

**Univerzitet u Beogradu**

**Hemijski fakultet**

**mr Biljana Dojnov**

**Amilaze srednjeg creva larvi  
bukove strižibube (*Morimus funereus*) i  
velike hrastove strižibube (*Cerambyx cerdo*)**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2011.**

**MENTOR:**

dr Zoran Vujčić, vanredni profesor  
Hemijski fakultet, Beograd

**ČLANOVI KOMISIJE:**

dr Dušan Sladić, redovni profesor  
Hemijski fakultet, Beograd

dr Jelisaveta Ivanović, naučni savetnik u penziji  
Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“, Beograd

dr Vera Nenadović, naučni savetnik  
Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“, Beograd

dr Nataša Božić, naučni saradnik  
IHTM – Centar za hemiju, Beograd

**DATUM ODBRANE:**

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za Biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Centru za hemiju, Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom vanrednog profesora dr Zorana Vujčića.*

*Mentoru dr Zoranu Vujčiću se zahvaljujem na svesrdnoj pomoći u svakom trenutku planiranja eksperimenata, realizaciji, tumačenju rezultata i uobličavanju ovog rada. Dugujem mu zahvalnost za razumevanje, za sve što me je naučio i što mi je omogućio da se radujem eksperimentima.*

*Dr Nataši Božić se zahvaljujem za sugestije i nesebičnu pomoć tokom izrade ovog rada od prvih eksperimenata do pisanja.*

*Dr Jelisaveti Ivanović, začetniku ove naučne oblasti kod nas, i dr Veri Nenadović sam veoma zahvalna što su me uvele u oblast fiziologije insekata, kao i na nesebičnoj pomoći pri tumačenju rezultata i sugestijama prilikom pisanja disertacije.*

*Dr Dušanu Sladiću želim da zahvalim na korisnim sugestijama tokom pisanja disertacije.*

*Zahvaljujem se Dejanu Stojanoviću iz Nacionalnog parka Fruška gora za nesebičnu pomoć pri sakupljanju uzoraka.*

*Zahvaljujem se dragim kolegama dr Miroslavi Vujčić, Nikoli Lončaru, Marici Grujić i Ratku Pavloviću, a posebno Aleksandri Milovanović na pomoći, druženju i podršci u najtežim trenucima. Takođe se zahvaljujem i ostalim kolegama iz Centra za hemiju IHTM-a i Hemijskog fakulteta.*

*Svojoj porodici, supruzi i deci dugujem zahvalnost za stprljenje, pomoć i razumevanje.*

Amilaze srednjeg creva larvi bukove strižibube (*Morimus funereus*) i velike hrastove strižibube (*Cerambyx cerdo*)

IZVOD

U ovom radu su ispitivani: gajenje larvi i dobijanje reproduktivno sposobnih jedinki bukove strižibube (*Morimus funereus*) u laboratorijskim uslovima; analiziranje amilazne aktivnosti i izoamilaznih profila larvi bukove i velike hrastove strižibube (*Cerambyx cerdo*) u zavisnosti od hranjivih supstrata i uslova sredine; prečišćavanje i biohemijska karakterizacija glavne izoforme amilaze larve bukove strižibube i prečišćavanje glavne izoforme amilaze larvi velike hrastove strižibube.

Opisano je larveno razviće bukove strižibube u laboratorijskim uslovima od jaja do reproduktivno sposobnih jedinki kroz dve generacije. Pokazano je da se gajenjem larvi u laboratorijskim uslovima i stalnoj dostupnosti hrane skraćuje larveno razviće, i da se u drugoj generaciji uočava veća ujednačenost larvi po svim parametrima kojima se opisuje larveno razviće.

Nađeno je da postoje razlike u amilaznoj aktivnosti i izoamilaznim profilima kod larvi bukove i velike hrastove strižibube u zavisnosti od hranjivog supstrata i uslova sredine gde se razvijaju, čime je potvrđena njihova polifagnost i velika adaptabilnost.

Glavna  $\alpha$ -amilazna izoforma larve bukove strižibube je prečišćena do homogenosti 112 puta sa prinosom od 15% i biohemijski je okarakterisana. Određena joj je molekulska masa 33 kDa, pI vrednost – 3,2, pH optimum – 5,2 i temperaturni optimum – 45°C. Aktivnost  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube zavisi od jona  $\text{Ca}^{2+}$ . Inhibiraju je inhibitori iz pšenice. Pokazuje aktivnost prema sirovom skrobu.

Glavna  $\alpha$ -amilaza larve velike hrastove strižibube je delimično prečišćena iz sirovog ekstrakta, i na izoenzimskom nivou korišćenjem dve vrste FPLC hromatografije. Molekulska masa joj je 34 kDa a pI manja od 3,5.

*Ključne reči:*  $\alpha$ -amilaza, izoforme, *Morimus funereus*, *Cerambyx cerdo*, polifagnost, Cerambycidae, zimogram

Amylases in the midgut of long – horned beetle (*Morimus funereus*) and great capricorn beetle (*Cerambyx cerdo*) larvae

ABSTRACT

This paper examined: larvae growing and getting reproductive age individuals of long – horned beetle (*Morimus funereus*) in laboratory conditions, analyzing the amylase activity and isoamylase profiles of *M. funereus* larvae and great capricorn beetle (*Cerambyx cerdo*) larvae depending on the nutrient substrate and environmental conditions, purification and biochemical characterization of the major amylase isoform of *M. funereus* larvae and purification of the major amylase isoform of *C. cerdo* larvae.

Larval develop of *M. funereus* larvae in the laboratory from eggs to reproductively capable individuals in two generations were described. It is shown that growing larvae in laboratory conditions and constant availability of food larval development was reduced, and that in the second generation higher uniformity of larvae in all of the parameters that describe the larval development was noticed.

It was found that there are differences in amylase activities and isoamylase profiles of *M. funereus* and *C. cerdo* larvae depending on the substrate and nutrient conditions in the environment where they develop, thus confirming their polyphagy and high adaptability.

The main  $\alpha$ -amylase isoform of *M. funereus* larvae was purified to homogeneity 112 times with a yield of 15% and was biochemically characterized. Its molecular weight is determined to be 33 kDa, pI value - 3.2, optimum pH - 5.2 and optimum temperature - 45 ° C.  $\alpha$ -Amylase activity of *M. funereus* larvae is depended on concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. Inhibitors from wheat inhibit the *M. funereus* amylase. Midgut amylase of *M. funereus* larvae shows activity towards raw starch.

The main  $\alpha$ -amylase of *C. cerdo* larvae was partially purified from crude extract, and the isoenzyme pattern level using two types of FPLC chromatography. Molecular mass of midgut  $\alpha$ -amylase of *C. cerdo* larvae was 34 kDa and pI was less than 3.5.

Key words:  $\alpha$ -amylase, isoforms, *Morimus funereus*, *Cerambyx cerdo*, polyphagy, Cerambycidae, zymogram

---

### Lista skraćenica korišćenih u tekstu

---

AA	akrilamid
ACC	amilaza <i>Cerambyx cerdo</i>
AMF	amilaza <i>Morimus funereus</i>
ANOVA	<i>eng</i> analysis of variance assay
APS	amonijum – persulfat
BFP	bromfenol plavo
BSA	govedi serum-albumin
CBB	comassie brilliant blue
DNS	dinitro – salicilna kiselina
EF	elektroforeza
FPLC	<i>eng</i> fast protein liquid chromatography
I L	prva generacija larvi gajenih u laboratoriji
IEF	izoelektrično fokusiranje
II L	druga generacija larvi gajenih u laboratoriji
LL	laboratorijske larve – larve koje su gajene u laboratoriji
ML	martovske larve – larve sakupljene iz prirode tokom marta
MM	molekulska masa
PAGE	poliakrilamid–gel elektroforeza
PL	prirodne larve – larve sakupljene iz prirode
PM	peritrofni matriks
PUZ	pufer za obradu uzoraka
SDS	natrijum–dodecilsulfat
SDS-PAGE	natrijum–dodecilsulfat poliakrilamid-gel elektroforeza
SEM	<i>eng</i> statistic error of measurement – statistička greška merenja
SL	septembarske larve – larve sakupljene iz prirode tokom septembra
Tris	tris(hidroksimetil)–aminometan

---

## SADRŽAJ

1 UVOD	1
2 OPŠTI DEO	3
2.1 Insekti	3
2.1.2 Tvr dokrilci (Coleopterae)	3
2.1.3 Strižibube (Cerambycidae)	4
2.1.3.1 Bukova strižibuba ( <i>Morimus funereus</i> )	5
2.1.3.2 Velika hrastova strižibuba ( <i>Cerambyx cerdo</i> )	7
2.2 Gajenje insekata u laboratorijskim uslovima	11
2.3 Digestivni sistem insekata	13
2.3.1 Varenje kod insekata	16
2.3.1.1 Kompartmentalizacija varenja	16
2.3.1.2 Protok u suprotnom smeru	17
2.3.2 Digestivni enzimi insekata	18
2.3.2.1 Mehanizmi sekrecije digestivnih enzima	18
2.3.2.2 Kontrola sekrecije digestivnih enzima	20
2.3.3 Glikozidaze	20
2.3.4 Metabolizam glukoze kod insekata	21
2.4 $\alpha$ -Amilaza	23
2.4.1 Istorijski pregled	23
2.4.2 Klasifikacija enzima	24
2.4.3 Skrob	25
2.4.3.1 Nativni (sirovi) skrob	27
2.4.3.2 Skrob u drvetu	28
2.4.4 Testovi za određivanje amilazne aktivnosti	30
2.4.5 Zimogramska detekcija amilaze	31
2.5 $\alpha$ -Amilaze insekata	33
2.5.1 Osobine $\alpha$ -amilaza insekata	34
2.5.2 Inhibitori $\alpha$ -amilaza insekata	35
2.5.3 Izoforme amilaza insekata	36

3 NAŠI RADOVI	38
3.1 Gajenje strižibuba u laboratorijskim uslovima	40
3.1.1 Gajenje bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> ) u laboratorijskim uslovima	40
3.1.1.1 Larveno razviće bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> ) u laboratorijskim uslovima	40
3.1.2 Gajenje velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> ) u laboratorijskim uslovima	45
3.1.3 Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi bukove ( <i>M. funereus</i> ) i velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> )	46
3.1.4 Određivanje pH vrednosti i amilazne aktivnosti duž srednjeg creva larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	46
3.2 $\alpha$ -Amilaza larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	48
3.2.1 Uporedna analiza amilaza larvi bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> ) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji	48
3.2.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi i SDS PAGE	49
3.2.3 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće i produkciju amilaze larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	51
3.2.3.1 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	52
3.2.3.2 Ispitivanje uticaja saharoze na produkciju amilaznih izoformi larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	53
3.2.4 Analiza amilaze larvi bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> ) tokom larvenog razvića	55
3.3 $\alpha$ -Amilaza larve velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> )	58
3.3.1 Uporedna analiza amilaza larvi velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> ) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji	58
3.3.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi	59
3.4 Prečišćavanje i karakterizacija glavne izoforme $\alpha$ -amilaze (AMF-3) srednjeg creva larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	62
3.4.1 Gel hromatografija i rehromatografija	62
3.4.1.1 Zimogramska detekcija amilaze u frakcijama gel hromatografije	63



3.4.2 Jonoizmenjivačka hromatografija	64
3.4.1.1 Zimogramska detekcija amilaze u frakcijama jonoizmenjivačke hromatografije	65
3.4.3 Karakterizacija AMF-3	67
3.4.3.1 Određivanje molekulske mase AMF-3	67
3.4.3.2 Određivanje izoelektrične tačke AMF-3	68
3.4.3.3 pH optimum AMF-3	69
3.4.3.4 Temperaturni optimum AMF-3	70
3.4.3.5 $K_m$ i $V_{max}$ AMF-3	70
3.4.3.6 Uticaj soli na aktivnost AMF-3	71
3.4.3.7 Uticaj pšeničnih inhibitora na aktivnost AMF-3	72
3.4.3.8 Aktivnost AMF 3 prema sirovom skrobu	73
3.5 Prečišćavanje $\alpha$ -amilaze srednjeg creva larve velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> )	75
3.5.1 FPLC gel hromatografija amilaznih izoformi tri grupe larvi velike hrastove strižibube ( <i>C.cerdo</i> )	75
3.5.1.1 Određivanje molekulske mase ACC-2	77
3.5.2 Prečišćavanje ACC-2 FPLC gel hromatografijom	77
3.5.2.1 Zimogramska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa gel hromatografije	78
3.5.2.2 Renaturacioni SDS PAGE frakcija sa gel hromatografije	79
3.5.3 FPLC Jonoizmenjivačka hromatografija ACC-2	80
3.5.3.1 Zimograska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa jonoizmenjivačke hromatografije	81
3.6 Zaključci	83
4 EKSPERIMENTALNI DEO	85
4.1 Gajenje strižibuba u laboratorijskim uslovima	86
4.1.1 Gajenje bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> ) u laboratorijskim uslovima	86
4.1.1.1 Gajenje insekata	86
4.1.1.2 Gajenje larvi bukove strižibube	86
4.1.1.3 Statistička obrada rezultata	87

4.1.2 Gajenje velike hrastove strižibube ( <i>C.cerdo</i> ) u laboratorijskim uslovima	88
4.1.3 Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi bukove ( <i>M. funereus</i> ) i velike hrastove strižibube ( <i>C.cerdo</i> )	88
4.1.4 Određivanje pH vrednosti srednjeg creva bukove strižibube	89
4.1.4.1 Određivanje amilazne aktivnosti	89
4.2. $\alpha$ -Amilaza larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	91
4.2.1 Uporedna analiza amilaza larvi bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> ) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji	91
4.2.1.1 Određivanje amilazne aktivnosti	91
4.2.1.2 Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu	91
4.2.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi i SDS PAGE	93
4.2.2.1 Nativna PAGE	93
4.2.2.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF) pH opsega od 2,5 do 4,2	96
4.2.2.3 Zimogramska detekcija $\alpha$ -amilaze	98
4.2.2.4 SDS-PAGE sirovih ekstrakata srednjeg creva larvi bukove strižibube iz prirode i larvi gajenih u laboratoriji	100
4.2.3 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće i produkciju amilaze larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	102
4.2.3.1 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	102
4.2.3.2 Ispitivanje uticaja saharoze na produkciju amilaznih izoformi larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	102
4.2.4 Analiza amilaze larvi bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> ) tokom larvenog razvića	103
4.3 $\alpha$ -Amilaza larve velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> )	104
4.3.1 Uporedna analiza amilaza larvi velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> ) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji	104
4.3.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi	104
4.4 Prečišćavanje i karakterizacija glavne izoforme $\alpha$ -amilaze (AMF 3) srednjeg creva larve bukove strižibube ( <i>M. funereus</i> )	105
4.4.1 Gel hromatografija i rehromatografija	105
4.4.1.1 Zimogramska detekcija amilaze u frakcijama gel rehromatografije	105

4.4.2 Jonoizmenjivačka hromatografija	106
4.4.2.1 Zimogramska detekcija amilaze u frakcijama jonoizmenjivačke hromatografije	106
4.4.3 Karakterizacija AMF-3	107
4.4.3.1 Određivanje molekulske mase AMF-3	107
4.4.3.1.1 Određivanje molekulske mase AMF-3 gel filtracijom	107
4.4.3.1.2 Određivanje molekulske mase AMF-3 SDS PAGE-om	107
4.4.3.2 Određivanje izoelektrične tačke AMF-3	108
4.4.3.3 pH optimum AMF-3	108
4.4.3.4 Temperaturni optimum AMF-3	109
4.4.3.5 $K_m$ i $V_{max}$ AMF-3	109
4.4.3.6 Uticaj soli (NaCl i CaCl <sub>2</sub> ) na aktivnost AMF-3	110
4.4.3.7 Uticaj pšeničnog inhibitora na aktivnost AMF-3	110
4.4.3.8 Aktivnost AMF-3 prema sirovom skrobu	111
4.5 Prečišćavanje $\alpha$ -amilaze srednjeg creva larve velike hrastove strižibube ( <i>C. cerdo</i> )	112
4.5.1 FPLC gel hromatografija amilaznih izoformi tri grupe larvi velike hrastove strižibube ( <i>C.cerdo</i> )	112
4.5.1.1 Određivanje molekulske mase ACC-2	112
4.5.2 Prečišćavanje ACC-2 FPLC gel hromatografijom	112
4.5.2.1 Zimogramska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa gel hromatografije	113
4.5.2.2 Renaturacioni SDS PAGE frakcija sa gel hromatografije	113
4.5.3 FPLC Jonoizmenjivačka hromatografija ACC-2	114
4.5.3.1 Zimograska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa jonoizmenjivačke hromatografije	114
 5 LITERATURA	 116

# 1 UVOD

Insekti su najbrojnija klasa u životinjskom svetu i prilagođeni su na najveći broj hranljivih supstrata i staništa. Digestivni sistem insekata je u direktnoj vezi sa spoljašnjom sredinom. Razumevanje procesa varenja insekata još uvek nije dovoljno poznato, upravo zbog njihove velike plastičnosti i mogućnosti da se razvijaju na velikom broju različitih supstrata. Digestivni sistem insekata je dobar eksperimentalni model za proučavanje fagnosti insekata koja predstavlja značajnu adaptaciju i bazu plastičnosti insekata.

Bukova strižibuba (*Morimus funereus*) i velika hrastova strižibuba (*Cerambyx cerdo*) spadaju u polifagne insekte koji se razvijaju u stablima drveća. Obe vrste nastanjuju specifične geografske regione. Larve bukove strižibube se razvijaju na ležacima i panjevima tokom prvog stadijuma razgradnje drveta, a larve velike hrastove strižibube na mrtvom delu starog ili oštećenog drveta. Zbog malog broja jedinki koje se mogu naći u prirodi, na relativno ograničenim geografskim područjima nalaze se na listi zaštićenih vrsta, iako njihov ekonomski značaj kao štetočina nije zanemarljiv. Obe vrste se odlikuju velikom plastičnošću, koja se sa jedne strane može uzeti u obzir kao merilo štetnosti insekata, a sa druge strane se može iskoristiti za programe reintegriranja jedinki u prirodno stanište na kome je ugrožena.

Zbog svog dugog larvenog razvića larve bukove strižibube i velike hrastove strižibube su pogodne za izučavanja fizioloških i biohemijskih procesa adaptacija insekata. Larve izabranih vrsta strižibuba su usled svoje veličine pogodne za izučavanja stresa, opšteg fenomena i kod kičmenjaka i kod beskičmenjaka koji po definiciji nekih fiziologa (1) predstavlja nespecifični odgovor organizma na različite faktore. Za ova i druga ispitivanja koriste se larve gajene u laboratorijskim uslovima, kako bi se na taj način obezbedile dovoljne količine larvi potrebnih za ispitivanja digestivnih enzima i uticaja različitih faktora na metabolizam, a da se ne remeti njihov status i broj u prirodi. Gajenje reproduktivno sposobnih jedinki u laboratorijskim uslovima bi moglo da se iskoristi kao prvi korak u programu zaštite ovih retkih i zaštićenih vrsta.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da digestivni enzim amilaza ima značajnu ulogu u adaptabilnosti larvi bukove i velike hrastove strižibube na različite supstrate, na uticaj temperature i drugih stresnih faktora (2,3). Istraživanja produkcije amilaze i analiza izoamilaznih profila, kao odgovor na promene supstrata i uslova sredine bi doprinela potpunijem sagledavanju složenog sistema koji obezbeđuje plastičnost ovim vrstama insekata.  $\alpha$ -Amilaza (EC 3.2.1.1) je digestivni enzim koji hidrolizuje skrob. Nađen je kod čoveka, mikroorganizama i mnogih životinja, uključujući i insekte. Malo literaturnih podataka postoji o amilazama Coleoptera, a posebno iz familije Cerambycidae kojoj pripadaju bukova i velika hrastova strižibuba. Izolovanjem i karakterisanjem  $\alpha$ -amilaza larvi bukove i velike hrastove strižibube bi se dopunili podaci o amilazama Cerambycidae.

Radi razjašnjavanja uloge  $\alpha$ -amilaze u plastičnosti vrste, kao i doprinošenju novim saznanjima o biohemijskoj organizaciji digestivnih procesa kod insekata iz familije Cerambycidae postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Ispitivanje razvića bukove strižibube u laboratorijskim uslovima od jaja do reproduktivno sposobnih jedinki.
- Analiziranje amilazne aktivnosti i izoenzimskog profila larvi bukove i velike hrastove strižibube u zavisnosti od hranljivih supstrata i uslova sredine.
- Ispitivanje uticaja saharoze na produkciju amilaze i larveno razviće bukove strižibube.
- Izolovanje glavne izoforme amilaze larvi bukove strižibube do homogenosti i biohemijska karakterizacija izolovanog enzima.
- Izolovanje i prečišćavanje glavne izoforme amilaze larvi velike hrastove strižibube.

