu acțiune cheratolică.

Dezavantajul acestui procedeu constă în aplicarea unui mediu nutritiv foarte complex, alcătuit din peste 30 de componente, iar biomasa de larve este colectată imediat după năpârlire, perioadă, când cantitatea de enzime cu efect cheratolic scade ca rezultat al utilizării lor în procesul de eliminare a scheletului extern vechi.

De asemenea, un dezavantaj al tuturor procedurilor descrise mai sus constă în faptul că întreaga perioadă de dezvoltare a etapei de larvă a insectei *Galleria mellonella*, care include de la 3 la 10 năpârliri, are loc în aceleași vase (containere) în care au fost introduse ouăle, ori larvele de prima și a doua vârstă. Aceasta duce la acumularea produselor activității vitale a insectelor și la scăderea productivității de biomasă a larvelor.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui procedeu nou, eficient de obținere a biomasei de larve de *Galleria mellonella*, care să asigure o activitate biologică înaltă a acestei biomase.

Esența invenției constă în aceea că se propune un procedeu de obținere a biomasei de larve de *Galleria mellonella* cu activitate biologică înaltă, care constă în plasarea pupelor în recipiente cu mediu nutritiv, menținerea lor la temperatura de 27°C și umiditatea de 75% până la eclozarea larvelor de prima vârstă, transferul larvelor după 6 ore

de la eclozare în alte recipiente cu mediu nutritiv, cultivarea lor la temperatura de 27°C și umiditatea de 75% timp de 19...21 zile cu transferul larvelor de cel puțin 2 ori pe mediu nutritiv proaspăt și colectarea larvelor, totodată mediul nutritiv are următoarea componență, g/kg:

Făină de grâu	185 - 200
Fină de porumb	180 – 190
Tărâțe de grâu	110 – 130
Extract de drojdie	15 - 20
Lapte praf	120 - 140
Miere de albine	75 - 95
Glicerol	80 - 90
Pulbere de ceară	40 - 55
Pinobanksin	0,02 - 0,03
Pinocembrin	0,02 – 0,03
Apă purificată	restul.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cantității și activității biologice a biomasei de larve obținute.

Astfel, procedeul de obținere a biomasei de larve de *Galleria mellonella* include un mediu mai simplu și mai puțin costisitor, care asigură obținerea unei cantități mai mari de biomasă (149,7±2,9 mg biomasă la 1g mediu utilizat față de 113,6± 6,2, în cazul prototipului) cu o activitate biologică mai înaltă.

Rezultatul tehnic al invenției se datorează faptului că pe durata dezvoltării larvelor de *Galleria mellonella* se fac cel puțin două transferuri de larve pe mediu proaspăt, ceea ce previne efectul de inhibiție provocat de acumularea produselor activității vitale în recipientele de creștere a insectelor.

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

Obținerea biomasei de larve de *Galleria mellonella* cu activitate cheratolitică

Pupele se scot din frigider, unde se păstrează la temperatura de 3-5°C și se lasă la temperatura camerei timp de 2 ore. După acest interval de timp pupele sunt transferate în recipiente acoperite cu capac găurit, care conțin o cantitate mică de mediu nutritiv (1/10 din volumul recipientului) pentru dezvoltarea ulterioară a pupelor, trecerea lor în faza de imago și depunerea ouălor. Pentru a iniția eclozarea larvelor din ou recipientele sunt menținute la temperatura de 27°C și umiditatea relativă de 75%, în condiții de întuneric. După 48 de ore de la plasarea pupelor în recipiente apar larvele de prima vârstă. Procesul se monitorizează pentru a oferi un randament de 80% ieșire, dar nu mai mult de 6 ore.

Mediul nutritiv utilizat are următoarea componență, g/kg:

Făină de grâu	185
Fină de porumb	180
Tărâțe de grâu	110
Extract de drojdie	15
Lapte praf	120
Miere de albine	75
Glicerol	80
Pulbere de ceară	40
Pinobanksin	0,02
Pinocembrin	0,02
Apă purificată	restul.

Se prepară containere noi cu mediu nutritiv. După 6 ore de la începutul eclozării larvele de prima generație sunt scoase cu ajutorul pensetei din recipientele în care au apărut și se plasează în recipientele pregătite.

Creșterea larvelor durează 20 de zile de la data primului transfer. Temperatura în containere se menține 27°C și umiditatea relativă de 75% în condiții de întuneric.

Pe durata acestor zile se efectuează două transferuri de larve în recipient cu mediu nutritiv proaspăt la cea de-a 7-a zi și la cea de-a 14-a zi.

Pentru obținerea biomasei de larve cu activitate cheratolitică înaltă colectarea larvelor se face la cea de-a 19 zi de cultivare, până a începe procesul de năpârlire a larvelor de vârsta a VI-a. Larvele sunt spălate de 2 ori cu patru volume de soluție fiziologică și clătite de două ori cu 4 volume de apă purificată.

