

УДК 577.0

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА ЛИЧИНОК *Hermetia illucens*

© 2021 г. Н. А. Ушакова*, @, А. Е. Донцов**, М. В. Марсова***, ****, А. И. Бастратов*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН,
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

**Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, ул. Косыгина, 4, Москва, 119334 Россия

***Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119991 Россия

****Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Институтский пер., 9, г. Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

@E-mail: naushakova@gmail.com

Поступила в редакцию 20.08.2020 г.

После доработки 25.08.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Из биомассы личинок *Hermetia illucens* получен водный экстракт с применением электроимпульсного плазменно-динамического метода. Отмечено, что экстракт обладает высокой эффективностью тушения хемилюминесценции люминола в присутствии гемоглобина и пероксида водорода. В экстракте обнаружен черный пигмент меланин с антиоксидантной активностью (концентрация парамагнитных центров 8.3×10^{16} спин/г сухого вещества). Антирадикальные свойства экстракта подтвердились на модели оксидативного стресса нематоды *Caenorhabditis elegans* в присутствии 40 мМ параквата: введение экстракта увеличило на 25% медианную продолжительность жизни нематоды. Выявленный антиоксидантный эффект связан с присутствием в экстракте комплекса антиоксидантов и, возможно, антиоксидантных ферментов, разрушающих гидропероксиды.

DOI: 10.31857/S0002332921020132

В последнее время большое внимание исследователей привлекают насекомые, перспективные для разработки новых антибиотиков, иммуноактивных пептидов, субстанций для фармацевтического применения (Chernysh et al., 2002; Dossey et al., 2016). Промышленно выращивается муха черная львинка *Hermetia illucens*, личинки которой успешно используются для получения белковой биомассы кормового и пищевого назначения (Müller et al., 2017; Wang, Shelomi, 2017). Однако личинки черной львинки представляют интерес и как возобновляемый, но малоизученный источник биологически активных веществ.

Для максимального извлечения из биомассы насекомых полезных компонентов важно применение эффективных экстракционных процессов. Метод электроимпульсный плазменно-динамический экстракции (ЭИПДЭ) разнообразных веществ из растительного и животного сырья (Молчанов, 1981) позволяет получить с высоким выходом целевые продукты (Чуешов, 2002). Наиболее часто подобной обработке подвергаются растительные материалы (Казуб и др., 2018). Процессы, проис-

ходящие вследствие воздействия ударных волн от импульсных электрических разрядов на животные ткани, изучены в меньшей степени. Известно, что при пропускании электрического разряда большой мощности в экстрагируемой смеси возникают ударные волны, создающие высокое импульсивное давление и мощные кавитационные процессы. Обработка тканей электровзрывным способом приводит к разрушающему действию электрического тока на белково-липидные мембраны клеток, что увеличивает их проницаемость и повышает выход клеточных компонентов в экстракт (Перцев, Зупанец, 1999). Применение метода ЭИПДЭ для экстракции из насекомых в литературе не отмечено.

Цель работы – оценить биологическую активность водного экстракта личинок черной львинки *H. illucens*, полученного методом ЭИПДЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена с соблюдением этических норм проведения научных экспериментов с животными (Приказ Минздрава СССР № 755 от

12.08. 1977 г. “О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных”). Личинки были выращены в ИПЭЭ РАН на комбикорме для бройлеров (ПК-6) в контролируемых условиях (Некрасов и др., 2019). Насекомые (сырая масса 5 кг) были обездвижены замораживанием при -18°C в течение 15 мин и гомогенизированы с добавлением воды до конечной влажности суспензии 80%. ЭИПДЭ осуществляли на установке ООО КоролевФарм (Нужненко, 2011). Параметры экстрагирования: мощность пропускаемого электрического разряда 38000 В, частота импульсов 1 имп./с, расстояние между электродами 5 мм, время экстрагирования 7 мин. После воздействия экстракт отделяли от твердой фракции центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин. Антибактериальную обработку осуществляли мембранной фильтрацией с использованием насадок для фильтрации Millex-GV 0.22 мкм.