## 2 OPŠTI DEO

### 2.1 Insekti

Insekti zauzimaju veoma značajno mesto u životinjskom svetu uopšte. Opisano je preko milion vrsta insekata, što čini 53% ukupnog broja opisanih vrsta na Zemlji (4). Brojnost insekata je posledica njihove velike prilagodljivosti. Različite grupe insekata su specijalizovane za različite načine ishrane. U stanju su da vare truležni materijal, biljke, živo i uginulo drveće, gljive itd. Neki vodeni insekti svojom ishranom deluju kao prečistači vode. Insekti su u stanju da prežive na različitim staništima, koja mogu biti ekstremno topla ili hladna, vlažna ali i ekstremno suva, a takođe i na predelima sa nepredvidim klimatskim promenama (4). Insekti su veoma bitni u procesima kruženja materije. U biljnom svetu su prisutni kao paraziti i saprofiti, oprašuju biljke i raznose biljni materijal na nova staništa. U životinjskom svetu su prisutni kao predatori i paraziti a služe i kao hrana nekim pticama, sisarima, reptilima i ribama.

Svaka vrsta insekata je značajna karika lanca neke velike grupe organizama tako da bi gubitak jedne insekatske vrste mogao da dovede do velikih promena u usložnjavanju i rasprostranjenosti drugih vrsta. Insekti imaju značajan uticaj i na čoveka. Neki insekti izazivaju ili prenose pojedine bolesti. Drugi su štetočine za agroekonomiju. Sa druge strane postoje insekti čije proizvode čovek koristi (pčele i svilene bube), a neke vrste insekata ljudi jedu. Sve u svemu, insekti predstavljaju glavnu komponentu makroskopskog biodiverziteta, što je dovoljan razlog za njihovo ispitivanje.

#### 2.1.2 Tvrdožilci (Coleopterae)

Klasa insekata obuhvata veliki broj redova od kojih su najbrojniji redovi tvrdokrilaca (Coleoptera), muva (Diptera), osa, mrava i pčela (Hymenoptera), leptira i moljaca (Lepidoptera) i pravih buba (Hemiptera). Red tvrdokrilaca (Coleoptera) je

verovatno najbrojniji u klasi insekata. Obuhvata oko 400.000 opisanih vrsta, što je 40% od svih insekatskih vrsta. Ovaj red predstavlja ne samo najveći red u klasi insekata, već i u životinjskom svetu uopšte. Svaka četvrta životinjska vrsta na našoj planeti je tvrdokrilac (1).

Telo odraslog insekta tvrdokrilca je pokriveno kutikulom. Na telu se razlikuju tri regiona: glaveni, grudni (torakalni) i trubušni (abdomen). Na glavenom regionu su smeštene složene oči i ocele, usni aparat i antene (čulni centar). Na torakalnom regionu se sa dorzalne strane nalaze krila, a na abdominalnom tri para nogu (lokomotorni centar). Abdomen je segmentiran i na poslednjem segmentu se nalaze reproduktivni organi. Razviće Coleoptera se odvija kroz kompletnu metamorfozu koja obuhvata četiri stadijuma:

1. Stadijum jajeta – embrionalno razviće
2. Stadijum larve – postembrionalno razviće
3. Stadijum lutke
4. Stadijum adulta

Mnogi insekti kao larve se po osobinama i načinu ishrane značajno razlikuju od adulta. To im omogućava istovremeno korišćenje hranljivih resursa (larva) i naseljavanje novih staništa (adult), čime se povećava mogućnost adaptacije i samim tim evolutivni napredak i proširivanje rasprostranjenosti. Larve kroz svoje razviće prolaze kroz nekoliko stupnjeva koji su odvojeni presvlačenjem. Broj larvenih stupnjeva varira od vrste do vrste i može biti konstantan ili varijabilan. Tokom stadijuma lutke formira se reproduktivno sposoban adult – imago. Adulti imaju različit životni vek, od nekoliko nedelja do nekoliko godina, u zavisnosti od vrste.

### **2.1.3 Strižibube (Cerambycidae)**

Familija strižibuba (Cerambycidae) predstavlja brojnu familiju tvrdokrilaca. Procenjuje se da u svetu postoji do 30.000 vrsta. Najveći broj je nađen u oblasti ekvatora gde su uslovi za razvoj i razmnožavanje najpogodniji. U Evropi je opisano oko 625 vrsta, odnosno 164 roda strižibuba. Na području Srbije je utvrđeno prisustvo

242 vrste strižibuba iz 123 roda od kojih su neke prisutne isključivo na Balkanskom poluostrvu (5). Sakupljanje i proučavanje strižibuba na teritoriji Srbije potiče još od sredine devetnaestog veka 1846. godine kada je Josif Pančić sakupio prvu kolekciju Coleoptera iz okoline Beograda. Prvi rad o strižibubama Srbije je publikovan 1891. godine (6).

Veći broj strižibuba su ksilofagni insekti (hrane se drvenastim delovima biljaka) – 86 %, a manji broj se razvija na zeljastim biljkama (13%). Polovina evropskih ksilofagnih strižibuba živi na lišćarima, četvrtina na četinarima a samo oko 10% njih može da živi i na lišćarima i na četinarima (5).

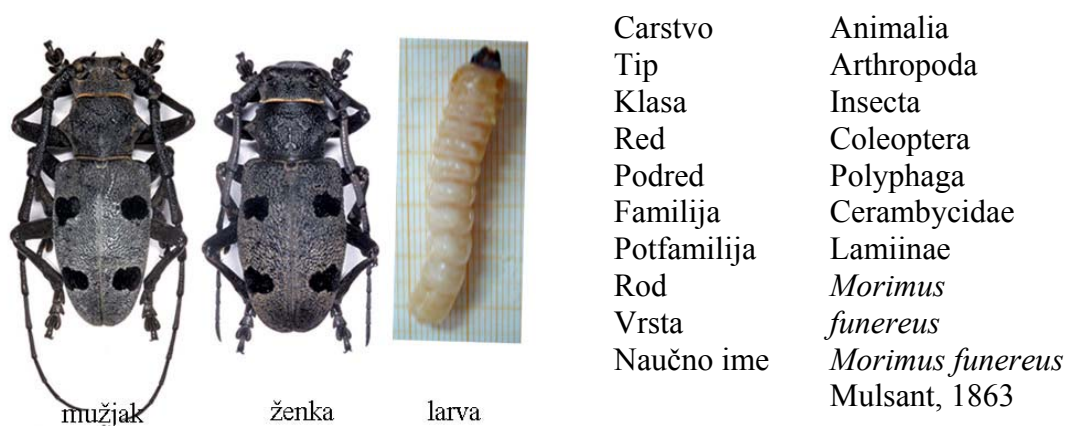
Veličina strižibuba varira od nekoliko milimetara kao kod na primer voćnih strižibuba (*Tetrops* sp.) i male evropske strižibube (*Gracilia minuta*) do oko 6 cm kod strižibube rodova *Ergates.*, *Megopsis* i *Cerambyx* (5). Najveći broj je izduženog oblika. Pretežno su tamne boje: crne, smeđe, sive i braon, ali ima i vrsta koje su obojene crveno, zeleno ili žuto, a neke imaju i metalni sjaj. Polni dimorfizam je izražen: mužjaci su manji i vitkiji i imaju duže antene. Oči su dobro razvijene i različitog su oblika i obavijaju osnovu antena koje su sastavljene od 11 ili 12 članaka i kod većine vrsta su duže od tela. Noge su im tanke i duge što omogućava brzo hodanje i trčanje (5). Većina strižibuba ima specijalni tzv. stridulacioni organ, kojim proizvode karakterističan zvuk, kao znak uznemirenosti ili bliske opasnosti. Prednji par krila strižibuba je kao i kod ostalih insekata iz reda Coleoptera modifikovan u čvrsta, sklerotizovana pokrilca (elytrae). Pokrilca štite zadnja krila kada ona nisu u upotrebi i omogućavaju naseljavanje kriptičnih staništa. Ispod pokrilaca se nalaze membranozna zadnja krila koja omogućavaju letenje (kao kod *C. cerdo*), ali su često zbog skrivenog načina života redukovana (kao kod *M. funereus*) (7). Razviće strižibuba traje od nekoliko meseci do više godina.

### **2.1.3.1 Bukova strižibuba (*Morimus funereus*)**

Bukova strižibuba (*M. funereus*) je polifagna vrsta rasprostranjena u jugoistočnoj Evropi. Rasprostranjenost ove vrste je klimatski ograničena. Može se naći na Balkanskom poluostrvu, na području Češke, Slovačke, Belgije, Nemačke i Ukrajine (8). Istraživanje brojnosti i rasprostranjenosti bukove strižibube je tek u



poslednjih nekoliko godina aktuelno, i tokom 2010. godine su objavljeni prvi rezultati istraživanja na području Italije i Slovenije (9, 10). Nastanjuje lišćarsko i četinarsko drveće. Najčešće se može naći na posećenim stablima i panjevima hrasta i obične jele, ali i na bukvi i smrči. Na području Srbije bukova strižibuba se razvija na vrstama iz familija *Tiliaceae*, *Fagaceae*, *Corylaceae*, *Siliceaeae*, *Fabaceae* i *Pinaceae*. Nađeno je da adulti u laboratorijskim uslovima preferiraju samo određeno drveće i to zovu, orah, hrast, jovino drvo, topolu i lipu (11). Izgled adulta i larve je prikazan na slici 1.



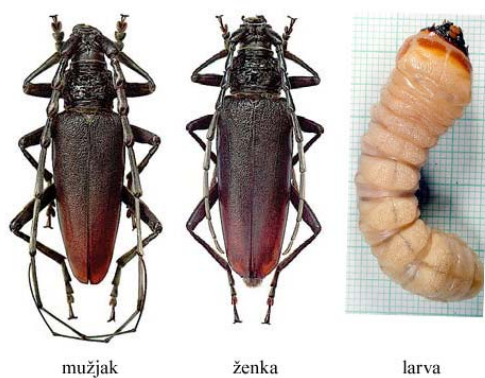
Slika 1. Bukova strižibuba (*M. funereus*). Levo – slike adulta (mužjaka i ženke) i larve, Desno – taksonomski položaj.

Larve se razvijaju na fiziološki oštećenom drveću, posećenim stablima i panjevima. Životni ciklus traje od 3 do 4 godine i nije poznat u potpunosti. Ne postoje literaturni podaci koji opisuju razviće bukove strižibube u prirodnim uslovima. Imago polaže jaja pod korom drveća iz kojih se pile larve i razvijaju se pod korom u beljici stabla (floem) u toku prve faze raspadanja drveta (12). Larve prave dugačke hodnike u beljici stabla. Larveno razviće traje oko 3 godine i obuhvata pet do šest, a nekad i više larvenih stupnjeva. Veličina larvi varira između jedinki a do kraja razvića postižu dužinu od 5,3 do oko 7 cm i težinu od 1 g do 3 g. Na kraju larvenog razvića larva se preobražava u lutku iz koje se razvija adult. Adulti žive dve godine i neleteći su insekti, aktivni u večernjim satima (od 20 h do 03 h) tokom proleća i leta – od marta do septembra (11). Najveći broj adulta bukove strižibube su veličine od 1,5 do 3 cm. Ponašanje adulta u prirodi je trenutno predmet istraživanja i prvi rezultati su tek objavljeni (13).

Zbog svog dugačkog perioda razvića larve bukove strižibube su dobar model sistem za ispitivanje uloge enzima, hormona, regulatornih proteina kao i metabolizma polisaharida i amino – kiselina u odgovoru na različite vrste stresa. Ova istraživanja su dala veoma značajne odgovore na pitanja plastičnosti insekata. Na hormonskom nivou ali i na nivou ekspresije digestivnih enzima pokazano je da je bukova strižibuba veoma adaptivna vrsta (14-20).

### 2.1.3.2 Velika hrastova strižibuba (*Cerambyx cerdo*)

Velika hrastova strižibuba (*C. cerdo*) je polifagna vrsta koja nastanjuje listopadno drveće. Rasprostranjena je u Evropi, Aziji, Kavkazu, Maloj Aziji i Severnoj Africi. U Centralnoj Evropi živi isključivo na hrastu (*Quercus*, fam. Fagaceae) dok se u drugim predelima koje nastanjuje može naći i na drugim vrstama listopadnog drveća (21). Tako je pored hrasta nađena i na kestenu, bukvi, jasenu, rogaču, orahu, kruški, bagremu, vrbi i brestu (22). Izgled adulta i larve je prikazan na slici 2.



Carstvo	Animalia
Tip	Arthropoda
Klasa	Insecta
Red	Coleoptera
Podred	Polyphaga
Familija	Cerambycidae
Potfamilija	Cerambycinae
Rod	<i>Cerambyx</i>
Vrsta	<i>cerdo</i>
Naučno ime	<i>Cerambyx cerdo</i> Linnaeus, 1758

Slika 2. Velika hrastova strižibuba (*C. cerdo*). Levo – slike adulta (mužjak i ženka) i larve, Desno – taksonomski položaj.

Imago velike hrastove strižibube je leteći insekt i aktivan je popodne i uveče tokom proleća i leta. Larve nastanjuju mrtve delove starih, i oslabljenih, ali zdravih stabala, naročito onih koja rastu na otvorenim i osunčanim lokacijama. Retko nastanjuju i mrtve delove kore i beljike mladih i zdravih stabala. Hodnici koje stvara u zdravom drvetu postaju stanište za gljivice *Biscogniauxia mediterranea* čije spore se prenose i na nezaražena stabla a ukoliko izazovu infekciju mogu dovesti do smrti

drveta (23). Tako da se ovaj insekt može svrstati u vrste insekata koji imaju štetan uticaj na drveće i šume kako ekonomski tako i medicinski, i nalazi se na listi štetnih insekata Srbije (24).

Adulti spadaju među najkrupnije insekte iz familije Cerambycidae i veličine su od 24 do 53 mm (21). Razviće velike hrastove strižibube u prirodi je poznato i opisano u literaturi za razliku od razvića bukove strižibube. Ženke polažu jaja ispod kore drveta. Tokom prve godine larve se razvijaju u gornjim delovima beljike a zatim prodiru dublje u beljiku sve do srži debla odakle se vraćaju u beljiku da završe razviće (25). Larveno razviće traje 28 meseci uključujući 5 larvenih stupnjeva nakon čega se razvija lutka kojoj je potrebno 32 dana da se preobrazi u adulta (26). Larve se ulutkavaju u beljici stabla (na oko 80 mm dubine) u velikim, ovalnim ćelijama koje su odvojene od larvalnih tunela krečnjačkom pregradom koju produkuju same larve (27). Iz lutke se razvijaju adulti koji ostaju u lutkanim kolevkama do proleća. U proleće iz ovih specifičnih komora izlaze polno zreli adulti (imago) ostavljajući ovalne rupe u drvetu do 2 cm u prečniku (22). Nekoliko generacija larvi velike hrastove strižibube može da se razvija u istim tunelima i na taj način dovode do sve većeg oštećenja drveta (22). Nađeno je da se na stablima hrasta koja su naseljena velikom hrastovom strižibubom stvaraju bolji uslovi za razviće i drugih vrsta saprofitnih insekata (28). Ženka u narednih 13 dana polaže oko 300 jaja pod korom drveta (25).

Larve velike hrastove strižibube takođe imaju dugačak period razvića i mogu biti korišćene za ispitivanje metaboličkih promena pod uticajem spoljnih faktora, kao i larve bukove strižibube. Uticaj temperature i hrane na metabolizam larvi velike hrastove strižibube je detaljno ispitan (29-31).

Bukova strižibuba i velika hrastova strižibuba su vrste koje se mogu naći u malom broju jedinki u prirodi. Bukova strižibuba pokriva relativno uzak areal rasprostranjenosti. Obe vrste spadaju u zaštićene vrste i nalaze se na IUCN listi u kategoriji ugroženih vrsta – VU – ranjivih taksona, što je prikazano na slici 3 (32). Pored međunarodne liste zaštićenih vrsta našle su se i na domaćoj listi zaštićenih vrsta (33).

### Status ugroženosti:



VU – Ranjiv takson (IUCN 2.3)

Slika 3. Status ugroženosti na listi zaštićenih vrsta In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. U VU grupu ugroženih vrsta spadaju i bukova i velika hrastova strižibuba.

Za bukovu i veliku hrastovu strižibubu ne postoje podaci o brojnosti u prirodi na celom geografskom području koje nastanjuju. Šezdesetih godina prošlog veka bukova strižibuba je nađena na 40 lokaliteta u Srbiji (34). Novija istraživanja su pokazala da se broj jedinki na teritoriji Srbije smanjio s'obzirom na to da je bukova strižibuba nađena na svega 17 lokaliteta (5). Za sada ne postoje programi zaštite ni kod nas ni u svetu. Programima zaštite prethode istraživanja koja daju odgovore na pitanja brojnosti ovih i drugih zaštićenih saprofitnih insekata u prirodi, a koja su trenutno tek u razvoju (9,10). Gajenje reproduktivno sposobnih jedinki u laboratorijskim uslovima i njihova reintegracija u prirodno stanište se koristi uveliko kao deo programa za zaštitu ugroženih vrsta kičmenjaka, a sve češće se preporučuje i kao metod za zaštitu ugroženih vrsta insekata (35, 36). Primena ovakvog programa bi mogla da bude od koristi i u zaštiti bukove strižibube, pri čemu bi prvi korak bio da se razvijaju reproduktivno sposobni adulti u laboratoriji.

Brojnost i zastupljenost velike hrastove strižibube takođe je nedovoljno poznata. Na ograničenu rasprostranjenost ove retke vrste utiče i kratak život adulta kao i njegova letačka sposobnost koja je ograničena na večernje sate (kada je temperatura ispod 18°C). Velika hrastova strižibuba se nalazi u mnogim nacionalnim parkovima Evrope. Pošto nastanjuje stara stabla njeno prirodno stanište je takođe ugroženo zato što se ova stabla seku i uklanjaju iz bezbednosnih razloga. Kao mera za zaštitu retkih insekatskih vrsta koje nastanjuju stara stabla 2004. godine je predložen plan kojim se preporučuje da se ovakva stabla ne uklanjaju kako bi se sačuvalo njihovo stanište (21). Takođe je kao mera za zaštitu predloženo da se istovremeno sa reintegracijom velike hrastove strižibube u prirodu stvore i povoljniji uslovi sredine krčenjem žbunja i malog drveća oko hrasta koji bi bio naseljen larvama (28). U

Češkoj se tek ovih dana poklanja nešto više pažnje očuvanju prirodnog staništa velike hrastove strižibube i razmišlja o mogućnostima konzervacije (37, 38). Sa druge strane reintegracija velike hrastove strižibube bi ubrzala propadanje stabala i pružilo bi mogućnost drugim vrstama koje sa *C. cerdo* čine životni kompleks a čija je brojnost veća, da izazovu veće ekološke štete u šumi. Status ugroženosti sa jedne strane i štete koje nanosi drveću sa druge strane su predmet diskusije i može se zaključiti da je tanka granica između štetnosti i ugroženosti velike hrastove strižibube.

Istraživanja na ovim vrstama strižibuba nisu obimna, zato što je administrativno ograničeno uzorkovanje malog broja jedinki iz prirode, kako zbog njihove male zastupljenosti tako i zbog njihovog statusa zaštićenosti kojim je onemogućeno uzorkovanje dovoljnog broja insekata iz prirode. Za neka istraživanja, kao što su istraživanja na digestivnim enzimima je potrebno žrtvovati veliki broj larvi. Gajenjem larvi u laboratorijskim uslovima se može donekle prevazići problem ograničene dostupnosti ovih insekata u prirodi.

## 2.2 Gajenje insekata u laboratorijskim uslovima

Insekti se gaje u laboratorijama radi ispitivanja životnog ciklusa, uticaja različitih faktora na razviće i metabolizam insekata kao i zbog ispitivanja digestivnog, neurosekretnog ili reproduktivnog trakta. Gajenje u laboratorijskim uslovima pruža puno mogućnosti za ispitivanje insekata. Moguće je pratiti i opisati larveno razviće, a isto tako je moguće ispitivati uticaj hrane tj. pojedinih komponenti hrane, temperature i drugih faktora, kako na larveno razviće, tako i na metabolizam larvi kroz ispitivanja digestivnih enzima i hormona. Međutim ne sme biti zanemareno da u prirodnim uslovima u drvnj masi i kori postoje mnoge supstance (taninske kiseline i dr.) kao i simbionti i gljive koje kompleksno utiču u kombinaciji sa promenljivom temperaturom i vlažnošću na performanse insekatskih vrsta. Prednost ispitivanja na larvama gajenim u laboratoriji je što je na ovaj način moguće varirati parametre koje prirodni uslovi ne pružaju. Ispitan je uticaj temperature, hrane i sezonskih faktora na razviće larvi bukove strižibube (39). Uloga neurosekretnog sistema i metabolizma u razviću larvi bukove strižibube je opisana kod larvi koje su se razvijale u prirodi i kod larvi gajenih u laboratorijskim uslovima (40). Uticaj temperaturnog stresa i kvaliteta hrane na metabolizam larvi bukove strižibube je opisan i analiziran na nivou neurosekretnog sistema (41, 20) i na nivou digestivnih enzima larvi i bukove strižibube (42, 43) i velike hrastove strižibube (29-31). Gajenjem larvi insekata u laboratorijskim uslovima je moguće dobiti veću količinu polaznog materijala za izolovanje i karakterizaciju enzima i raznih metabolita (44).

Gajenje u laboratorijskim uslovima bukove strižibube i velike hrastove strižibube bi moglo da posluži kao prvi korak programa reintegracije ovih vrsta u prirodu i poboljšanja njihovog statusa ugroženosti, za šta je neophodno pronaći hranljivu podlogu na kojoj je moguće dobiti reproduktivno sposobne adulte.

