

# УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

## НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

**Предмет:** Образложење теме докторске дисертације кандидата Ратка П. Павловића, мастер биохемичара, пријављене под насловом:

Испитивање утицаја различитих супституената полена у исхрани медоносне пчеле (*Apis mellifera* L.) на профил дигестивних ензима, варење, дужину живота и масу радилица

Научна област: Хемијске науке

Ужа научна област: Биохемија

### 1. Предмет научног истраживања

Предмет ове дисертације биће анализа и поређење профила дигестивних ензима (пептидаза и гликозидаза) у дигестивном тракту пчела (*Apis mellifera* L.), праћење процеса варења мерењем масе средњег и задњег црева, као и промене количине дигестивних ензима у току времена и поређење просечне дужине живота и масе радилица у зависности од врсте и састава хране, а у циљу унапређења контролисане исхране пчела.

У првом делу дисертације поредиће се утицај два најчешће коришћена супституента за нектар, сахарозног и инвертног сирупа (еквимоларне смеше глукозе и фруктозе), на лучење гликозидаза, морталитет пчела и привлачност сирупа. Оба сирупа пчелари често користе да би пчеле стимулисали да произведу већу количину легла, убрзали развој пчелиње заједнице или допунили резерве хране.

Течном хроматографијом високих перформанси (HPLC) ће се анализирати састав „меда“ које ће пчеле ускладиштити у саћу у кавезима, а који су пчеле направиле само од сахарозног или инвертног сирупа. Затим ће се из овог „меда“ гел-филтрацијом уклонити шећер да би се одредила активност гликозидаза.

Карактеризација присутних гликозидаза ће обухватити испитивање супстратне специфичности ензима као и квалитативну и квантитативну анализу производа хидролизе, која ће омогућити јасну и недвосмислену идентификацију ензима.

Испитивањем присуства гликозидаза, у ускладишћеном „меду“, које хидролизују сахарозу ће се доћи до одговора на питање да ли исхрана пчела сахарозним или инвертним сирупима има економску и биохемијску оправданост, тј. да ли пчеле конзумирањем ових различитих сирупа луче више или мање гликозидаза.

У другом делу дисертације ће се испитивати утицај различитих компоненти хране које ће пчеле конзумирати у облику *погаче* (смеша конзистенције теста, која садржи шећер у праху, инвертни сируп и различите суплементе и супституенте). Користиће се четири врсте погача: прва у чијем саставу је само сахароза и инвертни сируп (негативна контрола), друга од сахарозе и инвертног сирупа са поленом (позитивна контрола, природна исхрана), трећа од сахарозе, инвертног сирупа и инактивираног квасца (супституент за полен) и четврта од сахарозе, инвертног сирупа и млевених сувих ларви

великог брашнара (*Tenebrio molitor* L.). Млевене ларве брашнара ће се први пут испитивати као нови супституент за полен. Наша претпоставка је да би оваква храна била боља за нутритивне потребе пчела од других комерцијалних супституената за полен.

Експеримент храњења описаним погачама ће се радити у контролисаним експерименталним условима (термостатирани кавези у инкубатору). Током трајања експеримента пратиће се потрошња хране, морталитет, маса пчела (одвојено глава, торакс и абдомен), масе делова дигестивног тракта и сл. Као посебан важан параметар за оцену искористљивости хранљивих супстанци из погача испитаће се утицај ове хране на промену профила дигестивних ензима (протеаза и гликозидаза) у дигестивном тракту пчела радилица. Поређења ће омогућити да се открије супституент са карактеристикама које су најсличније полену.

## 2. Основне хипотезе

Опрашивање инсектима је глобална есенцијална екосистемска услуга, од изузетног значаја за светску пољопривреду и производњу хране, а медоносна пчела је најважнији узгајани опрашивач. Она је угрожена недостатком пчелиње паше, болестима, пестицидима, климатским променама и неодговарајућим поступцима пчелара. Пчелари и научници се слажу да је сиромашна исхрана главни узрок пропадања пчелињих заједница, што показује важност квалитетне исхране која подржава развој здравих пчелињих заједница (1). У пределима и у време када природних извора хране нема, суплементи или супституенти у исхрани се често користе да би се омогућило пчелињим заједницама да опстану и ојачају. Сахарозни сируп је најчешће коришћен супституент за угљене хидрате из нектара и меда, а у пчеларској пракси даје добре резултате. Инвертни шећер, иако скупљи, се такође користи у ову сврху, али још увек није доказано да ли има додатну вредност као супституент у односу на сахарозни сируп.