Для изучения антиоксидантных свойств экстракта анализировали сам экстракт личинок *H. illucens* (BL) и препарат меланина (FML), который выделили из аликвоты экстракта BL осаждением концентрированной соляной кислотой до pH 2.0, дважды промывали дистиллированной водой и высушили. Препарат FML растворяли в 0.1 М К-фосфатном буфере в исходной концентрации 4.5 мг/мл. Для флуоресцентных и спектральных измерений использовали этот препарат, разведенный в 5 раз, для измерения тушения хемилюминесценции брали различные количества исходного препарата. Для измерения спектров электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) использовали сухой препарат FML. Экстракт BL для флуоресцентных и спектральных измерений разводили в 5 раз. Для измерения антиоксидантной активности (АОА) использовали 10–100 мкл исходного экстракта. АОА препаратов определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемилюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола (Ushakova *et al.*, 2018). В качестве измеряемых параметров были использованы амплитуда люминесценции и латентный период развития максимальной интенсивности свечения. Кинетику хемилюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм и комнатной температуре. Среда инкубации содержала 0.05 М К-фосфатный буфер, pH 7.4, 2 мкМ гемоглобин, 100 мкМ люминол, 100 мкМ ЭДТА и различные количества препаратов FML и BL. Для оценки степени АОА препарата BL сравнивали его активность с активностью известного водо-

растворимого антиоксиданта аскорбата в идентичных условиях измерения. АОА экстракта была выражена как молярная концентрация аскорбата, вызывающая такой же ингибирующий эффект, как и препарат BL, содержащий 1 мг/мл сухого вещества.

Регистрацию спектра ЭПР образца FML проводили при -196°C на радиоспектрометре ЭПР Bruker EMX (Германия). Условия записи спектров ЭПР: ΔH -развертка – 50 Гс; H-центр – 3476 Гс; амплитуда модуляции – 3 Гс, постоянная времени – 100 мс, мощность СВЧ – 20 мкВт. Эталон для определения концентрации спинов – УДА № 5, сертификат о калибровке № 905/910–2012.

Исследование антиоксидантного действия экстракта личинок *H. illucens* проводилось также на модели индуцированного паракватом оксидативного стресса у свободноживущей почвенной нематоды *Caenorhabditis elegans* штамм Bristol N2 (дикий тип) (Wang *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2018). Синхронизированные стерильные яйца *C. elegans* переносили на бактериальный газон из штамма *Escherichia coli* op50 и инкубировали в течение 3 сут при 20°C . Полученные таким образом личинки стадии L4 были перенесены в буферный раствор. В каждую лунку 96-луночной планшеты вносили 6–12 нематод (общее число нематод на точку 35–60), аликвоту исследуемого водного экстракта в концентрации 4% конечного объема реакционной смеси и водный раствор индуктора оксидативного стресса – параквата в концентрации 40 мМ/л. В контроль не добавляли экстракт и вместо параквата вводили воду. Наблюдения и подсчет активных нематод проводили каждые 3 ч до гибели 80% их исходного количества. Число живых и мертвых нематод подсчитывали, исходя из их активности при воздействии света и прикосновении щупа. После статистической обработки строили график и вычисляли медианную продолжительность жизни (МПЖ) нематод. МПЖ нематод экспериментальной группы сравнивалась с МПЖ нематод контрольной группы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракт личинок черной львинки *H. illucens*, полученный электровзрывным способом (BL), и препарат меланина FML, выделенный из экстракта BL, проявили выраженную антирадикальную активность. На рис. 1 показана сравнительная кинетика тушения хемилюминесценции люминола препаратами FML и BL, а на рис. 2 – зависимость латентного периода развития хемилюминесценции в присутствии различных концентраций пре-

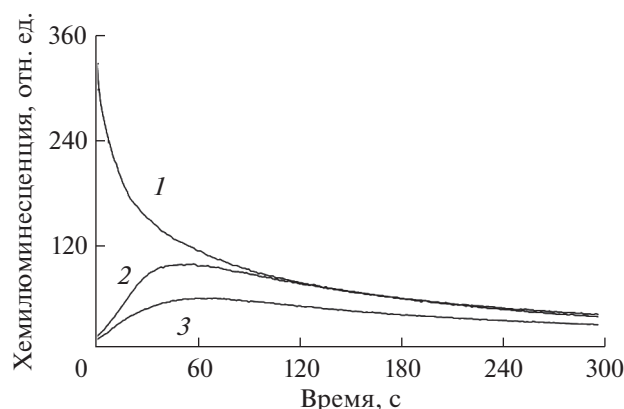


Рис. 1. Сравнительные кинетики тушения хемилюминесценции люминола меланином, выделенным из экстракта, и экстрактом личинок *Hermetia illucens*. 1 — исходная кинетика угасания хемилюминесценции люминола (без добавок), 2 — то же при добавлении 200 мкл раствора FML с содержанием меланина 4.5 мг/мл; 3 — то же при добавлении 20 мкл экстракта BL.