Biomasa obținută este supusă testelor calitative și cantitative.

Activitatea cheratolitică a fost determinată în baza unui test spectrofotometric cu utilizarea cheratin-azurului (keratin azure) (Cai C., Chen J., Qi J., Yin Y., Zheng X. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 2008, 9(9), p. 713–720), care se realizează în modul următor: 5 mg pulbere de cheratin-azur se suspendează în 1 ml tampon Tris-HCl de 50 mM (pH 8,0). Amestecul de reacție conține 1 ml de suspensie de cheratin-azure și 1 ml extract cu activitate cheratolitică. Reacțiile se efectuează la 50°C într-o baie de apă cu agitare constantă de 200 r/min timp de 30 min. După incubare, reacția se întrerupe prin adăugarea a 2 ml de acid trichloroacetic de 0,4 M urmată de centrifugare la 3000g timp de 20 min. Absorbanta supernatantului se măsoară la 595 nm. Controlul se prepară la fel, iar extractul se înlocuiește cu keratinază.

Activitatea cheratolică exprimată în unități de activitate per mg substanță (UN/mg) prezintă cantitatea de enzimă care determină creșterea absorbției cu 0,01 între probă și martor la 595 nm în condițiile date.

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1

Parametrul monitorizat	Conform celei mai apropiate soluții	Conform procedurii propusă în invenție
Costul unui kg de mediu nutritiv	100%	25%
Cantitatea de biomasă larvală (mg) la 1g de mediu	113,6±6,2	149,7±2,9
Activitatea cheratolică, UN/mg substanță uscată	1,96 ±0,05	4,05±0,04

Datele din Tabelul 1 demonstrează că utilizarea unui mediu simplificat duce la ieftinirea considerabilă a costului de producere a larvelor (cheltuielile pentru mediul nutritiv în soluția propusă constituie 25% din costul mediului în prototip), iar cantitatea de biomasă obținută la utilizarea unui gram de mediu crește cu 31,8%, comparativ cu prototipul. De asemenea crește și activitatea cheratolică a biomasei de două ori.

Exemplul 2

Obținerea biomasei de larve de *Galleria mellonella* cu activitate antioxidantă înaltă

Pupele se scot din frigider, unde se păstrează la temperatura de 3-5°C, și se lasă la temperatura camerei timp de 2 ore. După acest interval de timp pupele sunt transferate în recipiente acoperite cu capac găurit, care conțin o cantitate mică de mediu nutritiv (1/10 din volumul recipientului) pentru dezvoltarea ulterioară a pupelor, trecerea lor în faza de imago și depunerea ouălor. Pentru a iniția eclozarea larvelor din ou recipientele sunt menținute la temperatura de 27°C și umiditatea relativă de 75%, în condiții de întuneric. După 48 de ore de la plasarea pupelor în recipiente apar larvele de prima vârstă. Procesul se monitorizează pentru a oferi un randament de 80% ieșire, dar nu mai mult de 6 ore.

Mediul nutritiv utilizat are următoarea componență, g/kg:

Făină de grâu	200
Fină de porumb	190
Tărâțe de grâu	130
Extract de drojdie	20
Lapte praf	140
Miere de albine	95
Glicerol	90
Pulbere de ceară	55
Pinobanksin	0,03
Pinocembrin	0,03
Apă purificată	restul.

Se prepară containere noi cu mediu nutritiv. După 6 ore de la începutul eclozării larvele de prima generație sunt scoase cu ajutorul pensetei din recipientele în care au apărut și se plasează în recipientele pregătite.

Creșterea larvelor durează 20 de zile de la data primului transfer. Temperatura în containere se menține 27°C și umiditatea relativă de 75% în condiții de întuneric.

Pe durata acestor zile se efectuează două transferuri de larve în recipient cu mediu nutritiv proaspăt la cea de a 7-a zi și la cea de-a 14-a zi.

Pentru obținerea biomasei de larve cu activitate antioxidantă înaltă colectarea larvelor se face la cea de-a 20 zi de cultivare. Larvele sunt spălate de 2 ori cu patru volume de soluție fiziologică și de două ori cu 4 volume de apă purificată.

Biomasa obținută este supusă testelor calitative și cantitative.

Activitatea antioxidantă se determină prin metoda de determinare a capacității antioxidante cu aplicarea radicalului cation ABTS^{•+} (2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolină-6-acidului sulfonic) (Re R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: Free Radical Biology & Medicine. 1999, vol.10, p. 1231-1237). În calitate de echivalent pentru calculul cantitativ în această metodă se utilizează troloxul. Rezultatele testului se exprimă în unități TEAC (trolox equivalent antioxidant activity).