Супституенти за протеине и липиде из полена су базирани на квасцу, соји, млеку и многим другим састојцима који нису одговарајући за дигестивни систем пчела, па оптимални супституент још увек није пронађен (2). Квасац (*Saccharomyces cerevisiae*) је један од најчешће коришћених супституената за полен, који је у односу на друге, до сада коришћене, показао најбоље, али не довољно добре резултате. Иако се инсекти због високе хранљиве вредности и мањег негативног утицаја на животну средину све више користе за исхрану различитих организама (риба, живине, па чак и људи), до сада није било покушаја да се користе за исхрану пчела. Ларве великог брашнара су изабране због своје доказане високе хранљиве вредности, зато што се користе за људску и животињску исхрану и због могућности једноставног гајења у великим количинама (3). Када нема довољно полена у природи, пчеле једу своје ларве које су сличног састава као и ларве других инсеката, а из својих ларви ефикасно апсорбују неопходне хранљиве супстанце (4), па би искорак у потрази за погодним супституентом за полен у исхрани пчела, могао бити базиран на употреби узгајаних ларви инсеката. Суви полен садржи 10–40% протеина и 1–13% липида (5), а осушене ларве брашнара садрже око 51% сирових протеина и 33% липида (6). Ово показује да је концентрација протеина и липида у сушеним ларвама

брашнара много већа него у полену и да се лако може смањити на жељени ниво мешањем са шећерном погачом.

Развој новог супституента за полен би био веома важан за пчеларство и пољопривреду, јер би омогућио пчеларима да хране пчеле квалитетнијом храном што би позитивно утицало на здравље и опстанак пчелињих заједница. Већи број пчелињих заједница би боље опрашивао усеве што би омогућило производњу веће количине хране. Тестирање различитих врста хране за пчеле захтева доста времена и средстава. Због тога је потребно пронаћи пут како да се на брз начин утврди утицај хране на пчеле и скрати време које је потребно потрошити током истраживања у пољу, где пчеле слободно излећу из кошница. Пчеле тада неминовно доносе различит полен и нектар, чија се количина и састав између суседних кошница разликује што веома отежава добијање и интерпретацију резултата и поскупљује процес одабира нових супституената у њиховој исхрани (7). На тај начин би уместо да се на терену тестира велики број различитих супституената, то било могуће брже и лакше урадити у лабораторијским условима. А само они који ће се показати најбоље, би се тестирали даље у теренским условима.

Дигестивни систем инсеката је грађен од предњег, средњег и задњег црева. Средње црево је место варења (дигестије) и апсорпције хранљивих супстанци. Дигестивни ензими и исхрана пчела су добро истражени, али су подаци о утицају састава хране на лучење дигестивних ензима оскудни (8). Скроб и протеини се налазе у полену, а хидролизују их амилазе и пептидазе. Кућне пчеле имају већу протеолитичку активност у средњем цреву него пчеле излетнице и примарно се хране поленом који је богат протеинима да би произвеле млеч за исхрану ларви, матице, излетница и трутова. Ниво протеолитичке активности је директно повезан са количином унетих протеина. Пчеле излетнице се хране медом и нектаром, имају смањену способност да разграђују протеине и имају мање протеаза у цревима (9).

Амилазе су неопходне да би разградиле скроб пореклом од биљака до глукозе. Амилазе из подждрелне (хипофарингеалне) жлезде пчела и из меда су веома сличне. Скроб је присутан у полену, док га је у перги (пчелињи хлеб, ферментисани полен) много мање. Перга садржи више редукујућих шећера, а мање скроба што је последица активности амилазних ензима присутних у пљувачки пчеле. Пчеле излетнице не само да сакупљају храну, коју предају млађим пчелама у кошници, него и разграђују скроб у лету при повратку у кошницу што им обезбеђује енергију потребну за дужи лет (10). У многобројним истраживањима је доказано да је за сада полен најбоља храна за пчеле (2).

У овој дисертацији желимо да проширимо знања о утицају хране на профиле главних група хидролитичких ензима присутних у дигестивном тракту пчела. Хипотеза постављена у овој дисертацији је да ће различити супституенти за полен повећати или смањити концентрацију ензима и променити профил дигестивних ензима пчела. Супституенти који ће дати ензимске профиле (по концентрацији и врсти) налик онима које у исхрани пчела даје полен, имаће вишу хранљиву вредност за пчеле. На основу тога ће се ти супституенти у исхрани пчела карактерисати као погодни или не.