паратов. По характеру кинетических кривых механизмы тушения хемилюминесценции этими препаратами сходны.

Экстракт BL содержал меланин в относительно невысокой концентрации с АОА, присущей меланинам львинки (Ushakova *et al.*, 2017). Однако сам экстракт BL обладал явной АОА, величина которой соответствовала 35 нмоль/мл аскорбиновой кислоты.

ЭПР-спектральные характеристики препарата FML, подтверждающие его меланиновую природу, приведены в табл. 1. Концентрация парамагнитных центров в препарате FML (8.3×10^{16} спин/г) и g-фактор коррелировали с аналогичными показателями, полученными нами ранее для меланина из личинок *H. illucens* (Ushakova *et al.*, 2017).

Для подтверждения антиоксидантных свойств экстракта BL были проведены опыты на нематоде *C. elegans* в условиях оксидативного стресса, индуцированного паракватом в концентрации 40 мМ. Изменения МПЖ нематод в присутствии экстракта личинок львинки *H. illucens* по сравнению с контрольной группой (H_2O) в обычных условиях (без параквата) показали некоторую токсичность полученного экстракта (рис. 3а). МПЖ нематод в присутствии экстракта составила 22 ч, в то время как в контроле с водой — 27.5 ч. Однако изменения МПЖ нематод в присутствии экстракта (рис. 3б) в условиях оксидативного стресса с 40 мМ параквата продемонстрировали антиоксидантный эффект. Экстракт снял негативное влияние оксиданта и увеличил МПЖ нематод на 25%.

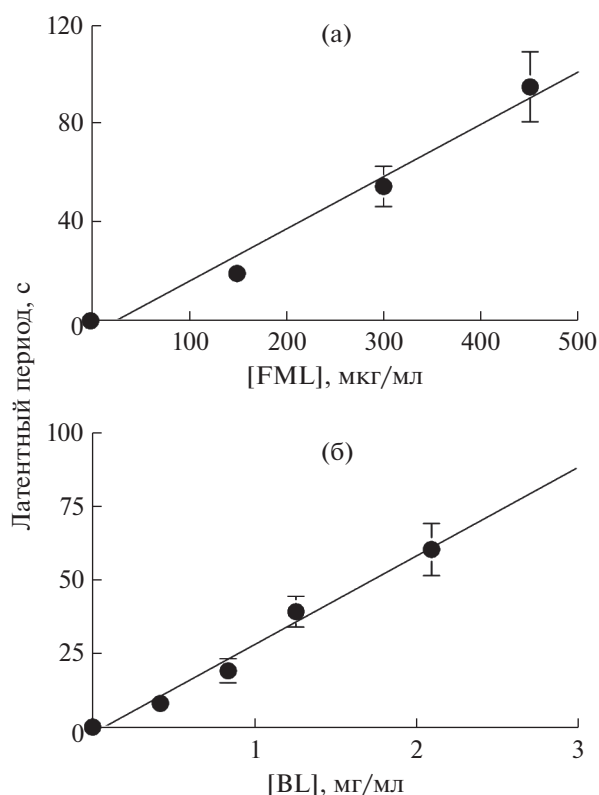


Рис. 2. Зависимость латентного периода возгорания хемилюминесценции люминола от концентрации препарата FML (а) и экстракта BL (б).

Использование метода ЭИПДЭ позволило получить водный экстракт личинок черной львинки *H. illucens* с выраженной АОА, которая связана с присутствием антиоксидантов, и в том числе меланина. Кроме того, результаты предварительных экспериментов свидетельствуют о содержании в экстракте антиоксидантных ферментов, участвующих в детоксикации гидропероксидов.