Oxidarea ABTS în scopul formării radicalului cation ABTS se realizează cu utilizarea persulfatului de potasiu. Pentru aceasta se prepară soluția stoc a reagentului ABTS de 7 mM în apă deionizată, la care se adaugă persulfatul de potasiu în concentrația de 2,45 mM în raport de 1:1. Reacția de formare a radicalului ABTS decurge la întuneric, la temperatura camerei timp de cel puțin 12-16 ore. Soluția de lucru se prepară din soluția stoc de ABTS, care se dizolvă în etanol sau apă distilată până la stabilizarea valorii absorbantei la $0,700 \pm 0,020$ unități la lungimea de undă de 734 nm.

Amestecul reactant constă din 0,3 ml extract antioxidant și 2,7 ml soluție ABTS. Reacția de reducere decurge la temperatura camerei timp de 6 min, după care se măsoară absorbanta la lungimea de undă de 734 nm.

Valoarea indicelui TEAC este exprimată în mg trolox la g de substanță (biomasă), și se calculează în baza curbei de calibrare executată în aceleași condiții experimentale.

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 2.

Tabelul 2

Parametrul monitorizat	Conform celei mai apropiate soluții	Conform procedurii propus în invenție
Costul unui kg de mediu nutritiv	100%	25%
Cantitatea de biomasă larvală (mg) la 1g de mediu	118,4	156,1
Activitatea antioxidantă Echivalent mg trolox /g biomasa	28,4±0,2	36,8±0,6

Datele din Tabelul 2 demonstrează că cantitatea de biomasă obținută la utilizarea unui gram de mediu crește cu 31,7%, comparativ cu prototipul. De asemenea crește și activitatea antioxidantă a biomasei de 1,3 ori.

Exemplul 3

Obținerea biomasei de larve de *Galleria mellonella* cu activitate antiinflamatoare

Pupele se scot din frigider, unde se păstrează la temperatura de 3-5°C, și se lasă la temperatura camerei timp de 2 ore. După acest interval de timp pupele sunt transferate în recipiente acoperite cu capac găurit, care conțin o cantitate mică de mediu (1/10 din volumul recipientului) nutritiv pentru dezvoltarea ulterioară a pupelor, trecerea lor în faza de imago și depunerea ouălor. Pentru a iniția eclozarea larvelor din ou recipientele sunt menținute la temperatura de 27°C și umiditatea relativă de 75%, în condiții de întuneric. După 48 de ore de la plasarea pupelor în recipiente apar larvele de prima vârstă. Procesul se monitorizează pentru a oferi un randament de 80% ieșire, dar nu mai mult de 6 ore.

Mediul nutritiv utilizat are următoarea componență, g/kg:

Făină de grâu	190
Fină de porumb	180
Tărâțe de grâu	125
Extract de drojdie	18
Lapte praf	130
Miere de albine	90
Glicerol	90
Pulbere de ceară	55
Pinobanksin	0,03
Pinocembrin	0,03
Apă purificată	restul.

Se prepară containere noi cu mediu nutritiv. După 6 ore de la începutul eclozării larvele de prima generație sunt scoase cu ajutorul pensetei din recipientele în care au apărut și se plasează în recipientele pregătite.

Creșterea larvelor durează 20 de zile de la data primului transfer. Temperatura în containere se menține 27°C și umiditatea relativă de 75% în condiții de întuneric.

Pe durata acestor zile se efectuează două transferuri de larve în recipient cu mediu nutritiv proaspăt la cea de a 7-a zi și la cea de-a 14-a zi.

Pentru obținerea biomasei de larve cu activitate antiinflamatoare înaltă colectarea larvelor se face la cea de-a 21 zi de cultivare. Larvele sunt spălate de 2 ori cu patru volume de soluție fiziologică și de doua ori cu 4 volume de apă purificată.

Biomasa obținută este supusă testelor calitative și cantitative.

Scăderea nivelului de eliberare a interleucinei 8 (IL₈) se testează *in vitro* pe cultură de fibroblaști normali umani. Inducerea eliberării factorilor proinflamatori se realizează cu aplicarea acidului benzoic în prezența produsului testat. În calitate de control a fost utilizată cultura tratată cu acid benzoic în prezența soluției fiziologice. Nivelul de IL₈ a fost determinat cu aplicarea metodei imunofermenative ELISA (kitul pentru determinarea IL₈, Thermo Fisher).

Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 3.

Tabelul 3

Parametrul monitorizat	Conform celei mai apropiate soluții	Conform procedurii propus în invenție
Costul unui kg de mediu nutritiv	100%	25%
Cantitatea de biomasă larvală la 1g de mediu	121,3±2,7	160,0±0,8
Scăderea cantității de IL ₈ eliberată (% la martor)	28,5±0,7	37,1±0,2

Datele din Tabelul 3 demonstrează că cantitatea de biomasă obținută la utilizarea unui gram de mediu crește cu 31,9% comparativ cu prototipul. De asemenea a fost înregistrat un nivel mai înalt al activității antiinflamatoare, exprimat prin scăderea nivelului factorului proinflamator – interleucinei 8 (o scădere cu 37,1% în soluția propusă față de o scădere de 28,5% în cazul celei mai apropiate soluții).