### 3. Циљ истраживања и очекивани резултати

Циљ предложене докторске дисертације је да се анализирају промене количина и профила протеаза и гликозидаза у средњем цреву пчела, а затим да се упореде са оним које се лучше када се пчеле хране својом природном (оптималном) храном. Из података о промени масе и дужине живота можемо да утврдимо која храна више одговара пчелама током целе године, а из промене масе црева која храна је погоднија у току зиме када су пчеле спречене да излећу.

Сходно томе дефинисани су следећи циљеви:

- Анализа утицаја различите хране на пчеле кроз праћење масе пчела, потрошње хране и морталитета.
- Анализа протеаза и глукозидаза у дигестивном тракту и поређење њихових вредности и профила изоформи у зависности од хране коју су конзумирале. На основу резултата, а у складу са постављеном хипотезом дисертације испитивани супституенти ће бити окарактерисани као погодни или непогодни за исхрану пчела.
- Посебно ће се анализирати нови супституент у исхрани пчела - осушене ларве великог брашнара и окарактерисати као погодне или не за исхрану пчела.
- Анализа и биохемијска карактеризација глукозидаза присутних код пчела у зависности од врсте шећерног сирупа који конзумирају (сахарозни или инвертни сируп).
- Анализа „меда“ које ће пчеле прикупити и прерадити, а које ће бити узет из саћа у кавезу у инкубатору.
- Унапређење пчелиње хране и проширивање знања о биохемији и физиологији исхране пчела.

Најважнији очекивани резултат је одабир боље алтернативе за исхрану пчела у неповољним временским и пашним условима од до сада доступних. Утврђивање како различита исхрана супституентима полена утиче на присуство различитих дигестивних ензима и поређење са ензимима код пчела храњених поленом. Ово би омогућило да се уради брза анализа великог броја различитих комбинација хране. Оне које покажу најбоље резултате, тј. оне које би имале ензимске профиле сличне пчелама храњеним поленом би требале да се даље тестирају на пчелињацима (у реалним условима) како би се потврдила ефикасност. Истовремено реализација задатих циљева ће допринети проширивању знања о дигестивним ензимима пчела. Ова теза ће допринети унапређењу пчеларства у Србији и свету, као важне пољопривредне гране, применом резултата који ће пружити нови правац у исхрани медоносних пчела.

### 4. Методе истраживања

У овом раду биће коришћене основне технике и методе биологије, ензимологије, експерименталне биохемије као и статистичке и аналитичке методе.

- Припрема различитих врста пчелиње хране и исхрана пчела исте старости погачама које садрже различите супституенте полена и различитим сирупима, у инкубатору у

контролисаним условима, а затим дисекција и одвајање различитих делова тела и хомогенизација.

- За припрему хране базиране на ларвама великог брашнара (*T. molitor*) ларве ће се одгајивати у контролисаним условима.
- За поређење утицаја хране на промену масе пчела радилица, потрошњу хране, дужину живота и сл. ће се користити кавезни експерименти, при чему ће се пчеле држати у инкубатору у контролисаним условима (температура, влага, доступност воде). Због тога што се код радилица мењају ензимски профили са старошћу у експериментима ће се користити пчеле исте старости. Да би се избегао утицај природно доступне хране, која није тачно дефинисаног састава, пчеле ће се гајити у кавезима без могућности излета. Ово су уједно услови који су слични природним условима презимљавања пчела у нашем географском подручју. Током кавезних експеримената ће се пратити потрошња хране и морталитет пчела у свакој групи.
- Поставиће се више експеримената са више врста хране. Храна ће се давати у облику сирупа ради супституције угљених хидрата из нектара или у облику погаче ради супституције протеина и липида из полена. За исхрану се користе и обogaћене погаче које се дају пчелама када нема довољно уноса полена из природе, а потребно је да пчеле одгаје легло, производе матице или повећају количину масног ткива ради успешног презимљавања.
- Пчеле исте старости ће се жртвовати и дисектовати у одређеним временским интервалима током живота. Узимаће се исти број пчела (по петнаест) и користиће се за анализу присутних дигестивних ензима, а претходно ће се мерити маса пчела без дигестивног тракта као и маса дисекованих црева. Црева пчела ће се одвајати на средње и задње црево како би се профил дигестивних ензима испитивао у средњем цреву које је најважније за дигестију и апсорпцију храњивих супстанци. Маса задњег црева ће служити као показатељ усвојивости хране и погодности одређене хране за зимовање пчела када се несварени делови хране накупљају у задњем цреву.
- За биохемијску карактеризацију ензима користиће се спектрофотомеријски есеји за одређивање ензимских активности. Испитивани ензими ће се посебно окарактерисати на нивоу супстратне специфичности где ће се користити везани ензимски тестови.
- Ензими ће бити окарактерисани и анализирани и зимограмском детекцијом у полиакриламидном и/или агарозном гелу након електорофоретског раздвајања (нативног или ренатурационог). Користиће се методе електрофоретског раздвајања у нативним условима – вертикална електрофореза у полиакриламидном гелу (PAGE) и изоелектрично фокусирање (IEF). На нивоу одређивања супстратне специфичности појединачних ензимских изоформи користиће се симултане зимограмске технике за одређене групе ензима.
- Укупни протеински профили дигестивног тракта пчела и ускладиштеног „меда“ из кавеза ће бити анализирани квалитативно методом електорофоретске сепарације у денатуришућим условима (SDS PAGE) и квантитативно спектрофотометријском методом за одређивање укупних протеина по Брадфорду.
- За детекцију производа ензимских реакција (шећерне компоненте након гликозидазних активности) и анализу састава ускладиштеног „меда“ из кавеза ће се