Таблица 1. ЭПР-спектральные характеристики меланина из экстракта личинок *Hermetia illucens* в сравнении с ДОФА-меланином

Параметр	FML	ДОФА-меланин
g-factor	2.0042	2.0036
ΔH_{pp}	6.7	4.8
Масса, мг	4.2	1.4
Концентрация, спин/г	8.3×10^{16}	39.7×10^{17}

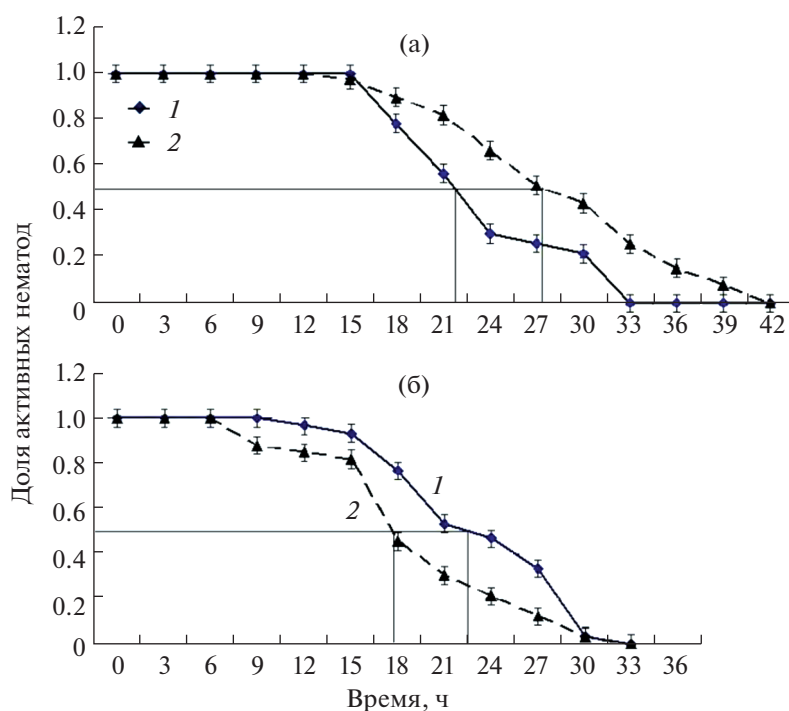


Рис. 3. Изменение количества активных нематод *Caenorhabditis elegans* со временем без параквата (а) и в условиях оксидативного стресса с 40 мМ параквата (б). 1 – в присутствии экстракта личинок *Hermetia illucens*, 2 – контроль с водой.

Поиск новых антиоксидантных веществ ведется постоянно при большом разнообразии имеющихся препаратов. Это связано с особенностями современной жизни. Загазованный воздух городов, солнечная радиация, стрессы, вредная еда, чрезмерный прием лекарственных препаратов, вредные привычки, НЕV-излучение от гаджетов и мониторов – это комплекс факторов, провоцирующих образование свободных радикалов в организме. Антиоксиданты замедляют их разрушительное действие, укрепляют иммунную защиту и важны для поддержания здоровья. Выявленные антиоксидантные свойства полученного экстракта личинок *H. illucens* свидетельствуют о перспективности экстракта для практического использования.

Авторы выражают благодарность Генеральному директору ООО КоролевФарм Н.С. Нужненко, директору по производству ООО КоролевФарм Ю.М. Светушкиной за получение экстракта методом ЭИПДЭ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки, проект № 075-11-2019-070, и в рамках Госзадания по теме № 0109-2019-0008.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Казуб В.Т., Кошкарлова А.Г., Рудобахта С.П. Особенности кинетики процесса экстрагирования под воздействием импульсного поля высокой напряженности // Вестн. Тамбов. гос. техн. ун-та. 2018. Т. 24. № 1. С. 134–139.
<https://doi.org/10.17277/vestnik.2018.01>. Р.134–139.
- Молчанов Г.И. Интенсивная обработка лекарственного сырья. М.: Медицина, 1981. С. 108–122.
- Некрасов Р.В., Чабаяев М.Г., Зеленченкова А.А., Бастраков А.И., Ушакова Н.А. Питательные свойства личинок *Hermetia illucens* L. – нового кормового продукта для молодняка свиней (*Sus scrofa domestica* Erxleben) // С.-х. биология. 2019. Т. 54. № 2. С. 316–325.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.2.316rus>
- Нужненко Н.С. Установка электроимпульсного экстрагирования. Патент RU105290U1 2011.02.16.
- Перцев И.И., Зупанец И.А. Фармацевтические и медико-биологические аспекты лекарств. Харьков: УкрФА. 1999. Т. 2. 104 с.
- Чуешов В.И. Промышленная технология лекарств. Харьков: НФАУ МТК, 2002. Т. 2. С. 112–114.
- Chernysh S.I., Kim S.I., Bekker G., Pleskach V.A., Filatova N.A., Anikin V.B., Platonov V.G., Bulet P. Antiviral and antitumor peptides from insects // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 20. P. 12628–12632.
- Dossey A.T., Morales-Ramos J.A., Guadalupe Rojas M. Insects as sustainable food ingredients production, processing and food applications. Acad. Press. Elsevier Inc., 2016. 402 p.