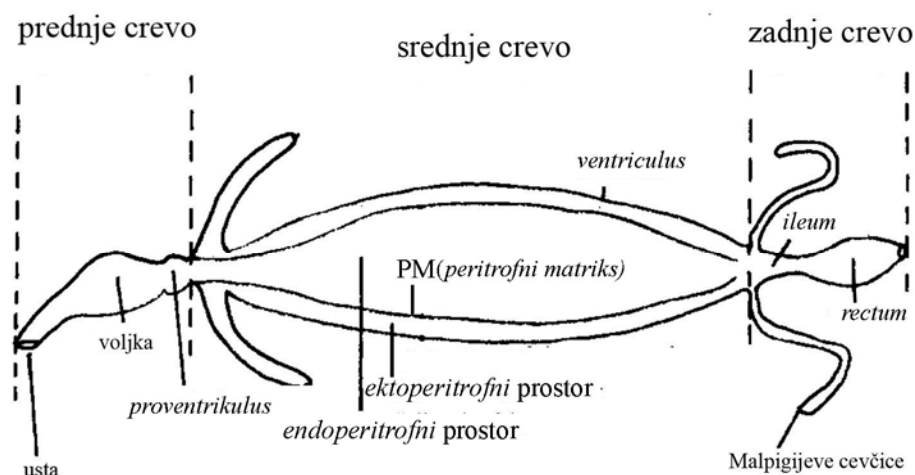
Nutritivna vrednost podloge koja se koristi za larveno razviće se meri merenjem stepena rasta larve, vremena između presvlačenja, procentom uspešnih ulutkavanja ili procenta dobijenih adulta (45), a takođe i mortalitetom, reproduktivnim potencijalom i seksualnim indeksom. Da bi se odredila nutritivna vrednost korišćene podloge za gajenje neophodno je da se odgaji više od jedne generacije insekata, jer je moguće da se neke supstancije neophodne za rast i razviće larve nalaze već stornirane

u larvi ili u jajetu u rezervama žumanceta (45). Na dobro izbalansiranoj hranljivoj podlozi je moguće kvalitativno i kvantitativno opisati larveno razviće.

Dužina larvenog razvića zavisi od broja presvlačenja larvi (broja larvenih stupnjeva) i delom je uslovljena uslovima sredine (46-48). Postoji nekoliko radova u kojima je opisan larveni razvoj u laboratorijskim uslovima strižibuba (49,50). Za veliki broj strižibuba razviće u prirodi traje od 3 do 5 godina, a opisano je za neke od njih: veliku hrastovu strižibubu *C. cerdo* (22), azijskog dugorogog tvrdokrilca (*Anoplophora glabripennis*) (51) i tzv. „huhu“ tvrdokrilca (*Prionoplus reticularis*) (52). Pokazano je da je larveno razviće kod većine strižibuba kraće u laboratorijskim uslovima nego u prirodi (40, 50, 53). Skraćenje vremena potrebnog za larveno razviće u laboratorijskim uslovima ukazuje na to da uslovi u laboratoriji a pre svega stalna dostupnost hrane istog sastava ubrzavaju razviće. Promene u larvenom razviću u zavisnosti od uslova sredine se prvenstveno ogledaju kroz digestivni sistem insekata koji predstavlja direktnu vezu insekta i spoljašnje sredine.

## 2.3 Digestivni sistem insekata

Insekti imaju kompletan sistem za varenje – alimentarni kanal koji se proteže od usta do anusa. Različiti delovi sistema su adaptirani za različite funkcije u varenju hrane. Digestivni sistem većine insekata je oblika cevi i sastoji se od tri glavna regiona: prednje crevo (*stomodeum*), srednje crevo (*mesenteron*) i zadnje crevo (*proctodeum*) što je prikazano na slici 4. Pojedinačni regioni creva su u različitoj meri razvijeni što je posledica evolutivne različitosti insekatskih vrsta, ali i adaptacije određene vrste na vrstu hrane koju koristi.



Slika 4. Digestivni sistem insekata

**Prednje crevo** (*stomeodeum*) je ektodermalnog porekla. Epitelne ćelije prednjeg creva na apikalnoj površini luče kutikularni sloj koji sadrži hitin i proteine.

Ispod sloja epitelnih ćelija se nalazi sloj mišićnih ćelija kojima se hrana mehanički usitnjava i potiskuje u srednje crevo.

Prednje crevo započinje od usta i može se podeliti na ždrelo, jednjak, voljku i „proventrikulus“. U ustima se nalaze odvodni kanali pljuvačnih žlezda. Pljuvačka sadrži glikozidaze (najviše amilazu) i lubrikante hrane. Hrana dalje prolazi kroz ždrelo i jednjak kroz voljku do proventrikulusa. Kod nekih insekata varenje započinje u voljki, ali enzimi koji u tome učestvuju su poreklom ili iz pljuvačke ili iz srednjeg



creva a tu se nalaze kao deo smeše. Epitelne ćelije prednjeg creva ne luče digestivne enzime. Iz voljke se hrana u porcijama pumpa u proventrikulus tako da se može reći da voljka ima ulogu privremenog skladištenja hrane. Proventrikulus ima ulogu u mehaničkom sitnjenju hrane. Sastoji se od mišića i specijalizovanih nabora ili bodlji koji su okrenuti ka lumenu creva. Kardijalnim (ezofagealnom) zaliskom proventrikulus se odvaja od srednjeg creva što obezbeđuje prolazak samo usitnjene hrane ka srednjem crevu.

**Srednje crevo** (*mesenteron*) je endodermalnog porekla i zaduženo je za varenje hrane. Na njemu se razlikuju tri regiona – prednji, srednji i zadnji koji imaju različite funkcije kod različitih insekatskih grupa.

Srednje crevo je izgrađeno od jednoslojnog epitela koji se oslanja na kontinualnu bazalnu laminu – bazalnu membranu. Epitel srednjeg creva je izgrađen od nekoliko vrsta epitelnih ćelija koje imaju funkciju u varenju hrane i apsorpciji hranljivih materija iz lumena creva i regenerativnih ćelija. Izgled epitelnih ćelija se razlikuje duž mezenterona u zavisnosti od funkcija koje obavlja dati region. Na vrhu tipične epitelne ćelije za varenje se nalaze mesta sa mikrovilima koji omeđavaju lumen, odnosno prostor kroz koji se kreće hrana. Na donjem delu ka bazalnoj membrani se nalaze kanali koji služe za komunikaciju sa ekstracelularnim prostorom (54).

Epitelne ćelije luče acelularnu trodimenzionalnu strukturu sastavljenu od hitinskih vlakana, proteina i polisaharida koja se naziva peritrofni matriks (PM). Polisaharidi PM su pretežno glikozaminoglikani, a glavni protein je peritrofin.

PM štiti epitelne ćelije od mehaničkih povreda hranom i od mikroorganizama (55-57). Zaštitna uloga PM-a se ogleda i u vezivanju toksina, mada je ovaj fenomen u manjoj meri rasprostranjen kod insekata i nedovoljno ispitan (58).

PM ima nezaobilaznu ulogu u varenju kod insekata koja se ogleda u nekoliko značajnih funkcija: obezbeđuje kompartmentalizaciju varenja, recikliranje digestivnih enzima, neselektivno vezuje oligomerne molekule čime se sprečava inhibicija digestivnih enzima i imobilizuje digestivne enzime (58).

Najznačajnije svojstvo PM-a je *polupropustljivost*, koja je omogućena prisustvom pora različitih veličina i lokalnim promenama pH i naelektrisanja. Najveći

broj pora je veličine od 6 do 7 nm ali postoje i pore veličine 17 do 36 nm (58). Selektivna propustljivost PM-a omogućava kompartmentalizaciju digestivnih enzima i proizvoda digestije između endoperitrofnog (deo PM-a ka lumenu creva) i ektoperitrofnog (deo PM-a ka mikrovilima epitelnih ćelija) prostora. Epitelne ćelije sintetišu digestivne enzime i luče ih u ektoperitrofni prostor odakle neki od njih prolaze kroz PM u endoperitrofni prostor – lumen creva, gde učestvuju u digestiji hrane. Kroz PM prolaze i produkti hidrolize polimernih molekula iz endoperitrofnog prostora u ektoperitrofni prostor gde se dalje hidrolizuju a krajnji proizvodi digestije apsorbuju u mikrovilima epitelnih ćelija.

PM *neselektivno vezuje oligomerne molekule za sebe*. Na ovaj način je ćelijama epitela omogućeno da neometano luče digestivne enzime i absorbuju produkte digestije. Ujedno se sprečava inhibicija nekih digestivnih enzima prisutnih u lumenu creva, što znatno povećava efikasnost digestije (59).

*Imobilizacija enzima* za PM takođe povećava efikasnost digestije jer onemogućava njihov gubitak i ujedno ih stabilizuje time što sprečava njihovu denaturaciju. Kod larvi nekih Lepidoptera je pokazano da PM sadrži 13% amilaze i 18% tripsina (60). Mehanizam imobilizacije ovih enzima nije poznat do kraja, ali se može reći da liči na zarobljavanje zato što je pokazano da se mikrovilarni enzimi nalaze unutar želatinozne supstance povezane sa PM kod larvi pamučnog moljca *Spodoptera frugiperda* (61,62).

**Zadnje crevo** (*proctodeum*) je ektodermalnog porekla. Na njemu se najčešće uočavaju tri regiona: *pylorus*, *ileum* i *rectum*. Na vrhu epitelnih ćelija zadnjeg creva se nalazi sloj kutikule. Za *pylorus* se nalaze vezani Malpigijevi sudovi koji su ekskretorni organi kod insekta. Preko njih se izbacuju amonijum-joni i voda. Ileum je kod insekata koji koriste celulozu u ishrani diferenciran u fermentativnu komoru. Tu su smešteni mikroorganizmi simbionti koji produkuju celulaze koje učestvuju u hidrolizi celuloze. Rektum ima značajnu ulogu u resorpciji vode, soli i amino-kiselina iz urina (45).

Organizacija digestivnog sistema insekatskih vrsta koji pripadaju redu Coleoptera se ne može generalizovati zato što postoji veliki diverzitet između vrsta insekata. Delovi digestivnog sistema su u različitoj meri razvijeni kod pojedinačnih

familija iz reda Coleoptera u zavisnosti od hranljivih supstrata koji insekti koriste. Kod većine ispitanih Coleoptera voljka je ili minimizirana ili nije uopšte razvijena, a finalna faza digestije svih nutrijenata se odvija na površini epitelnih ćelija srednjeg creva (63). Organizacija digestivnog sistema predstavnika familije Cerambycidae nije do kraja poznata.

### **2.3.1 Varenje kod insekata**

Hrana insekata se u najvećoj meri sastoji od polimera kao što su skrob, celuloza, hemiceluloza i proteini. Varenje se odvija u tri faze: *inicijalna*, *intermedijarna* i *finalna*. U inicijalnoj fazi dolazi do smanjenja molekulske mase polimera dejstvom polimernih endohidrolaza kao što su peptidaze, amilaze, celulaze i hemicelulaze. Dobijeni oligomeri se dalje hidrolizuju tokom intermedijarne faze dejstvom endo i egzohidrolaza. Tokom finalne faze digestije nastaju monomeri dejstvom dipeptidaza, maltaze i celobiazaze ili leucilamino – peptidaze.

Larve strižibuba kao izvor ugljenih hidrata u ishrani koriste celulozu i skrob.  $\alpha$ -Amilaza, koja je jedina od amilaza pronađena kod insekata (64), učestvuje u inicijalnoj i intermedijarnoj fazi digestije skroba. Hidroliza skroba započinje u ustima dejstvom  $\alpha$ -amilaze iz pljuvačke. Najznačajnija faza digestije skroba dejstvom  $\alpha$ -amilaze se odvija u prednjem delu srednjeg creva. Ovo je dokazano eksperimentima koji potvrđuju prisustvo  $\alpha$ -amilaze upravo u prednjem delu srednjeg creva kod nekoliko vrsta insekata (65-67). Na kraju ove faze se dobijaju kraći polisaharidni lanci koji se dalje hidrolizuju tokom intermedijarne i finalne faze digestije dejstvom endo i egzoglukozidaza do glukoze koju apsorbuju epitelne ćelije. Tri faze digestije kod insekata se odvijaju u PM-om odvojenim ekto- i endoperitrofnom prostoru što je opisano kao kompartmentalizacija varenja (68).

#### **2.3.1.1 Kompartimentalizacija varenja**

Kompartimentalizacija digestivnih enzima i proizvoda hidrolize je ključni faktor u varenju kod insekata, a obezbeđuje je prisustvo polupropustljivog PM-a. Mali molekuli (proizvodi digestije) prolaze iz lumena creva do ćelija epitela gde se

apsorbuju. Istovremeno kroz pore PM-a prolaze digestivni enzimi male molekulske mase. Inicijalna faza varenja se odigrava u endoperitrofnom prostoru. Endoglukanaze ( $\alpha$ -amilaza) i endopeptidaze se iz epitelnih ćelija srednjeg creva izlučuju kroz PM u endoperitrofnu prostor, gde hidrolizuju polimere do manjih fragmenata. Produkti hidrolize prolaze kroz PM u ektoperitrofnu prostor. Digestivni enzimi u lumenu creva su na ovaj način zaštićeni od parcijalne inhibicije produktima hidrolize što povećava efikasnost digestije.

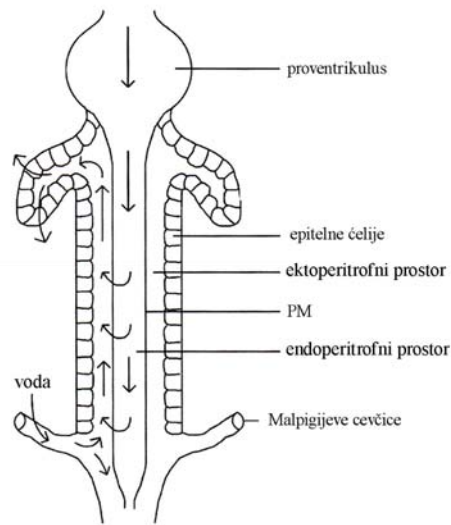
Intermedijarna i finalna faza varenja se odigravaju u ektoperitrofnom prostoru. Tripsin i  $\alpha$ -amilaza prolaze kroz PM i nalaze se i u endoperitrofnom i ektoperitrofnom prostoru tako da učestvuju u inicijalnoj i intermedijarnoj fazi digestije. U ektoperitrofnom prostoru se nalaze i egzohidrolaze kao i hidrolaze dimera zadužene za hidrolizu manjih polimernih fragmenata (intermedijarna faza digestije) i dimera (finalna faza digestije). Većina enzima uključenih u intermedijarnu i finalnu fazu digestije su proteini velikih molekulskih masa i ne mogu da prođu kroz PM, a neki od njih su ukotvljeni u membranu epitelnih ćelija. Krajnji produkti hidrolize polimernih molekula iz hrane se na ovaj način nalaze u ektoperitrofnom prostoru, odnosno u neposrednoj blizini membranskih nosača kojima se apsorbuju u ćelije epitela (58).

Digestivni enzimi su kod većine insekata prisutni u malim količinama, ali je njihov efekat digestije znatan upravo zbog kompartmentalizacije varenja i mogućnosti recikliranja enzima koji mogu da prolaze kroz PM. Recikliranje digestivnih enzima je omogućeno takozvanim protokom u suprotnom smeru.

### **2.3.1.2 Protok u suprotnom smeru**

Protok u suprotnom smeru je hipoteza predložena 1981. (69) po kojoj se deo digestivnih enzima iz endoperitrofnog prostora reciklira, što dodatno doprinosi povećanju efikasnosti varenja. U zadnji deo srednjeg creva enzimi stižu zajedno sa hranom. Pošto prolaze kroz PM oni ovde prelaze u ektoperitrofnu prostor, odakle ih voda koja se kreće u suprotnom smeru od smera kretanja hrane vraća u prednji deo srednjeg creva u kome oni ponovo prelaze u endoperitrofnu prostor i ponovo učestvuju u varenju hrane. Princip je prikazan na slici 5.

Do ove hipoteze se došlo tako što je pokazano da se vrlo malo enzima ekskretuje (69). Kasnije je upotrebom boja i imunofluorescentne mikroskopije delova srednjeg creva larvi *S. frugiperda* potvrđena teorija o protoku u suprotnom smeru i recikliranju enzima (62). U prilog teoriji idu i noviji rezultati dobijeni istraživanjima na larvama pamučnih moljaca *S. frugiperda* i malih mušica *Rhynchosciara americana* o distribuciji  $\alpha$ -amilaze i trispina duž srednjeg creva (59).



Slika 5. Protok u suprotnom smeru kod insekata u srednjem crevu.

### 2.3.2 Digestivni enzimi insekata

Digestivni enzimi su hidrolitički enzimi koji katalizuju degradaciju molekula dodatkom molekula vode na specifičnu vezu. Kod insekata su nađene sve klase digestivnih enzima koje postoje i kod sisara (70), a mogu se podeliti po tipu supstrata na:

- Glikozidaze (katalizuju razgradnju polisaharida i oligosaharida do prostih šećera),
- Lipaze (katalizuju hidrolizu masti do masnih kiselina i glicerola),
- Peptidaze (katalizuju hidrolizu proteina do amino-kiselina).

#### 2.3.2.1 Mehanizmi sekrecije digestivnih enzima

Mehanizmi sekrecije digestivnih enzima se razlikuju u različitim regionima srednjeg creva insekata i zavise od specifičnih funkcija regiona. Epitelne ćelije srednjeg creva insekata sekretuju digestivne enzime na tri načina:

- *Merokrina sekrecija – egzocitoza* Sinteza enzima se završava u Goldžijevom aparatu epitelnih ćelija od kojeg se odvajaju unutar malih membranskih vezikula. Ove vezikule se fuzionišu sa ćelijskom membranom pri čemu se enzim otpušta u lumen creva. Ovaj tip sekrecije se češće odvija u zadnjem delu srednjeg creva insekata. Pokazano se da se na ovaj način sekretuje tripsin upravo u zadnji deo srednjeg creva larvi tzv. „brašnatih crva“ *Tenebrio molitor* (67).
- *Holokrina sekrecija* – sekrecija gde se membrana epitelnih ćelija razara i sadržaj se izlučuje u lumen creva a sa njim i digestivni enzimi (71). Ovaj način sekrecije je skup za insekte i nije čest a nađen je kod larvi muva zonzara *Stomoxys calcitrans* (72).
- *Apokrina sekrecija* – varijantna holokrine sekrecije gde se gubi oko 10 % apikalne citoplazme epitelnih ćelija. Vršni delovi mikrovilarne membrane se odvajaju kao vezikule koje sadrže enzime, u sekretornim vezikulama poreklom iz Goldžijevog aparata, i otpuštaju u lumen. Postoji i mikroapokrina sekrecija gde se gubi veoma mala količina apikalne citoplazme zato što se od mikrovilarne membrane odvajaju male vezikule sa dvoslojnom membranom zato što sadrže pojedinačne vezikule sa enzimima. Sadržaj vezikula oba tipa sekrecije se oslobađa u lumenu razaranjem membrana pod dejstvom detergenata i promene pH vrednosti (71). Ovaj tip sekrecije je specifičan za ćelije prednjeg dela srednjeg creva insekata. Kako je funkcija prednjeg dela srednjeg creva da apsorbuje proizvode digestije, smatra se da je apokrina ili mikroapokrina sekrecija adaptacija na ove uslove. Tako se na mestu gde se dešavaju apsorpcioni procesi bolje disperguje sadržaj sekretornih vezikula u lumen, a da se pri tom ne ometa apsorpcija proizvoda digestije (67).

$\alpha$ -Amilaza se sintetise u epitelnim ćelijama prednjeg dela srednjeg creva gde se u Goldžijevom aparatu pakuje u sekretorne vezikule zajedno sa peritrofinom (proteinom PM-a) i sekretuje se u lumen mehanizmom mikroapokrine sekrecije. Tokom transporta ka mikrovilima deo amilaze se zbog povećanja pH u vezikulama ili nekog drugog mehanizma odvajaju od membrane. U trenutku oslobađanja sadržaja vezikula solubilni deo  $\alpha$ -amilaze se oslobađa u ektoperitrofni prostor, dok deo ostaje

vezan za membranu tako što se inkorporira u želatinoznu supstancu PM-a. Ovaj mehanizam sekrecije i imobilizacije  $\alpha$ -amilaze je opisan eksperimentima na larvama *S. frugiperda* i pretpostavlja da značaj imobilizovanja  $\alpha$ -amilaze nije samo u povećanju efikasnosti digestije, već i u kontroli sekrecije amilaze, zato što su ćelije srednjeg creva pune glikogena čija bi nekontrolisana hidroliza dovela do osmotskog šoka (62).

### **2.3.2.2 Kontrola sekrecije digestivnih enzima**

Digestivni enzimi insekata se izlučuju u lumen srednjeg creva na dva načina: konstitutivnom sekrecijom – enzimi se oslobađaju iz ćelija odmah po sintetisanju i regulisanom sekrecijom – sintentizovani enzimi se čuvaju u neaktivnom obliku kao zimogeni do aktivacije i oslobađanja iz zimogenih granula regulacionim signalom.