користити методе танкослојне хроматографије (TLC) и методе течне хроматографије високих перформанси (HPLC) купловане са диференцијалним рефрактометром као детектором (RID).

- Сви резултати ће бити анализирани одговарајућим методама статистичке анализе (нпр. ANOVA) коришћењем програма „GraphPadPrizm 8“. Сви експерименти ће бити постављени у пентапликату (пет кавеза из којих ће се при сваком узорковању узимати по петнаест пчела) у складу са захтевима статистичке обраде резултата.

## 5. Литература

1. vanEngelsdorp, D., Hayes, J., Underwood, R. M., Caron, D., & Pettis, J. (2011). A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. *Journal of Apicultural Research*, 50(1), 1–10. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.01>
2. Wright, G. A., Nicolson, S. W., & Shafir, S. (2018). Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annual Review of Entomology*, 63, 327–344. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043423>
3. Pippinato, L., Gasco, L., Di Vita, G., Mancuso, T. (2020). Current scenario in the European edible-insect industry: a preliminary study. *Journal of Insects as Food and Feed* 6, 371–381. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0008>
4. Webster, T. C., Peng, Y.-S., & Duffey, S. S. (1987). Conservation of nutrients in larval tissue by cannibalizing honey bees. *Physiological Entomology*, 12(2), 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1987.tb00745.x>
5. Campos, M.G.R., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L.B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154–161. <https://doi.org/10.1080/00218839.2008.11101443>
6. Zhao, X., Vazquez-Gutierrez, J. L., Johansson, D. P., Landberg, R., & Langton, M. (2016). Yellow mealworm protein for food purposes – Extraction and functional properties. *PLOS One*, 11(2), e0147791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147791>
7. Huang, S.K., Csaki, T., Doublet, V., Dussaubat, C., Evans, J.D., Gajda, A.M., Gregorc, A., Hamilton, M.C., Kamler, M., Lecocq, A., Muz, M.N., Neumann, P., Özkirim, A., Schiesser, A., Sohr, A.R., Tanner, G., Tozkar, C.Ö., Williams, G.R., Wu, L., Zheng, H., Chen, Y.P. (2014). Evaluation of Cage Designs and Feeding Regimes for Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Laboratory Experiments. *Journal of Economic Entomology* 107, 54–62. <https://doi.org/10.1603/EC13213>
8. Li, C., Xu, B., Wang, Y., Feng, Q., Yang, W. (2012). Effects of dietary crude protein levels on development, antioxidant status, and total midgut protease activity of honey bee (*Apis mellifera ligustica*). *Apidologie* 43, 576–586. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0126-0>
9. Crailsheim, K., Schneider, L.H.W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., Schöffmann, B. (1992). Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* 38, 409–419. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(92\)90117-V](https://doi.org/10.1016/0022-1910(92)90117-V)
10. Hrassnigg, N., Brodschneider, R., Fleischmann, P.H., Crailsheim, K. (2005). Unlike nectar foragers, honeybee drones (*Apis mellifera*) are not able to utilize starch as fuel for flight. *Apidologie* 36, 547–557. <https://doi.org/10.1051/apido:2005042>