- Lin Q., Long L.K., Zhuang Z.H., Wu L.L., Wu S.L., Zhang W.M. Antioxidant activity of water extract from fermented mycelia of *Cordyceps sobolifera* (Ascomycetes) in *Caenorhabditis elegans* // Int. J. Med. Mushrooms. 2018. V. 20. № 1. P. 61–70.
<https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018025324>
- Müller A., Wolf D., Gutzeit H.O. The black soldier fly, *Hermetia illucens* – a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances // Z. Naturforsch. 2017. V. 72(9) aop.
<https://doi.org/10.1515/znc-2017-0030>
- Ushakova N.A., Bastrakov A.I., Dontsov A.E., Sakina N.L., Karagodin V.P. Preparation and characterization of *Alphitobius diaperinus* melanin // Appl. Biochem. Microbiol. 2018. V. 54. Iss. 4. P. 425–431.
<https://doi.org/10.1134/S0003683818040142>
- Ushakova N.A., Dontsov A.E., Sakina N.L., Brodsky E.S., Ratnikova I.A., Gavrilova N.N., Bastrakov A.I., Kozlova A.A., Nekrasov R.V. Melanin properties at the different stages of the life cycle of the fly *Hermetia illucens* // Ukr. Journ. Ecol. 2017. V. 7. № 4. P. 424–431.
https://doi.org/10.15421/2017_137
- Wang Q., Huang Y., Qin C., Liang M., Mao X., Li S., Zou Y., Jia W., Li H., Ma C., Huang Z. Bioactive peptides from *Angelica sinensis* protein hydrolyzate delay senescence in *Caenorhabditis elegans* through antioxidant activities // Hindawi Publ. Corp. Oxid. Med. Cell Longev. 2016. Article ID 8956981.
<https://doi.org/10.1155/2016/8956981>
- Wang Y.-S., Shelomi M. Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food // Foods. 2017. V. 6. № 91.
<https://doi.org/10.3390/foods6100091>

Antioxidant Properties of Larvae *Hermetia illucens* Extract

N. A. Ushakova^{1, #}, A. E. Dontsov², M. V. Marsova^{3, 4}, and A. I. Bastrakov¹

¹Severtsov Institute of Ecology and Evolution RAS, Leninsky prosp. 33, Moscow, 119071 Russia

²Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

³Vavilov Institute of General Genetics RAS, ul. Gubkina 3, Moscow, 119991 Russia

⁴Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
 Institutskiy lane 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia

[#]e-mail: naushakova@gmail.com

An aqueous extract was obtained from the biomass of *Hermetia illucens* larvae using an electro-pulse plasma-dynamic method. The extract was highly effective in quenching the chemiluminescence of luminol in the presence of hemoglobin and hydrogen peroxide. It contained the black pigment melanin with a concentration of paramagnetic centers of 8.3×10^{16} spin/g of dry matter and antioxidant activity. The antiradical properties of the extract were confirmed on the model of oxidative stress of the nematode *Caenorhabditis elegans* in the presence of 40 mmol of paraquat: the introduction of the extract increased the median lifespan of the nematode by 25%. The identified antioxidant effect is associated with the presence of a complex of antioxidants in the extract and, possibly, antioxidant enzymes that destroy hydroperoxides.