Čuvanje neaktivnih enzima i stimulacija njihove sekrecije hranom su karakteristike insekata koje su detaljno ispitane (73). Postoje tri mehanizma kontrole sekrecije digestivnih enzima kod insekata: prandijalna kontrola – stimulacija unetom hranom, hormonalna kontrola i parakrina kontrola – stimulacija faktorima koji nastaju u endokrinim ćelijama creva.

Mehanizmi kontrole sekrecije digestivnih enzima kod insekata nisu odvojeni procesi (74). Proteini iz hrane direktno stimulišu sekreciju digestivnih enzima (prandijalni mehanizam) i istovremeno deluju na endokrine ćelije creva (parakrini mehanizam) (73).

Hormonska kontrola regulacije proteolitičke i amilolitičke aktivnosti je dokazana kod larvi bukove strižibube indirektnim metodama ligature i injektiranjem ekstrakta mozga aktivnih larvi (75) i sprečavanjem oslobađanja neurohormona iz medijalnih neurosekretornih ćelija delovanjem stresorne temperature (20).

### **2.3.3 Glikozidaze**

Polisaharidi se hidrolizuju dejstvom glikozidaza u voljki i u prednjem delu srednjeg creva kod većine insekata, što je potvrđeno eksperimentima u kojima je

određivana aktivnost pojedinačnih enzima u svim regionima digestivnog trakta insekata gde je pokazano da su glikozidaze prisutne u voljci (prednje crevo) i u prednjem delu srednjeg creva (65, 66, 76, 77). Fitofagni insekti od polisaharida koriste najčešće skrob, celulozu, ksilan ili pektin a retko i hitin, dok karnivorni insekti koriste glikogen. Enzime za digestiju polisaharida sekretuju pljuvačne žlezde i epitelne ćelije srednjeg creva insekata.

Glikozidaze nađene kod insekata su:

- $\alpha$ -Amilaza hidrolizuje unutrašnje glikozidne veze u skrobu i glikogenu oslobađajući kratke dekstrinske lance (78-81).
- $\alpha$ -Glukozidaza i oligo-1,6-glukozidaze (izomaltaze) hidrolizuju male dekstrinske lance oslobađajući glukozu.  $\alpha$ -Glukozidaza hidrolizuje maltozu, saharozu, trehalozu, melezitozu, rafinozu i stahiozu (82).
- $\alpha$ -Galaktozidaza hidrolizuje meliobiozu, rafinozu i stahiozu (83).
- $\alpha$ -Trehalaza hidrolizuje trehalozu na galaktozu i glukozu (84).
- $\beta$ -Glukozidaze hidrolizuje celobiozu, genciobiozu i metil- $\beta$ -glikozide (85).
- $\beta$ -Fruktofuranozidaza deluje na saharozu oslobađajući glukozu i fruktozu (86).
- Pektinaza – poligalakturonaza katalizuje hidrolizu pektina do galakturonske kiseline (87, 88).
- Ksilanaza hidrolizuje  $\beta$ -1,4- veze u ksilanima (89).
- Hitinaza hidrolizuje veze unutar hitina (90, 91).
- Lizozim hidrolizuje  $\beta$ -1,4- glikozidne veze između *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilmuraminske kiseline (79, 92).
- Celulaza hidrolizuje  $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,4 između glukana unutar celuloze (85, 93).

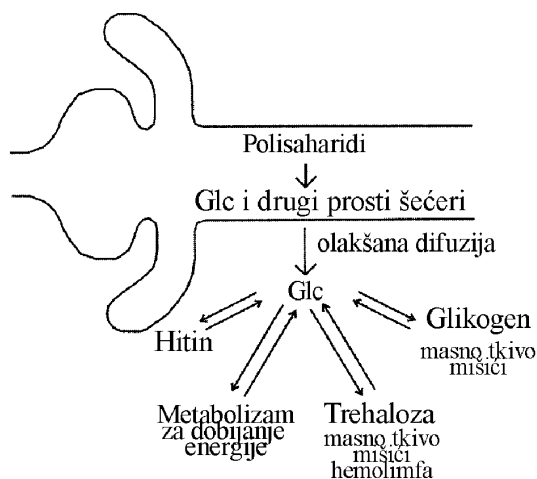
Krajnji proizvod hidrolize polisaharida su glukozu i drugi monosaharidi koji se apsorbuju iz lumena creva i dalje metabolišu preko glukoze čime se dobija energija neophodna za kretanje, rast i razmnožavanje insekata.

#### **2.3.4 Metabolizam glukoze kod insekata**

Glukoza se apsorbuje iz lumena creva (iz ektoperifernog prostora) u epitelne ćelije posredstvom membranskih glukoznih transportera. Glukozni transporteri su nađeni i okarakterisani na genetskom nivou u ćelijama ventrikulusa i prednjem delu



srednjeg creva larvi peruanske pamučne štetočine *Dysdercus peruvians* (94). Dalja sudbina glukoze zavisi od trenutnih potreba insekta a prikazana je na slici 6.



Određivanje nivoa trehaloze i glikogena u hemolifi larvi strižibuba je korišćeno za praćenje nivoa metabolizma polisaharida (30). Ovi podaci indirektno mogu da posluže kao merilo nivoa amilazne aktivnosti.

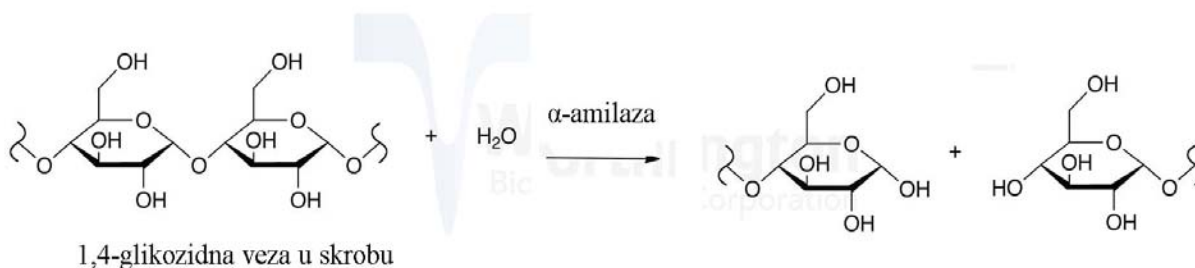
Slika 6. Moguća „sudbina“ glukoze adsorbovane iz creva insekata

Deo glukoze se troši za sintezu hitina a najveći deo se metaboliše za dobijanje energije. Višak glukoze se deponuje u masnom tkivu, mišićima i hemolimfi insekata u obliku glikogena i trehaloze.

Energiju dobijenu u vidu ATP-a tokom metabolizma glukoze insekti troše na kretanje. Leteći insekti za letenje, koje je energetski zahtevno, koriste pored ATP dobijenog od glukoze i ATP dobijen metabolizmom masnih kiselina. Ksilofagne larve troše energiju za prodiranje kroz drvenu masu što im omogućava hranjenje, a time i razviće. Može se reći da je to veoma zahtevan proces, obzirom na kompaktnost i čvrstinu drvnog materijala sa jedne strane i krhkosti u pogledu građe i veličine larvi sa druge strane, te je ksilofagnim larvama potrebno puno energije da bi prevazišle ovaj problem. U nizu reakcija potrebnih da se obezbedi energija tj. glukoza važan polazni enzim je  $\alpha$ -amilaza. Pored ATP dobijenog od glukoze moguće je da ove larve koriste i ATP dobijen metabolizmom masnih kiselina, kao insekti letači, da bi obezbedile dovoljno energije.

## 2.4 $\alpha$ -Amilaza

Amilaze su prisutne u digestivnim sistemima svih životinja. Biljke i neki mikroorganizmi takođe proizvode amilazu. Amilaze su glikozidaze koje hidrolizuju  $\alpha$ -1,4-glikozidnu vezu skroba. Reakcija je prikazana na slici 7.



Slika 7. Reakcija hidrolize 1,4-D-glikozidne veze polisaharida dejstvom  $\alpha$ -amilaze

Hidrolizom 1,4 – glikozidne veze nastaju dva molekula oligosaharida sa redukujućim krajem na prvom C atomu. Amilaze su zbog svoje uloge i upotrebne mogućnosti odavno interesantne za proučavanje.

### 2.4.1 Istorijski pregled

Erhard Friedrich Leuchs je još 1831. godine opisao hidrolizu skroba enzimom iz pljuvačke koji je nazvao "ptijalin" (95, 96). Amilaza je prvi enzim koji je izolovan. 1833. godine su francuski hemičari Anselme Payen i Jean-François Persoz izolovali amilazni kompleks iz isklizalog ječma i nazvali ga „dijastaza“ (97, 98). Beijerinck je 1895. godine predložio da se svi enzimi koji hidrolizuju skrob nazovu amilaze (99). Ovaj naziv je i danas u upotrebi.

Istraživanja na amilazama dobijaju na značaju kada počinje njihova industrijska upotreba u procesima razgradnje skroba. Boidin i Efront su 1917. godine prvi put upotrebili amilazu dobijenu iz *Bacillus subtilis* u tekstilnoj industriji (100). Pedesetih i šezdesetih godina prošlog veka započela je upotreba amilaze u industriji šećera, za dobijanje visokofruktoznih sirupa koji se prave od skroba. Ovi procesi su dalje razvijani uvođenjem novih tehnika i određenih amilaza za enzimsku likvifikaciju skroba. Sa sve većom upotrebom amilaza u industriji razvijala se i potreba za

istraživanjima na ovom enzimu. Istovremeno su napredovala istraživanja na amilazama u cilju dobijanja novih saznanja o njenoj ulozi u varenju kod životinja i klijanju kod biljaka. Pankreasna  $\alpha$ -Amilaza je prvi put izolovana do homogenosti i kristalizovana 1947. godine (101). Amilaza larvi bukove i velike hrastove strižibube je prvi put detektovana u mezenteronu 1966. godine (102). Amilaza je danas predmet istraživanja velikog broja radova kako zbog svoje fiziološke uloge tako i zbog nezamenljive upotrebe u industrijskim procesima. Na osnovu specifičnih osobina i vrste veze koju hidrolizuju sve amilaze su klasifikovane u nekoliko grupa što je prikazano u poglavlju 2.4.2.

### 2.4.2 Klasifikacija enzima

Po preporuci Komiteta za nomenklaturu internacionalne unije za biohemiju i molekularnu biologiju – Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) enzimi su označeni oznakom EC iza koje slede 4 broja koji su karakteristični za funkciju koju enzim obavlja. Amilaze su označene kao EC 3.2.1.1, EC 3.2.1.2 i EC 3.2.1.3. Ove oznake potiču od:

EC 3 – *Hidrolaze* – katalizuju reakciju hidrolize u prisustvu molekula vode

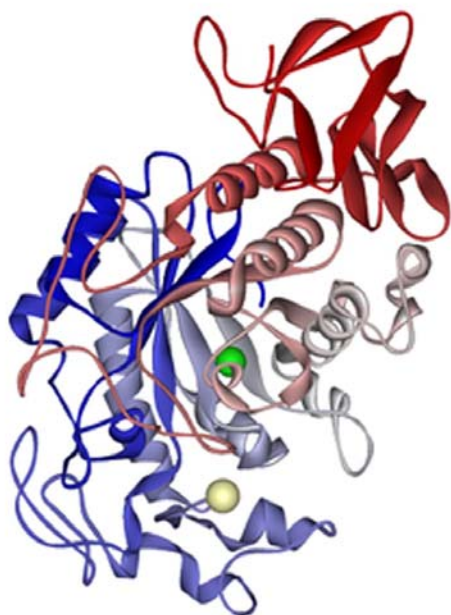
EC 3.2 – *Glikozidaze* – katalizuju hidrolizu glikozidnih veza

EC 3.2.1 – enzimi koji katalizuju hidrolizu O- i S- glikozidnih veza

Poslednji broj označava specifičnost enzima odnosno definiše vrstu veze u molekulu supstrata čiju hidrolizu katalizuje enzim.

Glikozidaze se klasifikuju na endo (hidrolizuju veze unutar polisaharidnog lanca) i egzo (hidrolizuju veze na neredukujućem kraju polisaharidnog lanca). Amilaze katalizuju hidrolizu 1,4-D-glikozidne veze između susednih glukoznih jedinica a po mestu na kome hidrolizuju skrob dele se na *endoamilaze*, koje hidrolizuju 1,4-D-glikozidne veze u unutrašnjosti molekula amiloze i amilopektina stvarajući kratke glukopiranozne lance, i *egzoamilaze*, koje katalizuju hidrolizu 1,4-D-glikozidne veze sa neredukujućeg kraja amiloze ili amilopektina stvarajući kao krajnje produkte maltozu i glukozu.

**$\alpha$ -Amilaza (EC 3.2.1.1)** je endoamilaza koja na nasumičnim mestima raskida lance skroba i glikogena dajući kratke oligomerne dekstrinske lance.  $\alpha$ -Amilaza je pronađena kod životinja, čoveka viših biljaka i nekih mikroorganizama, kao što su gljive roda *Aspergillus* i bakterije roda *Bacillus* i *Clostridium*.



Slika 8. Pankreasna  $\alpha$ -amilaza. Bela kuglica –  $\text{Ca}^{2+}$ , zelena kuglica –  $\text{Cl}^{-}$

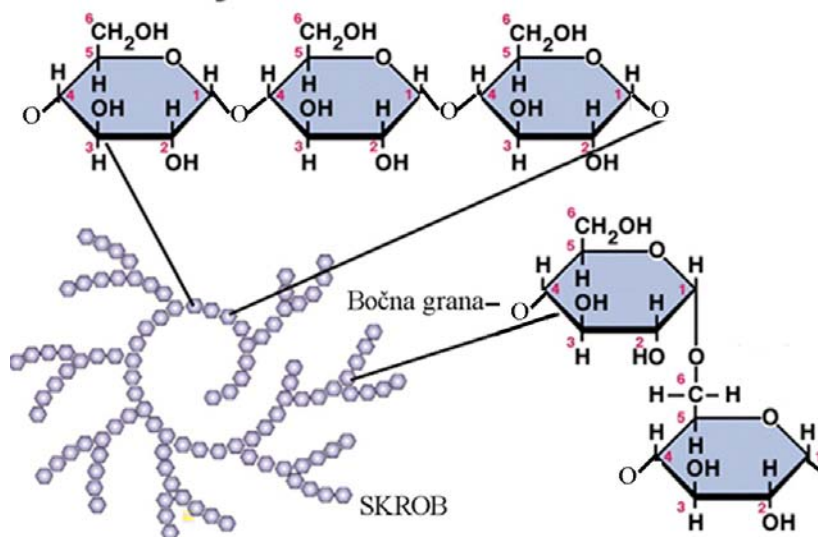
Humana i svinjska pankreasna  $\alpha$ -amilaza kao i humana pljuvačna  $\alpha$ -amilaza su najviše ispitivane amilaze (103). Trodimenzionalna struktura pankreasne  $\alpha$ -amilaze je prikazana na slici 8.  $\alpha$ -Amilaza je glikoprotein (104) sastavljen od jednog polipeptidnog lanca sa 475 aminokiselina, dve SH grupe i četiri disulfidna mosta i vezanog jona  $\text{Ca}^{2+}$  (105, 106). Pokazano je takođe da postoji vezujuće mesto za hloridni jon koji pri vezivanju izaziva konformacionu promenu enzima, praćenu povećanjem aktivnosti (107).

Uloga  $\alpha$ -amilaze je da hidrolizuje skrob u različitim sistemima u kojima se nalazi. Kod životinja i čoveka to je digestivni sistem, a skrob je najzastupljeniji polisaharid u ishrani. Kod biljaka  $\alpha$ -amilaza je prisutna u semenu, ali se sintetizuje samo tokom germinacije kada je jedino opravdana razgradnja skroba koji biljke akumuliraju u semenu. Mikroorganizmi luče  $\alpha$ -amilazu u spoljašnju sredinu direktno razlažući skrob prisutan u hranljivom supstratu, što im omogućava apsorpciju proizvoda hidrolize skroba.

### 2.4.3 Skrob

Skrob je polisaharid sastavljen od velikog broja glukočnih jedinica međusobno vezanih 1,4 i 1,6 – O – glikozidnim vezama. Sastoji se od dva tipa molekula: spiralne

*amiloze* i razgranatog *amilopektina*. Šematski prikaz skroba sa hemijskim formulama je prikazan na slici 9.



Slika 9. Skrob, šematski prikaz i hemijska formula

Amiloza je polimer sastavljen od  $\alpha$ -(1,4)-D-glukopiranoznih jedinica. Amilpektin je polimer sastavljen od  $\alpha$ -(1,4)-D-glukopiranoznih jedinica sa oko 4%  $\alpha$ -(1,6)-O-glikozidnih veza. Skrob se sintetiše u zelenim biljkama i predstavlja energetski depo biljkama. Ujedno je najzastupljeniji polisaharid u ishrani mnogih životinja i čoveka.

Glikogen je analog amilopektinu. Nalazi se kod životinja i nekih gljiva gde predstavlja energetski depo. Nastaje od molekula glukoze tokom procesa glikogeneze, a razgrađuje se po potrebama organizma.

Amilopektin i glikogen su rastvorni u vodi, dok je amiloza nerastvorna. Amiloza u kontaktu sa vodom pravi suspenzije, tako što se molekuli amiloze agregiraju praveći velike čestice koje stvaraju precipitat. Skrob je nerastvoran u hladnoj vodi. U kontaktu sa vodom bubri i formira pastu. Na temperaturama između 70°C i 80°C povećava znatno viskoznost rastvora. Grejanjem na 110°C granule skroba se raspadaju ireverzibilno, ali bez raskidanja glukozidnih veza. Raskidanjem

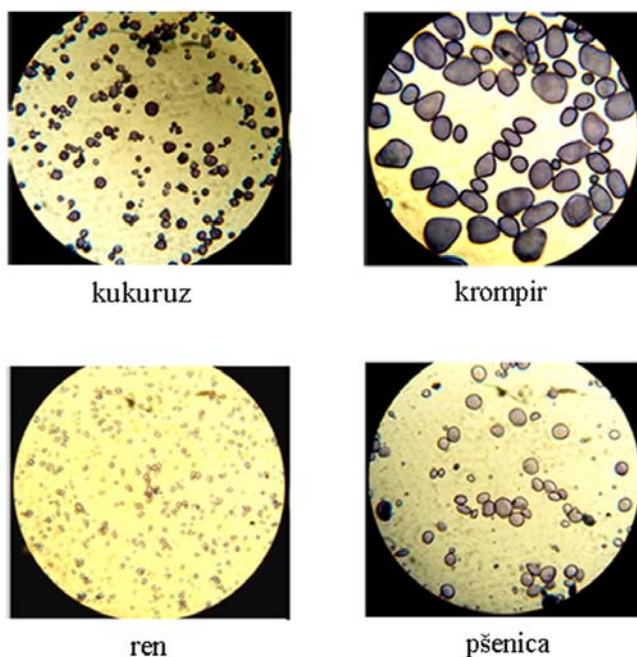
malog broja glikozidnih veza enzimima ili hemijski značajno se povećava rastvorljivost skroba.

Skrob se u prirodi nalazi u obliku specifičnih granula. Amiloza i amilopektin formiraju mešovite kristalne regione koji se raspoređuju radijalno tako da granulama daju strukturu sferolita. Granule skroba su vidljive pod svetlosnim mikroskopom. Nerastvorne su u vodi, bubre i formiraju pastu (103).

#### 2.4.3.1 Nativni (sirovi) skrob

Zelene biljke sintetizuju skrob u toku procesa fotosinteze u hloroplastima. Skrob ne može da prođe kroz ćelijsku membranu, pa se u svakoj ćeliji razlaže i sintetizuje po potrebama. U amiloplastima se ponovo sintetizuje i kao takav predstavlja energetska rezervu. Jedan amiloplast može da sadrži jedno ili više zrna skroba. Skrob se kao depo nalazi u raznim delovima biljaka, a najviše u semenima i korenu. Količina skroba u raznim delovima biljke varira u zavisnosti od godišnjeg doba, odnosno od procesa u biljci.

Na slici 10 su prikazane granule skroba posmatrane pod svetlosnim mikroskopom poreklom iz različitih biljaka (108).



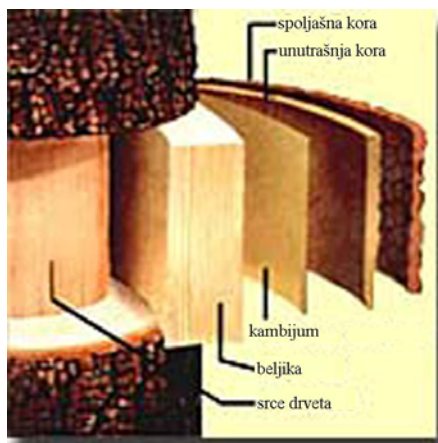
Slika 10. Svetlosna mikroskopija granula sirovog skroba izolovanog iz različitih izvora.

Oblik i veličina granula skroba su specifični za vrstu biljke što se vidi na slici 10. Prve studije na morfologiji skroba su započeli Nägeli i Majer 1858. godine, i pokazali su veoma veliku raznolikost skrobova. Pokazano je da veličina, oblik i struktura skroba variraju u okviru definisanih granica, tako da se zrna iz različitih izvora razlikuju međusobno (109). Različite metode mikroskopije skroba (svetlosna, fazno kontrastna, petrografska, elektronska (SEM) i difrakciona mikroskopija) mogu da posluže za razlikovanje vrsta skrobova, ali i za identifikaciju biljnog materijala iz kog skrob potiče (110). Najčešće se ispituju osobine skrobnih zrna iz materijala koji biljkama služe kao depo polisaharida, a to su seme i korenje, gde skroba upravo i ima najviše. Skrob iz stabla drvenastih biljaka se ređe uzima u razmatranje kada se ispituju oblik i veličina granula skroba, zbog otežanog pristupa i manje količine u polaznom materijalu. Upravo skrob u drvetu predstavlja jedan od glavnih izvora polisaharida za ksilofagne larve koje se razvijaju u beljici stabla.

#### **2.4.3.2 Skrob u drvetu**

Najvažniji rezervni polisaharid u drvenastim biljkama je skrob. Sintetizuje se i razgrađuje u svim delovima drveta u zavisnosti od potreba. Najveća količina skroba se akumulira u korenu, ali se jedan deo akumulira i u stablu. Skrob se sintetizuje i akumulira kada se stvara puno šećera i kada je njihov nivo u biljci visok (na višim temperaturama) a hidrolizuje se na prostije šećere kada je niska koncentracija šećera u biljci (na niskim temperaturama) (111). Količina skroba u drvenastom delu zavisi od sezonskih promena (112) i od starosti drveta (113). Najveća zabeležena koncentracija skroba u drvenastom delu je u drugoj godini života i to tokom jeseni (6,32% od ukupne količine skroba u celom drvetu) (113). Sa povećanjem starosti drveta količina skroba u stablu opada. Najveće količine skroba se akumuliraju na mestima grananja drveta i to na višim delovima krošnje (114).

Skrob se u drvenastom delu nalazi u živim ćelijama gde je moguća njegova razgradnja tokom metaboličkih procesa i rasta drveća. Nalazi se u obliku višeslojnih granula u parenhimskim ćelijama beljike, kao i u živim floemskim ćelijama unutrašnje kore stabla (113). Skrob je prvi put detektovan *in situ* i izolovan iz parenhimskih ćelija beljike hrasta i oraha (115).



Slika 11. Poprečni presek drveta

Na slici 11 je prikazan poprečni presek drveta gde se vide delovi u kojima je sadržaj skroba različit. Rezerve polisaharida su dva puta veće u spoljašnjem delu beljike nego u unutrašnjem. Skrobna zrna su najbrojnija u ćelijama uz kambijum drveta, a njihov broj opada ka unutrašnjosti beljike. U ćelijama srži drveta se može naći zanemarljiv broj skrobnih zrna ili ih uopšte nema.

Sadržaj skroba u delovima stabla je od velikog značaja za ksilofagne insekte čije se larve razvijaju upravo u ovim delovima drveta. Larve bukove strižibube se razvijaju u potkornom delu i u beljici stabla što i odgovara mestima sa najviše skroba. Larve velike hrastove strižibube iako prodiru do srži drveta, ipak najveći deo svog razvića provode u beljici i potkornom delu stabla. Nađeno je da stara, oštećena i bolesna stabla akumuliraju skrob isključivo u spoljašnjem ksilemskom prstenu beljike (116). Što znači da ove larve lako dolaze do skroba neophodnog za dobijanje energije.

**Digestija skroba** obuhvata mehaničku i enzimsku hidrolizu. Enzimaska hidroliza uključuje  $\alpha$ -amilazu, čije se dejstvo može posmatrati kroz hidrolizu amiloze i amilopektina odvojeno.

*Dejstvom  $\alpha$ -amilaze na amilozu* u prvoj fazi reakcije dobijaju se lanci dekstrinskih molekula male molekulske mase, od kojih nastaju sve kraći i kraći molekuli. U drugoj sporijoj fazi reakcije  $\alpha$ -amilaza deluje na kratke dekstrinske lance dajući kao proizvod reakcije smešu maltoze i maltotrioze. Maltotrioza dalje može da se hidrolizuje pod dejstvom  $\alpha$ -amilaze na maltozu i glukozu, ali veoma sporo. Krajnji proizvodi hidrolize amiloze dejstvom  $\alpha$ -amilaze su glukozna (13%) i maltoza (87%) (103).

*Dejstvom  $\alpha$ -amilaze na amilopektin* se u prvoj fazi dobijaju granični granati dekstrinski lanci. Zatim od njih nastaju kraći granati i linearni dekstrinski lanci – hepta-, heksa-, penta-, tetra-trisaharidi i disaharidi. Krajnji proizvodi hidrolize amilopektina (sa 4% 1,6-veza) su glukozna (19%), maltoza (73%) i izomaltoza (8%)

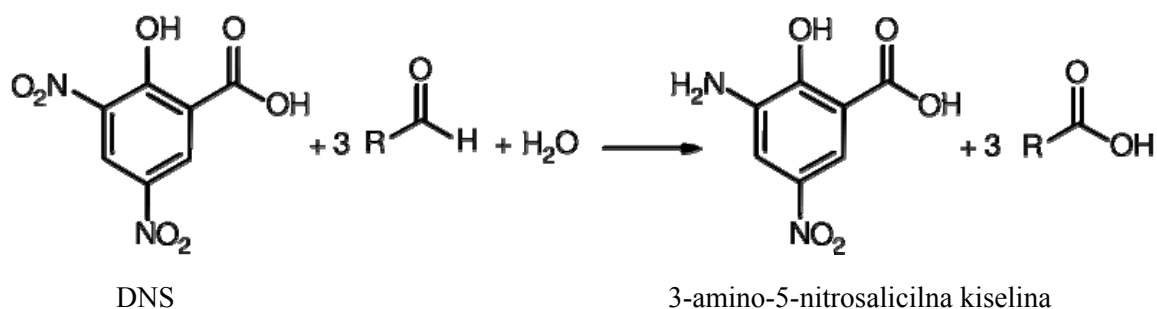


(103). Zanimljivo malo glukoze je detektovano na početku reakcije  $\alpha$ -amilaze, što potvrđuje da se glukoza ne stvara od dekstrinskih molekula velike mase već samo od kratkih dekstrinskih lanaca (117).

Korišćenjem produkata hidrolize ili skroba kao supstrata u specifičnim kolorimetrijskim reakcijama kvantifikuje se amilazna aktivnost (108, 118).

#### 2.4.4 Testovi za određivanje amilazne aktivnosti

Najčešće korišćena metoda za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze kojom se određuju redukujući šećeri je *DNS metoda* koju je razvio Bernfeld 1955. godine (119). Kao supstrat se upotrebljava rastvorni skrob. Dejstvom amilaze nastaju dekstrinski lanci različitih dužina, koji imaju redukujući kraj nastao na mestu hidrolize. Pod dejstvom dinitrosalicilane kiseline (DNS) aldehidna grupa iz šećera oksiduje do kiseline a redukuje se jedna  $\text{NO}_2$  grupa na DNS-u u  $\text{NH}_2$  grupu pri čemu dolazi do promene boje od žute do narandžasto crvene. Promena boje se meri spektrofotometrijski merenjem absorbancije na 540 nm. Reakcija je prikazana na slici 12 (120).



Slika 12. Reakcija DNS sa redukujućim krajem dekstrinskih lanaca nastalih hidrolizom skroba.

Skrob sa rastvorom joda ( $\text{I}_2$  u rastvoru KI) interaguje dajući plavu boju. Mehanizam reakcije nije do kraja poznat ali  $\text{I}_2$  sa  $\text{I}^-$  jonom pravi  $\text{I}_3^-$  negativni lanac koji se interkalira unutar spiralnih lanaca amiloze iz skroba. Amilopektin i granajući delovi skroba formiraju mnogo kraće spirale, tako da molekuli joda ne mogu da se interkaliraju, te je boja proizvoda ove reakcije narandžasta do žuta.

Hidrolizom skroba se dobijaju manji oligosaharidi sa kojima takođe jod ne daje plavu boju. Swanson je pronašao da 4 do 6 glukoznih jedinica u nizu ne daju nikakvu boju sa jodom, lanci od po 8 do 12 glukoznih jedinica daju crvenu boju, a polisaharidi sa 30 i više glukoznih jedinica daju plavu boju sa jodnim reagensom (121).

Upotrebom ove osobine skroba i dekstrinskih lanaca da sa  $J_2$  daju obojena jedinjenja sa maksimumom apsorbancije na  $\lambda = 590$  nm, razvijeno je nekoliko metoda za određivanje aktivnosti amilaze. Najviše citirana i korišćena je metoda po Brigsu (122). Ona predstavlja modifikaciju testa koji su razvili Sandstedt, Kneen i Blish 1941. godine (123). Ovom metodom je moguće odrediti aktivnost  $\alpha$ -amilaze. Kao supstrat se koriste  $\beta$ -granični dekstrinski lanci dobijeni hidrolizom skroba pod dejstvom  $\beta$ -amilaze, a za prekid reakcije jodni reagens. Tokom reakcije sa  $\alpha$ -amilazom dekstrinski lanci se skraćuju čime je reakcija sa jodom onemogućena. Amilazna aktivnost se određuje na osnovu smanjenja intenziteta plave boje sa početka reakcije.

#### **2.4.5 Zimogramska detekcija amilaze**

Osobina skroba da reaguje sa jodom je iskorišćena i za razvijanje zimograma za amilaze u gelu posle elektroforeze. Zimogram predstavlja detekciju enzima, uglavnom hidrolaza, nakon elektroforeze na različitim gelovima (poliakrilamid, skrob, agaroz, Sephadex, razni kompozitni gelovi). Zimogramska detekcija omogućava sagledavanje niza osobina enzima. Mnogi enzimi su prisutni u živom svetu u obliku izoformi čija detekcija je moguća zimogramima. Zimogramom je moguće detektovati enzim nakon native poliakrilamidne elektroforeze (PAGE), izoelektričnog fokusiranja (IEF-a) ili nakon natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidne elektroforeze (SDS PAGE). Detekcijom enzima posle native PAGE i IEF-a detektuju se enzimске izoforme, a posle IEF-a svakoj izoformi je moguće odrediti pI vrednost. Neke enzime je moguće zimogramski detektovati i posle SDS PAGE u delimično renaturišućim uslovima, tako što se enzim posle elektroforeze prvo renaturiše u gelu a zatim detektuje specifičnim supstratom. Na ovaj način je moguće enzimu odrediti približnu molekulska masu (MM), ako nema disulfidnih veza. Po intenzitetu dobijenih traka

moguće je kvantifikovati enzim zimogramskom tehnikom. Danas je zimogramska detekcija enzima nezaobilazni korak u detekciji, prečišćavanju i karakterizaciji enzima.

Zimogrami za amilazu se koriste od 1970. i 1971. godine kada su detektovane izoforme humanih pankreasnih i pljuvačnih amilaza (124, 125). Zimogramska detekcija amilaze obuhvata sledeće faze:

- a) elektroforetsko razdvajanje proteina u gelu
- b) kontakt gel-skrob
- c) vizuelizacija amilaznih traka bojenjem gela jodnim reagensom

Za fazu kontakta enzima sa skrobom koriste se „kopolimerizovani“ skrob u gelu ili rastvorni skrob. Za kopolimerizaciju skroba se koriste AA gelovi i agarozni gelovi, mada ovde ne dolazi do prave kopolimerizacije skroba i molekula akrilamida ili agaroze. Ovakvi gelovi mogu da se printuju na gel posle elektroforeze (126) ili da se koriste za elektroforetsko razdvajanje (AA) i detekciju amilaze posle elektroforeze u istom gelu. Za tehniku printa gel na gel AA gelovi sa skrobom su se pokazali bolji od agaroznih, zato što se sa njima lakše manipuliše i zimogramska detekcija je bolje rezolucije. Agarozni gelovi su češće bili u upotrebi ranijih godina za detektovanje amilaza (127) mada se koriste ponekad i danas (128).

Rastvorni skrob se najčešće koristi za fazu kontakta enzima sa skrobom. Gel posle elektroforeze se inkubira u rastvoru skroba, najčešće se koristi 1% rastvor. Ova tehnika je jednostavna za upotrebu i odlikuje se dobrom rezolucijom. Amilaze insekata se zimogramski detektuju ovom tehnikom i to najčešće posle renaturacionog SDS PAGE (129-131).

Amilazne trake se vizuelizuju bojenjem gela rastvorom joda. Gel postaje plav do crven, a mesta na kojima se nalaze amilaze su bezbojna. Pronalaženje optimalnih uslova za zimogram je neophodno za detekciju svakog enzima i podrazumeva pronalaženje optimalnog vremena inkubacije ili „printa“, koncentracije skroba, koncentracije jodnog reagensa, kao i pronalaženje optimalne količine enzima koji se nanosi na gel za elektroforezu. Naravno i tip korišćene elektroforeze (nativna PAGE, IEF ili renaturacioni SDS PAGE) može da utiče na dobivene rezultate zimograma.

## 2.5 $\alpha$ -Amilaze insekata

$\alpha$ -Amilaze insekata su predmet istraživanja dugi niz godina. Da bi se jedan enzim okarakterisao i uporedio sa enzimima drugih srodnih organizama potrebno je da se prečisti. Mali je broj  $\alpha$ -amilaza insekata (a naročito iz reda tvrdokrilaca) koje su prečišćene do homogenosti i takve okarakterisane (64). Većina do sada prečišćenih amilaza su delimično prečišćeni preparati. Za prečišćavanje  $\alpha$ -amilaza insekata najčešće su korišćene taložne i hromatografske metode i to hidrofobna hromatografija, gel hromatografija i jonoizmenjivačka hromatografije (80, 81, 132).

Amilaze insekata kao i drugi digestivni enzimi, su prisutne u digestivnom traktu u veoma malim količinama. Preparativne elektroforeze su metode kojima se može dobiti čist enzimski preparat (jedna traka u gelu) korišćenjem minimalne količine polaznog materijala. Zato se često preparativne elektroforeze upotrebljavaju same za izolovanje ili kao neki od koraka u izolovanju digestivnih enzima insekata (67, 80, 133).

Afinitetno vezivanje amilaza za skrob, glikogen ili ciklodekstrinske supstrate je moguće iskoristiti kao hromatografsku metodu ili taložnu metodu. Tako je moguće izolovati određenu amilazu ( $\alpha$ ,  $\beta$  ili gluko-amilazu) upotrebom odgovarajućeg supstrata. Afinitetne hromatografije se koriste kada je na raspolaganju dovoljna količina polazanog materijala zbog velikih gubitaka tokom hromatografije, na primer za izolovanje cerealnih amilaza (134). I neke amilaze insekata su prečišćene afinitetnom hromatografijom upotrebom skroba (78) ili glikogena (135, 136) kao specifičnog liganda.

Upotreba FPLC hromatografije u prečišćavanju proteina je značajna zbog visoke rezolutivnosti i brzine. Glavna prednost se ogleda u tome što se za kraće vreme postiže znatno bolje razdvajanje proteina i naročito je značajna za razdvajanje slabo zastupljenih proteina. Može se primeniti na sve vrste hromatografija – gel hromatografiju, jonoizmenjivačku i hidrofobnu. Našla je primenu i u izolovanju amilaza (67, 128).

### 2.5.1 Osobine $\alpha$ -amilaza insekata

Prečišćene  $\alpha$ -amilaze insekata su okarakterisane i njihove osobine govore puno o filogenetskim odnosima između vrsta (64). Većina insekatskih  $\alpha$ -amilaza su jednolančani polipeptidni lanci.  $\alpha$ -amilaze jednog broja Coleoptera imaju molekulske mase od 56 do 64 kDa što je slično  $\alpha$ -amilazama drugih rodova insekata (Orthoptera, Diptera i Lepidoptera) (64). Druge Coleoptere imaju  $\alpha$ -amilaze manje molekulske mase – od 28 kDa do 36 kDa (79, 129, 137).  $\alpha$ -amilaze insekata su kiseli proteini sa pI vrednostima od 3 do 6,3 (64).

pH optimum insekatskih  $\alpha$ -amilaza se poklapa sa pH vrednostima u mestima izlučivanja u digestivnom sistemu insekata što je više puta potvrđeno eksperimentalnim određivanjem pH i amilazne aktivnosti duž srednjeg creva insekata (70, 138, 139).  $\alpha$ -amilaze tvrdokrilaca imaju pH optimum od 4,5 do 7,0 (64).

Uticaj soli na aktivnost  $\alpha$ -amilaze je detaljno ispitan prilikom karakterizacije ovog enzima iz raznih vrsta insekata. Odavno je pokazano da prisustvo  $\text{CaCl}_2$  dovodi do povećanja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze larve *T. molitor* (140), a kasnije i kod drugih vrsta insekata (70). Takođe je pokazano da prisustvo  $\text{Ca}^{2+}$  utiče na povećanje termostabilnosti amilaze (141), kao i na stabilnost tokom izloženosti ekstremnim temperaturama i pH vrednostima (127). Uticaj  $\text{Ca}^{2+}$  na aktivnost i stabilnost insekatskih amilaza je dokazan dodavanjem različitih koncentracija  $\text{CaCl}_2$  u reakcionu smešu ili uklanjanjem  $\text{Ca}^{2+}$  iz reakcione smeše helatorima (kao što je EDTA).  $\alpha$ -Amilaza insekata kao i  $\alpha$ -amilaze drugih grupa organizama je kalcijum-zavisan enzim.

U okviru karakterizacije određene  $\alpha$ -amilaze često se ispituje i uticaj inhibitora. Najzanimljiviji su inhibitori iz prirode, zato što osim direktnog uticaja na amilazu, utiču i na razviće određene insekatske vrste. Istraživanja amilaznih inhibitora imaju značajan doprinos za razvijanje metoda koje se koriste za suzbijanje štetnih insekata (142, 143). Istovremeno pružaju mogućnost za proučavanje adaptabilnosti insekata koja je jako značajna sa stanovišta njihove evolucije i fiziologije (144-146).

## 2.5.2 Inhibitori $\alpha$ -amilaza insekata

Biljke poseduju u određenom stepenu rezistentnost na razne patogene. To se ogleda u činjenici da je samo određeni broj insekata u stanju da se razvija na određenoj biljci. Rezistentnost biljaka je posledica čitavog seta odbrambrenih mehanizama koje su stekle tokom evolucije (147). Odbrambreni mehanizam biljaka uključuje različite supstancije, kao što su: antibiotici, alkaloidi, terpeni, cijanoglukozidi i neki proteini (hitinaza,  $\beta$ -1,3-glukanaza, lektini i inhibitori enzima) (148-150). Odbrana biljaka od patogena nije potpuna zato što mnoge biljke ne proizvode dovoljnu količinu supstancija koje su odgovorne za odbranu. Istovremeno insekti i mikroorganizmi se razvijaju tako da prevaziđu rezistentost biljaka.

U drvenastim biljkama razgradnjom polisaharida, amino kiselina i lipida nastaju sekundarni metaboliti kojima se brane od štetočina (111). To su na prvom mestu fenoli, zatim kumarini, tanini i lignini koji čine konstitutivnu odbranu od fitofagnih insekata. Postoji i takozvana indukovana odbrana – drvo sintetizuje odbrambrene supstancije u trenutku napada insekta. Nađeno je da se tada u beljici u parenhimskim ćelijama sintetizuje nekoliko vrsta terpenoida, smolne kiseline (izomeri abijetinske i pimarinske kiseline) i fenolnih jedinjenja (151). Neke od ovih supstancija su same po sebi toksične a neke su inhibitori digestivnih enzima ksilofagnih insekata. Uticaj ovih inhibitora nije dovoljno ispitan. Većina drvenastih biljaka koristi polisaharide za proizvodnju odbrambrenih supstancija, što dodatno osiromašuje potencijalni izvor hrane za insekte, ali istovremeno usporava rast i razviće biljke.

Inhibitori enzima deluju na ključne hidrolaze digestivnog trakta insekata, na  $\alpha$ -amilazu i proteaze. Na taj način je onemogućeno insektima da koriste hranljive materije iz biljke a samim tim je onemogućeno i njihovo razviće. Inhibitori  $\alpha$ -amilaza se mogu podeliti u dve grupe – neproteinske i proteinske inhibitore.

*Neproteinski inhibitori* – razna organska jedinjenja kao što su akarboza, izoakarboza, akarviozin-glukoza, hibiskusna kiselina i ciklodekstrini ( $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -ciklodekstrini). Ovi molekuli su ciklične strukture i po nekoliko njih se vezuju ili za katalitičko mesto  $\alpha$ -amilaze ili u neposrednoj blizini katalitičkog mesta tako da sprečavaju vezivanje supstrata. Većina neproteinskih inhibitora inhibira pored  $\alpha$ -

amilaza insekata i  $\alpha$ -amilaze mikroorganizama i pankreasnu i pljuvačnu  $\alpha$ -amilazu, osim  $\gamma$ -ciklodekstrina koji se hidrolizuje dejstvom pljuvačne i pankreasne  $\alpha$ -amilaze.

Proteinski inhibitori – nalaze se uglavnom u žitaricama (pšenica, ječam, pirinač) i leguminozama (neke vrste pasulja i boba). To su monomerni peptidi malih molekulskih masa od 5 do 13 kDa, ili dimeri od oko 26 kDa i u retkim slučajevima tetrameri sa oko 50 kDa (143). Na osnovu tercijarne strukture mogu se podeliti u šest klasa: lektinu slični, knotski tip, Kunizovi inhibitori, cerealni tip, taumatinu slični inhibitori i inhibitori slični  $\gamma$ -purotioninu. Neki od ovih inhibitora istovremeno inhibiraju amilaze i proteaze insekata.

Najviše su ispitani cerealni inhibitori, od toga inhibitori iz pšenice. Šest inhibitora iz ove klase je okarakterisano i ispitan je njihov uticaj na  $\alpha$ -amilaze iz nekoliko vrsta insekta: *Sitophilus oryzae*, *T. molitor*, *Tribolium castaneum*, *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Acanthoscelides obectus* (152-154). Većina inhibitora insekatskih  $\alpha$ -amilaza inhibiraju pored insekatskih i pljuvačnu i pankreasnu  $\alpha$ -amilazu. Tri pšenična inhibitora selektivno deluju samo na amilaze insekata (143). Pšenični inhibitori su mali monomerni i dimerni proteini koji inhibiraju  $\alpha$ -amilazu kompetitivnom inhibicijom.

Insekti uspešno prevazilaze uticaj inhibitora iz prirode. Značajan mehanizam za prevazilaženje je taj što se većina digestivnih enzima insekata nalazi u obliku izoformi. Upravo produkovanjem novih enzimskih izoformi insekti uspevaju da prevaziđu uticaj inhibitora i uspešno iskoriste veliki broj biljnih supstrata (155). Takođe insekti proizvode proteaze koje jednostavno hidrolizuju inhibitore.

### **2.5.3 Izoforme amilaza insekata**

Moguće je da svi insekti imaju kompletan sastav digestivnih enzima u količinama koje se menjaju i zavise od sastava hrane koju konzumiraju (64). Tako je  $\alpha$ -amilaza prisutna u obliku izoformnih enzima kod mnogih insekata. Nađene su po dve amilazne izoforme kod larvi eukaliptusnih tvrdokrilaca *Phoracantha semipunctata* (78) i larvi velikog žitnog moljca (*Prostephanus truncatus*) (80), tri kod malog žitnog moljca (*Rhyzopertha dominica*) (81) i četiri kod semenog žiška (*C. maculatus*) (129).

Larve paumčnog moljca (*Z. subfasciatus*) takođe imaju veći broj amilaznih izoformi, a pokazano je da konzumiranjem amilaznog inhibitora u dužem vremenskom intervalu dolazi do indukovanja novih izoformi (145).

Polifagni insekti se odlikuju velikom plastičnošću što je odavno poznato (156). Enzimske izoforme insektima služe da se uspešno adaptiraju novim hranljivim supstratima, a time i novim staništima. Može se reći da su i one, pored drugih varijabilnih fizioloških i biohemijskih parametara u insektima, merilo plastičnosti vrste.



### 3 NAŠI RADOVI

Kora i beljika drveta su kao hranljivi supstrat nepovoljni za razviće ksilofagnih larvi zbog prisustva male količine nutritivnih materija i inhibitora digestivnih enzima. Ksilofagni insekti su tokom svoje evolucije razvili čitav niz fizioloških i biohemijskih adaptacija da bi bile u stanju da naseljavaju drveće.

Gajenjem larvi bukove strižibube u laboratorijskim uslovima je pokazano da im se larveno razviće znatno skraćuje u odnosu na razviće u prirodi sa dve do tri godine na 6 do 7 meseci (40). Izučavano je ponašanje i životni ciklus adulta bukove strižibube sa reproduktivnim sposobnostima u laboratoriji (15). Značajno bi bilo pronaći uslove pri kojima se mogu dobiti reproduktivno sposobni adulti u laboratoriji, čije larve bi se koristile za biohemijska i fiziološka istraživanja. Korišćenje larvi odgajenih u laboratoriji za proučavanje digestivnih enzima bi premostilo problem male dostupnosti larvi iz prirode. Obzirom na status ugroženosti dobijanje reproduktivno sposobnih adulta u laboratorijskim uslovima bi moglo da doprinese i poboljšanju statusa ovih vrsta u prirodi.

Digestivni enzimi ksilofagnih larvi su nedovoljno proučeni, pa tako i o amilazama ksilofagnih larvi postoji mali broj podataka. Amilaza larve bukove strižibube je detektovana i opisane su neke njene karakteristike (19, 158). Bilo bi značajno detaljnije ispitati amilaze u ovim larvama, prečistiti ih i biohemijski okarakterisati. Kako je pokazano da produkcija amilaze doprinosi adaptabilnosti ovih larvi (30, 102) značajno bi bilo da se ispita da li je postoje razlike na izoenzimskom nivou u zavisnosti od hranljivih supstrata i uslova sredine gde se larva razvija.

Radi razjašnjavanja uloge  $\alpha$ -amilaze u plastičnosti i velikoj adaptabilnosti bukove i velike hrastove strižibube, kao i radi doprinošenja novim saznanjima o biohemijskoj organizaciji digestivnih procesa kod insekata iz familije Cerambycidae postavljeni su sledeći ciljevi ovog rada:

- Ispitivanje razvića bukove strižibube u laboratorijskim uslovima od jaja do reproduktivno sposobnih jedinki.
- Analiziranje amilazne aktivnosti i izoenzimskog profila larvi bukove i velike hrastove strižibube u zavisnosti od hranljivih supstrata i uslova sredine.

- Ispitivanje uticaja saharoze (kao prostog šećera) na produkciju amilaze i larveno razviće bukove strižibube.
- Izolovanje i prečišćavanje glavne izoforme amilaze larve bukove strižibube do homogenosti i biohemijska karakterizacija.
- Izolovanje i prečišćavanje glavne izoforme amilaze larvi velike hrastove strižibube upotrebom hromatografskih tehnika visoke rezolucije.

Prvi korak u obezbeđivanju dovoljne količine digestivnih enzima za istraživanja u ovom radu je gajenje larvi u laboratorijskim ulovima.

### **3.1 Gajenje strižibuba u laboratorijskim uslovima**

Gajenje insekata u laboratorijskim uslovima omogućava sagledavanje i proučavanje životnog ciklusa a takođe i omogućava praćenje uticaja hranljivih sastojaka na produkciju digestivnih enzima. Amilaza je dobar model sistem za praćenje produkcije digestivnih enzima pod uticajem hrane i spoljašnjih uslova za razviće larvi bukove i velike hrastove strižibube, jer je pokazano da se ukupna amilolitička aktivnost menja sa promenama sredine i hranljivih sastojaka.

#### **3.1.1 Gajenje bukove strižibube (*M. funereus*) u laboratorijskim uslovima**

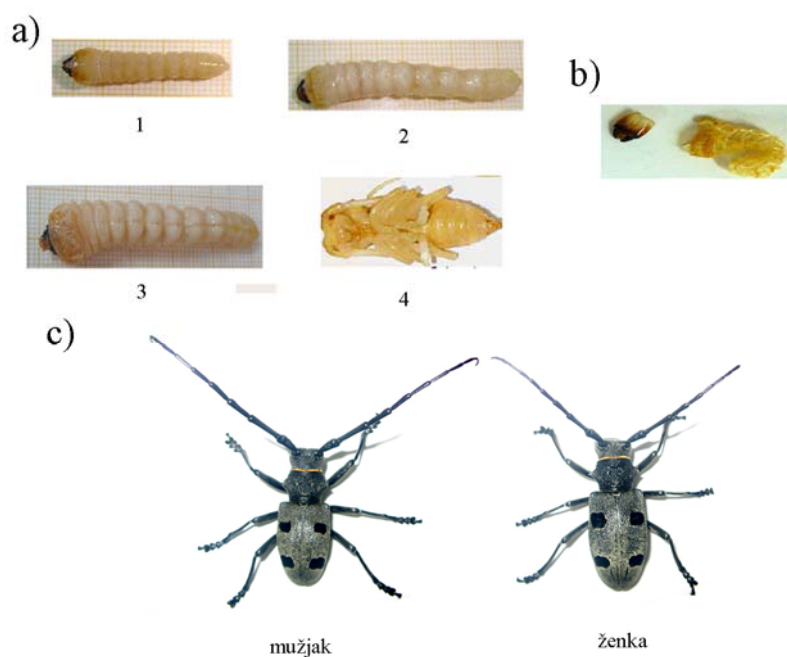
Larve bukove strižibube su gajene u laboratorijskim uslovima da bi se ispitao uticaj hranljivih sastojaka na produkciju amilaze i da bi se opisalo larveno razviće. Gajene su dve grupe larvi. Jedna je gajena od jaja dobijenih od odraslih jedinki u laboratoriji a drugu grupu su činile larve koje su donete iz prirode i zatim gajene u laboratoriji. Korišćene su dve vrste podloge za gajenje. Osnovni izvor ugljenih hidrata je bio rastvorni skrob iz kukuruza („Palenta”). Izvor proteina su bili proteini iz kukuruza („Palenta”) (159) i suvog kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae*) koji sadrži sve esencijalne amino-kiseline u zadovoljavajućoj količini (160), kao i sve potrebne vitamine i sterole neophodne za rast i razviće larvi. Pored ovih osnovnih sastojaka jedna vrsta podloge je sadržavala i saharozu dok druga nije. Larve gajene na ove dve podloge su poređene po produkciji amilaze međusobno i sa larvama razvijenim u prirodi.

##### **3.1.1.1 Larveno razviće bukove strižibube (*M. funereus*) u laboratorijskim uslovima**

Dve grupe insekata su korišćene u ispitivanjima razvića bukove strižibube. Prva grupa su bili insekti sakupljeni u proleće na Fruškoj Gori i gajeni u laboratoriji (44 adulta). Drugu grupu su činili insekti dobijeni u laboratoriji – odnosno od jaja koja su položili insekti iz prve grupe su izležene larve koje su gajene do adúlata. Ovi adulti

su imali sposobnost razmožavanja tako da je iz njihovih jaja razvijena i druga generacija aduata u laboratoriji (31 adult).

Larveno razviće bukove strižibube je praćeno na dve grupe larvi. Prva grupa su larve dobijene od jaja insekata donetih iz prirode – Prva generacija larvi gajenih u laboratoriji (31 larva). Druga grupa su larve dobijene od jaja insekata odgajenih u laboratoriji – Druga generacija larvi gajenih u laboratoriji (30 larvi). Istraživanja larvenog razvića su trajala tri godine. Na slici 13 je prikazano postembrionalno razviće bukove strižibube.



Slika 13. a) Razviće larve bukove strižibube. 1. Larva u trećem stupnju razvića, dužina larve – 2,8 cm, masa – 0,52 g. 2. Larva u četvrtom stupnju razvića, dužina larve – 4,6 cm, masa – 1,97 g. 3. Larva u petom stupnju razvića dužina larve – 5,3 cm, masa – 0,94 g. 4. Stadijum lutke. b) Košuljica koja zaostaje posle presvlaćenja larve. c) Odrasle jedinke, mužjak i ženka.

Veličina i masa larvi u različitim stadijumima razvića su prikazani na slici 13, od 1 do 3. Larve bukove strižibube se odlikuju velikom individualnošću što se ogleda u tome što masa larvi nije u direktnoj korelaciji sa larvenim stupnjom kao ni sa veličinom larve, a ni broj presvlaćenja nije jednak kod svih larvi.

Broj presvlaćenja larvi tokom larvenog razvića i vreme koje larve provode u svakom stupnju je praćeno tokom razvića. Najveći broj larvi je imalo 5 ili 6 larvenih

stupnjeva, a neke larve su imale čak 12 stupnjeva. Varijabilitet larvi tokom razvića i različit broj larvenih stupnjeva je karakteristika i drugih strižibuba (54). Većini mužjaka je potrebno više vremena (6 ili više stupnjeva) za larveno razviće nego ženkama (prosečno 5 stupnjeva). Ovaj fenomen je zabeležen i tokom larvenog razvića limunove strižibube *Oemena hirta* (50).

Hranljiva vrednost podloge koja se koristi za gajenje insekata se određuje merenjem brzine rasta, vremenom između dva presvlačenja larvi i procentom uspešnih ulutkavanja ili stepenom preživljavanja (45). Prosečno trajanje razvića larvi u laboratorijskim uslovima je prikazano u tabeli 1.

Tabela 1. Trajanje u danima embrionalnog, larvenog i stadijuma lutke larvi bukove strižibube tokom razvića u laboratorijskim uslovima prikazan za dve grupe larvi (za prvu i drugu generaciju larvi). Vrednosti za prvu i drugu generaciju između kojih postoji statistički značajna razlika po t-testu, sa intervalom tačnosti od 95%, su obeležene zvezdicom. Embrionalno razviće:  $P=0,0271$ ,  $t=2,267$ ,  $df=59$ ,  $r^2=0,08$ . Šesti stupanj larvenog razvića:  $P=0,0024$ ,  $t=3,824$ ,  $df=12$ ,  $r^2=0,55$ . Od poslednjeg presvlačenja do ulutkavanja (prva podgrupa larvi):  $P=0,0008$ ,  $t=3,735$ ,  $df=29$ ,  $r^2=0,32$ .

Stadijum larve	I generacija		II generacija	
	Sr. vrednost ± SEM	N	Sr. vrednost ± SEM	N
Embrionalno razviće (vreme potrebno za piljenje larvi iz jaja)	11,00 ± 0,4*	31	12,73 ± 0,58*	30
Prvi larveni stupanj	8,45 ± 0,53	31	10,47 ± 1,04	30
Drugi larveni stupanj	11,31 ± 1,05	29	13,73 ± 1,58	30
Treći larveni stupanj	15,52 ± 2,27	27	14,86 ± 1,63	28
Četvrti larveni stupanj	23,26 ± 4,09	27	20,96 ± 1,43	25
Peti larveni stupanj	31,00 ± 7,24	22	25,73 ± 1,68	15
Šesti larveni stupanj	22,55 ± 3,36*	11	50,33 ± 6,44*	3
Od poslednjeg presvlačenja do ulutkavanja (prva podgrupa)	72,89 ± 4,27*	9	54,77 ± 2,57*	22
Od poslednjeg presvlačenja do ulutkavanja (druga podgrupa)	132,30 ± 6,30	12	141,80 ± 6,18	6
Stadijum lutke	21,88 ± 0,84	17	22,14 ± 1,38	22

Prikazani rezultati su statistički obrađeni. Između dve ispitivane grupe larvi (prva i druga generacija) postoje statistički značajne razlike (prema t-testu) u vremenu

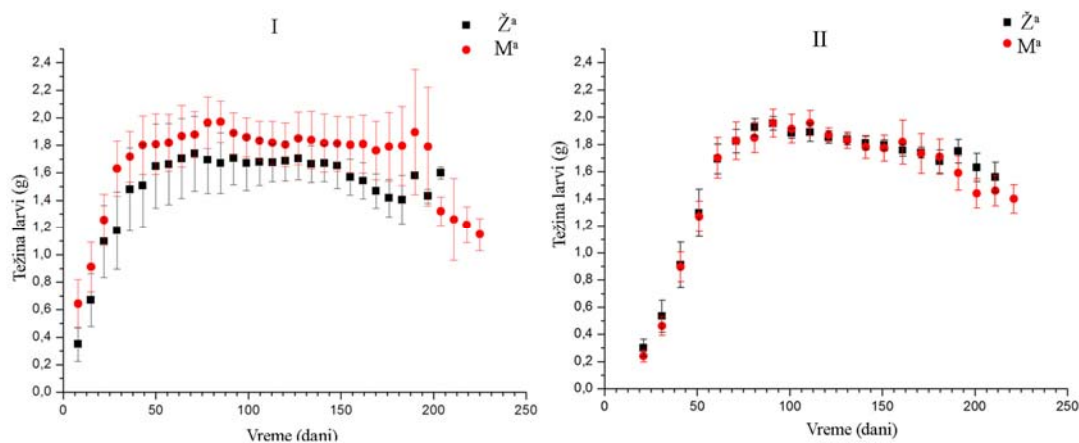
trajanja embrionalnog razvića, u trajanju šestog larvenog stupnja i poslednjeg larvenog stupnja pred ulutkavanja. Ostali larveni stupnjevi kao i stadijum lutke traju slično u obe ispitivane grupe larvi bukove strižibube. Unutar iste grupe larvi upotrebom „D’Agostinovog i Pearsonovog” testa pokazana je značajna statistička razlika između jedinki tokom trećeg stupnja razvića (\*\*\*,  $P < 0,0001$ ).

Prosečno razviće u prvoj generaciji laboratorijski gajenih larvi bukove strižibube je trajalo 218 dana, a u drugoj generaciji 226 dana. Larveno razviće većine strižibuba u prirodnim uslovima traje od 2-5 godina, što je opisano za *C. cerdo* (22), azijskog tvrdokrilca *Anoplophora glabripennis* (51) i tzv „huhu“ tvrdokrilca *Prinoplus reticularis* (52). Ne postoje literaturni podaci o razviću i uopšte o životnom ciklusu bukove strižibube u prirodi, ali se smatra da razviće u prirodi traje kao i kod drugih strižibuba od 3 do 4 godine. Dobijeni rezultat skraćanja larvenog razvića u u laboratorijskim uslovima je podudaran sa rezultatom publikovanim 1989 godine (40). Vreme potrebno za razviće insekata zavisi od broja larvenih stupnjeva, ali je i pod uticajem spoljašnjih faktora (46-48). Gajenjem drugih vrsta strižibuba u laboratoriji dobijeni su slični rezultati za trajanje larvenog razvića: za limunovu strižibubu *O. hirta* – 140 do 300 dana (50) i za belo-pegave strižibube (*Anoplophora macularia*) – 98 do 287 dana (54).

Skraćenje larvenog razvića u laboratorijskim uslovima ukazuje na to da obilje hrane (podloga za gajenje), u kombinaciji sa laboratorijskim uslovima sredine imaju pozitivan efekat na razviće larvi. Skraćenje razvića se takođe može objasniti izostankom kako biljnih inhibitora i toksina tako i mikroorganizama u hranljivoj podlozi koja se koristi u laboratoriji. Termička obrada podloge i dodatak konzervansa isključuju mogućnost inficiranja larvi mikroorganizmima, a ujedno sprečavaju i kompeticiju larvi sa mikroorganizmima za hranljivi supstrat.

Unutar obe grupe se izdvaja po jedna podgrupa larvi kojima je potrebno nešto više vremena od poslednjeg presvlačenja do ulutkavanja. To je 52% larvi u prvoj generaciji i 21% u drugoj generaciji laboratorijski gajenih larvi bukove strižibube. Ukupno vreme potrebno za razviće ovih larvi je 278 dana za prvu generaciju larvi i 313 dana za drugu generaciju larvi.

Masa larvi je merena jednom nedeljno tokom razvića. Prosečne krive mase larvi tokom razvića za obe ispitivane grupe su prikazane na slici 14. Grupe larvi koje su imale produženi poslednji stupanj larvenog stadijuma nisu prikazane na graficima.



Slika 14. Masa larvi bukove strižibube tokom razvića u laboratorijskim uslovima. Prikazane su srednje vrednosti kriva mase larvi. U grupi I (prva generacija larvi u laboratoriji) je prikazana prosečna vrednost masa od 11 ženki i 12 mužjaka. U grupi II (druga generacija larvi u laboratoriji) je prikazana prosečna vrednost masa od 8 ženki i 9 mužjaka. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  SEM. Između vrednosti za mužjake i ženke u obe grupe nema statistički značajnih razlika po ANOVA testu ( $P=0,0753$ ).

Sve larve iz druge generacije larvi gajenih u laboratoriji su imale slične mase tokom razvića, što potvrđuje i ANOVA test ( $P = 0,7897$  za ženke i  $P = 0,1115$  za mužjake). Maksimum mase je bio 1,94 g za ženke i 1,96 g za mužjake. Za razliku od njih larve iz prve generacije larvi bukovih strižibuba gajene u laboratoriji su imale veoma neujednačene mase tokom razvića. Upotrebom ANOVA testa dobijena je značajna statistička razlika između larvi u obe grupe (i ženke i mužjaci) ( $P$  value  $< 0,0001^{***}$ ). Ženke iz prve generacije postižu svoj maksimum težine (1,75 g) pre mužjaka (1,96 g). Ujednačenije mase larvi tokom razvića u drugoj generaciji se mogu tumačiti kao posledica dugotrajnog gajenja larvi u laboratorijskim uslovima. Tokom razvića primećen je gubitak mase larvi nekoliko dana pre i nekoliko dana posle kao i u danima pred ulutkavanje, što je veoma često kod skoro svih vrsta insekata (4). Neposredno pred presvlačenje, u toku presvlačenja kao i u danima pred ulutkavanje larve se ne hrane što objašnjava gubitak u masi larvi.

Smrtnost kod strižibuba koje su gajene u laboratorijskim uslovima je često vrlo visoka (54, 161, 162). Smrtnost larvi bukove strižibube tokom gajenja je bila 10,3% u prvoj generaciji gajenih larvi i 34,9% u drugoj generaciji. Larve bukove strižibube su bile najosetljivije tokom prvog larvenog stupnja i u stadijumu lutke. Od svih uginulih larvi u prvom stadijumu je uginulo 38,8% larvi u prvoj generaciji i 26,7% u drugoj generaciji. U tom stupnju razvića larve su najosetljivije na svaku promenu u okruženju (4). U stadijumu lutke je uginulo 35,5% u prvoj generaciji i 16,7% u drugoj generaciji. Tokom stadijuma lutke dešavaju se intenzivne morfološke promene kod insekata koje su genetski determinisane.

Postoji mali broj radova u kojima su dobijeni reproduktivno sposobni adulti strižibuba u laboratorijskim uslovima (50, 163). Tokom ovih istraživanja dobijena je druga generacija reproduktivno sposobnih adulta bukove strižibube. Znači da korišćena hranljiva podloga sadrži sve supstancije neophodne za kompletno razviće.

### **3.1.2 Gajenje velike hrastove strižibube (*C. cerdo*) u laboratorijskim uslovima**

Larve velike hrastove strižibube su gajene u laboratoriji da bi se ispitao uticaj hranljivih sastojaka na produkciju amilaze. Larve su gajene na istoj podlozi koja je korišćena za gajenje bukove strižibube. Korišćena je jedna vrsta podloge koja je sadržavala kukuruznu palentu, kvasac i saharozu. Gajene su larve koje su donete iz prirode pa prebačene na hranljivu podlogu.

Larve su gajene u toku dve godine i zabeleženo je ukupno šest presvlačenja larvi, ali se nijedna larva nije ulutkala, što ukazuje na to da korišćena podloga ne sadrži sve supstance neophodne za kompletno razviće velike hrastove strižibube. Međutim sa druge strane gajenjem na istom hranljivom supstratu dobijene su larve dve evolutivno bliske vrste insekata (bukove i velike hrastove strižibube) koje se mogu lako porediti po produkciji digestivne  $\alpha$ -amilaze.



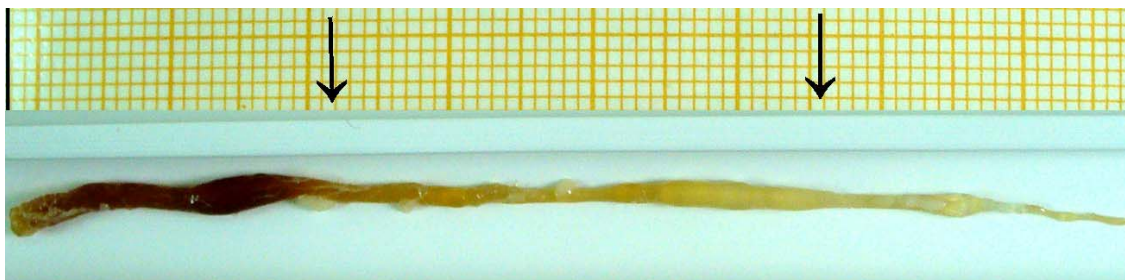
### **3.1.3 Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi bukove (*M. funereus*) i velike hrastove strižibube (*C. cerdo*)**

Larve su žrtvovane u skladu sa zahtevima Etičkog komiteta Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Na isti način su žrtvovane sve ispitivane grupe larvi bukove strižibube i velike hrastove strižibube. Larve sakupljene u prirodi su žrtvovane po donošenju tokom svog petog ili šestog larvenog stupnja što je određeno na osnovu njihove veličine, a larve gajene u laboratoriji su žrtvovane tokom šestog larvenog stupnja. Larve su pre dekapitacije bile na ledu do vidljivog smanjena aktivnosti. Nakon dekapitacije srednje crevo je disecirano na ledu.

Creva su homogenizovana u ohlađenom avanu sa tučkom, u fiziološkom rastvoru natrijum acetatnog pufera pH 6,0 u odnosu 1:2 (m/V), uz dodatak silika-gela u odnosu 1:0,3 prema masi creva (m/m). Nakon homogenizacije, ekstrakcija je trajala 90 minuta na hladno. Dobijeni ekstrakti su centrifugirani 10 minuta na 10000 x g. Talog nakon centrifugiranja je reekstrahovan istim puferom u odnosu 1:2 (m/V) 60 minuta na hladno. Dobijeni ekstrakt i reekstrakt su spojeni. Ekstrakti koji su korišćeni za izolovanje amilaze su odmašćeni dodatkom iste zapremine ugljentetrahlorida (CCl<sub>4</sub>). Odmašćivanje je ponovljeno tri puta, a dobijeni bistri supernatanti su odvađeni i čuvani na -20°C do upotrebe.

### **3.1.4 Određivanje pH vrednosti i amilazne aktivnosti duž srednjeg creva larve bukove strižibube (*M. funereus*)**

Crevo larve bukove strižibube je podeljeno na 3 dela (prednji deo srednjeg creva, srednji deo srednjeg creva i zadnji deo srednjeg creva). Na slici 15 je prikazano crevo larve bukove strižibube sa naznačenim mestima sečenja.



Slika 15. Srednje crevo larve bukove strižibube. Strelice pokazuju mesta sečenja creva prilikom određivanja pH i amilazne aktivnosti duž creva.

Svakom delu je dodata prokuvana destilovana voda u odnosu 1:2 (m/V), usitnjeno je i homogenizovano. pH vrednost svakom ekstraktu je određena univerzalnom pH indikatorskom hartijom, a amilazna aktivnost određena upotrebom 1% skroba metodom po Bernfeldu (113). Izmerene su sledeće pH vrednosti:

- prednji deo srednjeg creva – 5,5 – 6,0
- srednji deo srednjeg creva – 8,0 – 8,5
- zadnji deo srednjeg creva – 8,5 – 9,0

Slične pH vrednosti lumena prednjeg dela srednjeg creva su nađene i kod kafenog moljca (*Hypothenemus hampei*) – prednji deo 4,5 do 5,5 (144) i semenog žižka (*C. maculatus*) – prednji deo 5,6 do 6,2 (164). Amilazna aktivnost je detektovana samo u prednjem delu srednjeg creva larvi bukove strižibube, dok u srednjem i zadnjem delu nije bilo amilazne aktivnosti. I kod drugih insekata je amilaza detektovana takođe samo u prednjem delu srednjeg creva (65-67).

### 3.2 $\alpha$ -Amilaza larve bukove strižibube (*M. funereus*)

Larve bukove strižibube analizirane u laboratorijskim uslovima su korišćene za poređenje amilaznih aktivnosti i izoamilaznog profila sa larvama koje su se razvijale u prirodnim uslovima. Na taj način je ispitan uticaj hranljivog supstrata i uslova sredine na produkciju amilaze.

#### 3.2.1 Uporedna analiza amilaza larvi bukove strižibube (*M. funereus*) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji

Amilazna aktivnost je određivana upotrebom dintrosalicilne kiseline (DNS) (119) koristeći rastvorni skrob kao supstrat (1%). Jedna jedinica  $\alpha$ -amilazne aktivnosti je količina enzima koja produkuje 1  $\mu$ mol maltoze u minutu na 35°C. U sirovim ekstraktima su određene i koncentracije proteina metodom po Bradfordu (1976) (165), na osnovu kojih je izračunata specifična  $\alpha$ -amilazana aktivnost. Rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Amilazna aktivnost, koncentracija proteina i specifična amilazna aktivnost u sirovim ekstraktima srednjeg creva larvi bukove strižibube razvijenih u prirodi i u laboratoriji. Svaka vrednost predstavlja srednju vrednost tri merenja  $\pm$  SEM.

Grupa larvi	Amilazna aktivnost (U/mL)	Koncentracija proteina (mg/mL)	Specifična aktivnost (U/mg proteina)
Larve iz prirode	62,16 $\pm$ 1,87	11,05 $\pm$ 0,43	5,62 $\pm$ 0,21
Prva generacija laboratorijskih larvi	50,52 $\pm$ 1,03	4,30 $\pm$ 0,19	11,63 $\pm$ 0,46
Druga generacija laboratorijskih larvi	50,52 $\pm$ 1,07	4,92 $\pm$ 0,17	10,27 $\pm$ 0,34

Larve bukove strižibube koje su sakupljene iz prirode imaju veću amilaznu aktivnost od larvi koje su gajene u laboratoriji. Manja ukupna amilazna aktivnosti kod gajenih larvi je dobijena i u ranijim istraživanjima (39, 40). U srednjim crevima prve i druge generacije laboratorijskih larvi je određena približno ista  $\alpha$ -amilazna aktivnost.

Koncentracija proteina u ekstraktima srednjeg creva je dva puta veća kod larvi iz prirode nego kod larvi gajenih u laboratoriji. Poređenjem specifičnih amilaznih aktivnosti uočava se da larve gajene na podlozi koja sadrži skrob proizvode veću količinu amilaze u odnosu na larve koje se hrane prirodnim supstratom.

### **3.2.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi i SDS PAGE**

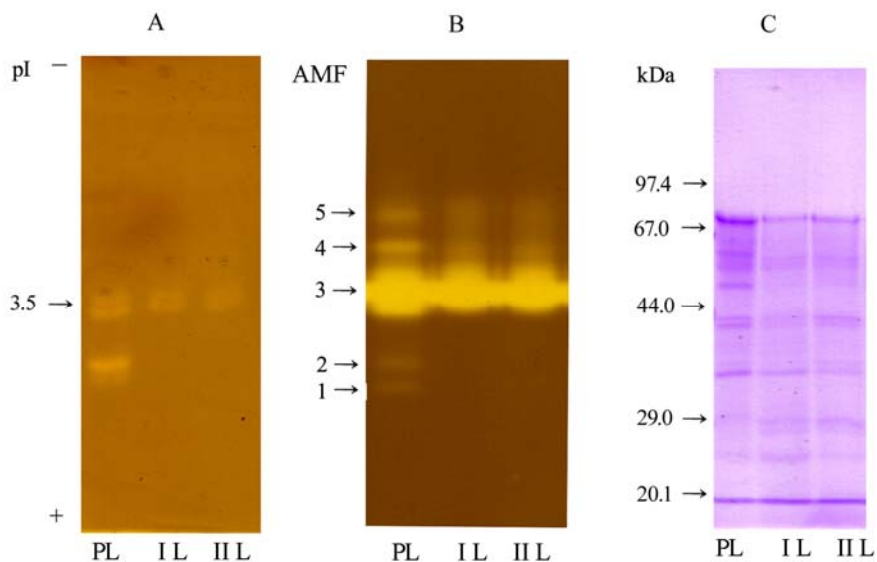
Amilaze su analizirane zimogramskim tehnikama nakon elektroforetskog razdvajanja sirovih ekstrakata srednjeg creva larvi bukove strižibube. Ekstrakti su razdvajani nativnom PAGE (4/10 sistem) po Davis-u (1964) (166) i izoelektričnim fokusiranjem (IEF). IEF – om su proteini razdvajani u kiselom pH opsegu od 2,5-4,5. Kao pI standard je korišćen pI kit sa proteinima malih pI vrednosti (GE Healthcare). Gelovi su potapani u rastvor 1% rastvornog skroba u puferu pH 5 koji sadrži 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> i 2 mM NaCl i inkubirani na 30°C. Zatim su inkubirani u puferu takođe na 30°C. Amilazne trake su vizuelizovane bojenjem gela jednim rastvorom.

Proteini ekstrakata srednjeg creva larvi su analizirani SDS PAGE-om koristeći Laemmlijevu (1970) (167) metodu i rezultati su prikazani na slici 16C. Kao molekularni markeri su korišćeni proteini LMW-SDS marker kita, GE Healthcare. Rezultati elektroforetskog ispitivanja ekstrakta larvi bukove strižibube su prikazani na slici 16.

U sirovim ekstraktima srednjeg creva larvi bukovih strižibuba sakupljenih u prirodi je nađen najveći broj amilaznih izoformi. Zimogramom posle IEF-a su detektovane po dve izoforme sa pI vrednostima oko 3,5 u ekstraktima dobijenim od larvi gajenih u laboratoriji, dok su u ekstraktu dobijenom od larvi iz prirode detektovane još dve izoforme nižih pI vrednosti, što se vidi na slici 16A.

Zimogramom posle native PAGE su u ekstraktima dobijenim od larvi gajenih u laboratoriji detektovane 3 izoforme, od kojih je jedna glavna (AMF-3), dok ekstrakt dobijen od larvi iz prirode sadrži još dve izoforme veće pokretljivosti, ukupno pet (AMF 1 – AMF 5) što se vidi na slici 16B. Manji broj amilaznih izoformi je u skladu sa dobijenom manjom ukupnom amilaznom aktivnošću kod larvi gajenih u laboratoriji. Pokazano je da ne postoje razlike u broju i položaju amilaznih izoformi između prve i druge generacije larvi gajenih u laboratoriji. Različit broj izoformi je

rezultat prilagođavanja larvi bukove strižibube na uslove sredine u kojoj se razvija kao i na tip hrane koju koristi.



Slika 16. Elektroforetsko razdvajanje sirovih ekstrakata srednjeg creva larvi bukove strižibube. PL – sirovi ekstrakt srednjeg creva larvi uzetih iz prirode, I L – sirovi ekstrakt srednjeg creva prve generacije larvi gajenih u laboratoriji, II L – sirovi ekstrakt srednjeg creva druge generacije larvi gajenih u laboratoriji. A) Zimogramska detekcija amilaze posle IEF-a, na položaju pI je označeno mesto pI markera. B) Zimogramska detekcija amilaze posle native PAGE, AMF traka označava položaje amilaznih izoformi. C) SDS PAGE proteina sirovih ekstrakata srednjeg creva larvi, na položaju kDa su označeni položaji molekulskih masa standardnih proteina.

Produkcija različitog broja amilaznih izoformi upotrebom različitih hranljivih supstrata je pokazana na larvama meksičkog pasuljevog žiška *Z. subfasciatus* i *R. dominica* (130, 146). Ova indukcija izoformi je posledica prevazilaženja postojanja amilaznih inhibitora koji su bili prisutni u hrani. To je kasnije i potvrđeno dodatkom amilaznog inhibitora u hranu larvama (145). Produkcija većeg broja amilaznih izoformi larvi bukove strižibube koje su se razvijale u prirodi je posledica različitog sastava hrane i samo razviće nije bilo u konstantnim uslovima, kao kod larvi koje su se razvijale u laboratoriji. Moguće je da je to i posledica prevazilaženja uticaja nekih

inhibitora prisutnih u beljici stabla, što bi se dodatnim eksperimentima moglo potvrditi.

Manje ukupnih proteina je nađeno u ekstraktima srednjih creva larvi gajenih u laboratoriji (i u prvoj i u drugoj generaciji) nego u ekstraktima srednjeg creva larvi iz prirode (tabela 2) i drugačiji je proteinski profil dobijen pomoću SDS PAGE (slika 16C). To znači da pojedine komponente hrane i promene uslova sredine utiču na produkciju i drugih digestivnih enzima u srednjem crevu a ne samo amilaze. Ovi rezultati su u korelaciji sa radovima na bukovoј strižibubi gde je pokazano da se proteinski profili razlikuju u zavisnosti od različitih hranljivih podloga korišćenih za gajenje (168), a sa rezultatima dobijenih kod drugih insekata (64). Tripsinu slični enzimi su prisutni u srednjem crevu larve bukove strižibube koje su gajene na ovoj hranljivoј podlozi (169), dok ih u larvama razvijenim u prirodi ima samo u tragovima (170).

Larve bukove strižibube su u ovom radu korišćene za ispitivanje uticaja tipa šećera koji konzumiraju na larveno razviće i produkciju amilaze.

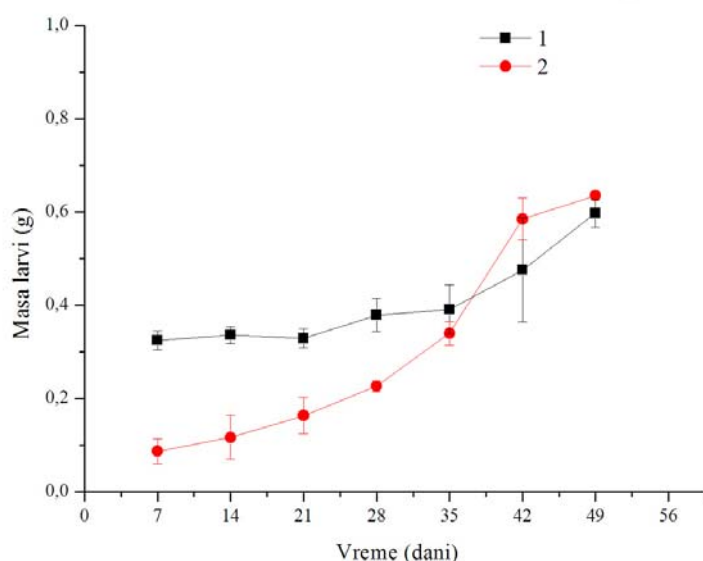
### **3.2.3 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće i produkciju amilaze larve bukove strižibube (*M. funereus*)**

Saharoza je stimulator za uzimanje hrane (fagostimulator) mnogih fitofagnih insekata (171). Saharoza je uz sorbitol najzastupljeniji oblik transportnog šećera u biljkama. Nalazi se u beljici stabla, u floemu živih stabala (113). U radu gde je ispitan uticaj ugljenih hidrata na konzumiranje hrane, rast i preživljavanje larvi korenovog žiška *Hylobius transversovittatus* pokazano je da je smrtnost larvi u prvom stadijumu znatno veća kod larvi koje nisu konzumirale saharozu od onih koje jesu (172). Iz skroba larve dobijaju neophodnu glukozu kroz nekoliko hidrolitičkih koraka. Prisustvo jednostavnih šećera u hrani (kakva je saharoza) omogućilo bi larvama da u manje koraka dođu do glukoze. Da li to utiče na produkciju amilaze? Larve bukove strižibube su se već pokazale kao dobar model sistem za ispitivanje uticaja hranljivog supstrata na rast i na produkciju digestivnih enzima i pokazale veliku sposobnost adaptacije na promene u kratkom vremenskom periodu (173). U ovom radu je ispitan uticaj saharoze na razviće bukove strižibube, a takođe i uticaj saharoze na produkciju

digestivne amilaze tokom razvića jedne iste generacije larvi koje su se razvijale na drvnom supstratu u prirodnim uslovima, pa zatim prebačene na drugi tip ishrane u laboratorijskim uslovima. Larve bukove strižibube sakupljene u prirodi tokom proleća (aktivni period) su podeljene u dve grupe i gajene na hranljivoj podlozi. Prva grupa larvi je prebačena na podlogu koja je pored kukuruznog skroba („Palenta”) i kvasca sadržavala i saharozu (1). Druga grupa larvi je gajena na istoj podlozi ali bez saharoze (2).

### 3.2.3.1 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće larve bukove strižibube (*M. funereus*)

Larveno razviće u obe grupe larvi koje su prebačene na hranljive supstrate i gajene u laboratoriji je praćeno merenjem mase larvi na svakih sedam dana, a rezultati su prikazani na slici 17.



Slika 17. Mase larvi bukove strižibube gajenih na hranljivim podlogama sa saharozom i bez saharoze. Krive predstavljaju uprosečene vrednosti masa larvi u određenoj grupi i prikazane su kao vrednost  $\pm$  SEM. 1 – Larve gajene na podlozi sa saharozom, 2 – Larve gajene na podlozi bez saharoze.

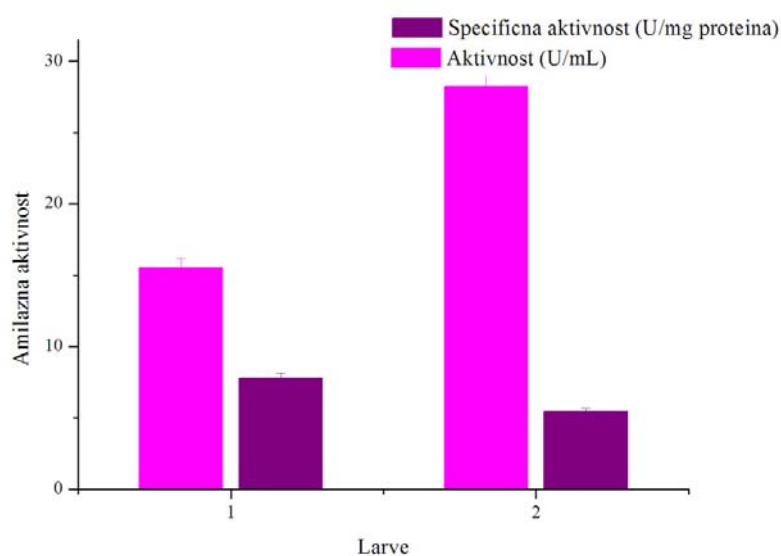
Larve koje nisu konzumirale saharozu su u prvim fazama razvića bile manje mase od larvi na saharozi, ali je njihov napredak intenzivniji. Larve koje nisu

konzumirale saharozu tokom razvića u laboratorijskim uslovima su se brže razvijale i postigle su veće mase od larvi koje su konzumirale saharozu u hranljivoj podlozi. Obe grupe larvi beleže nagli porast mase posle 35 dana provedenih na hranljivom supstratu pri čemu larve koje su se razvijale bez saharoze postižu veće mase.

Moglo bi se zaključiti da saharozu ne deluje fagostimulatorno na larve bukove strižibube zato što i larve koje nisu hranjene supstratom sa saharozom napreduju i to čak intenzivnije od larvi koje su konzumirale saharozu.

### 3.2.3.2 Ispitivanje uticaja saharoze na produkciju amilaznih izoformi larve bukove strižibube (*M. funereus*)

Larve su žrtvovane posle 49 dana gajenja u laboratoriji kada su dostigle masu od 1,2 do 1,6 g. Srednja creva su homogenizovana a u dobijenim ekstraktima su određene aktivnost  $\alpha$ -amilaze, koncentracija proteina i izoamilazni profili zimogramom posle nativne PAGE i IEF-a. Rezultati za amilaznu aktivnost i specifičnu amilaznu aktivnost su prikazani na slici 18.

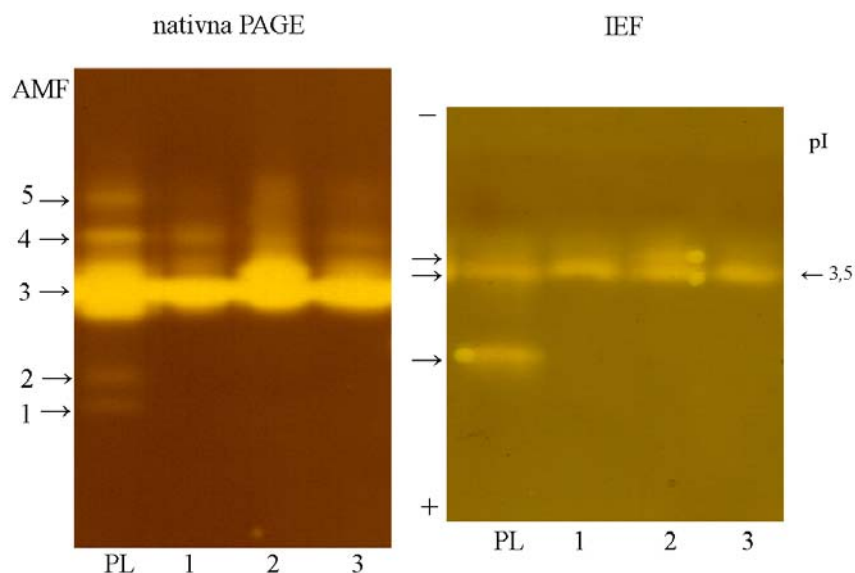


Slika 18. Amilazna aktivnost i specifična aktivnost u ekstraktima srednjeg creva larvi bukove strižibube u zavisnosti od prisustva saharoze u podlozi za gajenje. 1- Larve gajene na podlozi sa saharozom, 2- Larve gajene na podlozi bez saharoze.



Larve koje nisu konzumirale saharozu su imale veću amilaznu aktivnost u digestivnom traktu. Kod ovih larvi je i produkcija ukupnih proteina veća nego kod larvi koje su konzumirale saharozu tako da je specifična amilazna aktivnost manja. Iz rezultata prikazanih na slici 18 se može zaključiti da odsustvo saharoze u hranljivim podlogama indukuje veću produkciju amilaze u srednjem crevu larvi bukove sztrižibube.

Da bi se utvrdilo da li postoje razlike u broju i intenzitetu amilaznih izoformi dve ispitivane grupe larvi ekstrakti srednjeg creva su zimogramski poređeni međusobno i sa ekstraktima larvi koje su se razvijale na drvnom supstratu u prirodi, a rezultati su prikazani na slici 19.



Slika 19. Zimogramska detekcija amilaze u ekstraktima larvi bukovih strižibuba gajenih na različitim supstratima. PL – Larve sakupljene iz prirode, 1- Larve gajene na podlozi sa saharozom, 2- Larve gajene na podlozi bez saharoze. Strelice označavaju položaje amilaznih izoformi. pI označava položaj pI markera.

Izoamilazni profil larvi koje nisu konzumirale saharozu (traka 2, slika 19) je sličniji izoamilaznom profilu larvi iz prirode (PL na slici 19) po intenzitetu izoforme AMF-3. Kod larvi koje su konzumirale saharozu (traka 1, slika 19) amilazna izoforma AMF-3 je slabijeg intenziteta. Izoforma AMF-5 je intenzivnija u ekstraktu larvi koje

nisu konzumirale saharozu (traka 2 na slici 19). AMF-1 i AMF-2 su prisutne samo u ekstraktima larvi iz prirode (traka PL na slici 19).

Detekcijom izoformi posle IEF-a uočavaju se po dve trake u sve tri ispitivane grupe larvi na položaju koji odgovara pI 3,5. U ekstraktima larvi koje nisu konzumirale saharozu se uočavaju dve trake jednakih intenzita (traka 2 na slici 19IEF), dok se u ekstraktima druge dve grupe larvi detktuje jedna jača i jedna slabija amilazna izoforma (trake PL i 1 na slici 19IEF). PL ekstrakt sadrži i izoformu kiselije pI vrednosti koja nije prisutna kod larvi koje su prenete na veštački supstrat.

Produkcija amilaznih izoformi larvi bukove strižibube zavisi od hranljivog supstrata a takođe i od vrste šećera koju larva konzumira. Može se reći da odsustvo saharoze iz hranljivog supstrata indukuje produkciju amilaze kod larvi bukove strižibube. Dobijeni rezultat je u skladu sa pretpostavkom da kada larve konzumiraju saharozu brže dolaze do glukoze, te da im je veći broj amilaznih izoformi u ovakvim uslovima verovatno nepotreban.

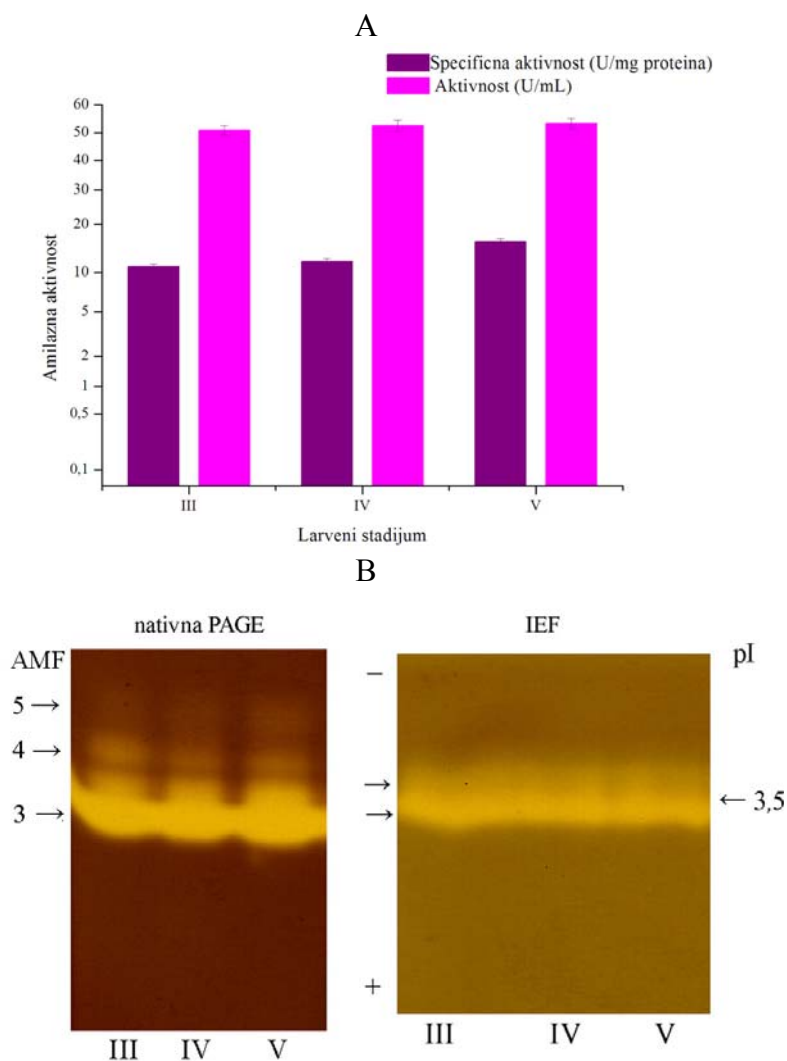
Prikazani rezultati pokazuju da su larve bukove strižibube produkovanjem različitih izoformi amilaze adaptabilnije i sposobnije da se prilagode novim uslovima sredine i hranljivim supstratima.

Da li i tokom razvića larvi dolazi do promene u produkciji amilaze u digestivnom traktu? Da bi se na ovo odgovorilo larve bukove strižibube su gajene od piljenja iz jaja u laboratoriji na hranljivoj podlozi do različitih larvenih stupnjeva kada im je ispitivana zastupljenost amilaza u digestivnom sistemu.

#### **3.2.4 Analiza amilaze larvi bukove strižibube (*M. funereus*) tokom larvenog razvića**

Larve su od piljenja iz jaja gajene na podlozi koja je sadržavala kukuruzni skrob („Palentu“), suvi kvasac i saharozu kao osnovne izvore hranljivih materija, do ulaska u drugi larveni stadijum, kada su prebačene na podlogu bez saharoze, kako bi se postigla indukcija većeg broja amilaznih izoformi. U trenutku žrtvovanja podeljene su u tri grupe: Prva grupa larvi je bila u III larvenom stadijumu, druga u IV, a treća u V larvenom stadijumu. Dobijenim ekstraktima srednjeg creva je određivana ukupna i specifična amilazna aktivnost, a amilazne izoforme su analizirane zimogramskim

bojenjem gelova posle nativne PAGE i IEF-a. Rezultati su prikazani na slici 20A i 20B.



Slika 20. Analiza produkcije amilaze tokom razvića larvi bukove strižibube. A Histogram ukupne i specifične amilazne aktivnosti u III, IV i V stupnju larvenog razvića. B Zimogramska detekcija amilaznih izoformi u III, IV i V stadijumu razvića. Strelice označavaju položaje izoformi.

Sa slike 20A se uočava da se amilazna aktivnost tokom razvića larvi blago povećava (III – 50,88; IV – 52,59 i V – 53,41 U/mL). Povećanje amilazne aktivnosti, naročito između IV i V larvenog stupnja, je uočljivije kada se posmatra specifična amilazna aktivnost (III – 10,96; IV – 11,90 i V – 15,90 U/mg proteina).

Analizom zimografske detekcije je zaključeno da nema promene u broju amilaznih izoformi tokom razvića larve bukove strižibube. Posle native PAGE se uočava da se tokom larvenog razvića pojačava intenzitet AMF-5 izoforme. U IEF gelu su prisutne dve izoforme sa pI vrednostima oko 3,5.

Nivo produkcije  $\alpha$ -amilaze se tokom razvića blago povećava što je pokazano određivanjem amilazne aktivnosti u ekstraktima srednjeg creva i povećanjem intenziteta AMF-3 u izoamilaznim profilima sa povećanjem starosti larve.

U ovom radu je detektovano 5 amilaznih izoformi kod larvi bukove strižibube koje su se razvijale na prirodnim supstratima i pokazano je da izoamilazni profil zavisi od tipa hranljivog supstrata i uslova sredine. Interesantno je bilo ispitati amilaznu aktivnost i izoamilazni profil larvi velike hrastove strižibube u poređenju sa amilazama larvi bukove strižibube obzirom na filogenetsku bliskost ove dve vrste i na to da koriste različite supstrate u ishrani. Larve velike hrastove strižibube na svom putu nailaze na delove drveta koji sadrže sve manje i manje skroba, za razliku od larvi bukove strižibube koje se razvijaju u delovima drveta sa najvećom koncentracijom skroba. Takođe se ovi različiti supstrati razlikuju i po prisustvu drugih supstancija koje su potencijalni amilazni inhibitori. Značajno bi bilo da se pokaže da li postoji veza između  $\alpha$ -amilaze i polifagnosti kao parametra plastičnosti larvi velike hrastove strižibube.

### 3.3 $\alpha$ -Amilaza larve velike hrastove strižibube (*C. cerdo*)

Ispitivanje produkcije amilaze larvi velike hrastove strižibube je obuhvatilo tri grupe larvi, kako bi se ispitaio uticaj hranljivog supstrata i uslova spoljašne sredine na njenu produkciju. Prva grupa larvi su bile larve razvijene u prirodi i žrtvovane tokom marta meseca – odnosno tokom proleća kada je aktivnost larvi najveća (ML – martovske larve). Drugu grupu larvi su činile larve koje su sakupljene iz prirode tokom septembra meseca – tokom jeseni kada je aktivnost larvi značajno smanjena (SL – septembarske larve). Treća grupa larvi velike hrastove strižibube su bile larve koje su u martu sakupljene iz prirode, a zatim gajene na istoj hranljivoj podlozi koja je korišćena i za gajenje larvi bukove strižibube u laboratorijskim uslovima – podloga sa kukuruznim skrobom („Palenta”), suvim kvascem i saharozom (LL – laboratorijske larve).”

#### 3.3.1 Uporedna analiza amilaza larvi velike hrastove strižibube (*C. cerdo*) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji

Tabela 3. Amilazna aktivnost, koncentracija proteina i specifična amilazna aktivnost u sirovim ekstraktima srednjeg creva larvi velike hrastove strižibube sakupljenih u prirodi i gajenih na veštačkoj podlozi u laboratorijskim uslovima. ML – martovske larve, SL – septembarske larve, LL – laboratorijske larve. Sve vrednosti prikazane u tabeli su srednja vrednost od tri merenja  $\pm$  SEM.

	Amilazna aktivnost (U/mL)	Koncentracija proteina (mg/mL)	Specifična aktivnost (U/mg proteina)
ML	24,14 $\pm$ 0,97	11,54 $\pm$ 0,43	2,09 $\pm$ 0,07
SL	9,06 $\pm$ 0,23	10,58 $\pm$ 0,34	0,86 $\pm$ 0,02
LL	35,53 $\pm$ 1,27	7,84 $\pm$ 0,23	4,53 $\pm$ 0,19

ML i SL su sakupljene na Fruškoj Gori sa hrastovih ležaka i panjeva i žrtvovane su odmah, a LL posle određenog perioda provedenog u laboratoriji do postizanja pogodne mase za žrtvovanje. Pripremljeni su ekstrakti srednjeg creva, u kojima su određene ukupna amilazna aktivnost i specifična aktivnost a rezultati su prikazani u tabeli 3.

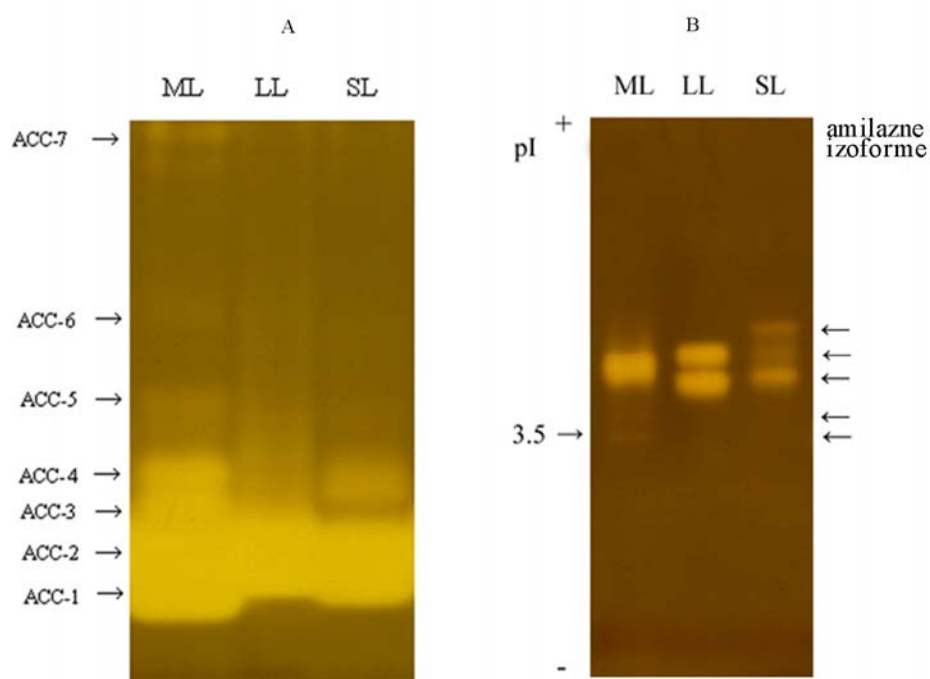
Vidi se da postoji značajna razlika u amilaznim aktivnostima između ML i SL larvi. Veća  $\alpha$ -amilazna aktivnost kod ML larvi je u skladu sa većom aktivnošću larvi tokom proleća, a time i sa intenzivnijim unosom hrane nego tokom jeseni. Najveću amilaznu aktivnost imaju larve gajene u laboratoriji u konstantnim uslovima, koji im omogućavaju konstantno uzimanje hrane tokom čitave godine i svakako veću aktivnost s'obzirom na to da larve rastu na hranljivoj podlozi. Na ovaj način su izbegnute sezonske promene u prirodi od kojih su među najznačajnijim promene temperature. Već je pokazano da amilazna aktivnost larvi velike hrastove strižibube zavisi od temperature i da je maksimalna na 35°C, odnosno da je amilaza najaktivnija tokom leta kada je srednja temperatura u supkortikalnoj zoni od 27°C do 31°C (102).

Da bi se pokazalo da li postoje razlike između izoamilaznih profila ispitivanih grupa larvi velike hrastove strižibube, ekstrakti su analizirani zimogramski.

### 3.3.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi

Amilazne izoforme ekstrakta srednjeg creva tri grupe (ML, SL i LL) larvi velike hrastove strižibube su detektovane i analizirane zimogramom posle native PAGE i IEF-a, a rezultati su prikazani na slici 21.

Zimogramom posle native PAGE je detektovano 7 izoformi u ekstraktu ML – amilaza *Cerambyx cerdo* (ACC) od 1 do 7. U ekstraktu SL je detektovano 6 izoformi (ACC od 1 do 6) od kojih su skoro sve slabijeg intenziteta od izoformi iz ekstrakta ML. ACC-4 je, pored toga što je slabijeg intenziteta, i veće pokretljivosti u SL ekstraktu. U ekstraktu LL je detektovan najmanji broj izoformi (dve – intenzivna ACC-2 i ACC-4 slabijeg intenziteta). Uočava se da je u svim ekstraktima najjačeg intenziteta izoforma ACC-2. Iako je kod larvi koje su gajene u laboratoriji najveća amilazna aktivnost, u ovim ekstraktima je detektovan najmanji broj izoformi.



Slika 21. Zimogramska detekcija amilaze u ekstraktima larvi velikih hrastovih strižibuba. A – Zimogram posle native PAGE. Strelice označavaju položaje amilaznih izoformi ACC – amilaza *Cerambyx cerdo*. B – Zimogram posle IEF-a. Strelice označavaju položaje amilaznih izoformi. Kolona pI označava položaj pI markera. ML – martovske larve, SL – septembarske larve, LL – laboratorijske larve

Razlike u amilaznim izoformama između ispitivanih larvi velike hrastove strižibube su detektovane i u zimogramu posle IEF-a, što se vidi na slici 21B. U ML ekstraktu je detektovana jedna intenzivna amilazna izoforma i još dve izoforme slabijeg intenziteta. U SL uzorku su detektovane tri izoforme sličnog intenziteta i na položajima bliskim glavnoj izoformi u ML ekstraktu. U LL ekstraktu su detektovane dve izoforme istog intenziteta na bliskim položajima (174).

Sve amilazne izoforme larvi velike hrastove strižibube imaju pI vrednosti manje od 3,5.  $\alpha$ -Amilaza larve velike hrastove strižibube je slične pI vrednosti kao  $\alpha$ -amilaze drugih strižibuba (64).

Može se zaključiti da se različite amilazne izoforme proizvode u zavisnosti od hranljivih sastojaka koje konzumiraju larve i od temperature na kojoj se razvijaju. Razlike u izoamilaznim profilima martovskih i septembarskih larvi potiču od uticaja temperature, ali i od različitog metabolizma drveta u ova dva godišnja doba, pa tako i larve ne konzumiraju isti tip hranljivih supstrata. Moguće je da se drvena masa tokom

marta i septembra razlikuje i po sadržaju inhibitora amilaza. A na veštačkoj hranljivoj podlozi larve konzumiraju škrob i saharozu kao izvor ugljenih hidrata i nisu u kontaktu sa inhibitorima koji su prisutni u drvetu. Sa ove tačke gledišta produkcovanje najmanjeg broja amilaznih izoformi kod ovih larvi je potpuno opravdano. Ovi podaci potvrđuju da su larve velike hrastove strižibube veoma adaptivna vrsta, a da se to odražava i na nivou produkcije amilaze i broja amilaznih izoformi.

Poređenjem izoamilaznih profila larvi velike hrastove strižibube i larvi bukove strižibube uočava se da larve velike hrastove strižibube proizvode veći broj amilaznih izoformi, što se može tumačiti time što koriste različite supstrate u ishrani. Poređenjem položaja u IEF gelu vidi se da su amilaze kod obe vrste sličnih pI vrednosti, što je posledica evolutivne bliskosti dve vrste. Kod obe vrste je pokazano da izoamilazni profil zavisi od hranljivog supstrata i uslova sredine što potvrđuje ulogu  $\alpha$ -amilaze u polifagnosti odnosno plastičnosti ove dve vrste.

Karakterizacijom digestivnih enzima insekata se dobijaju vrlo značajni podaci kako o filogenetskoj sličnosti grupa insekata i njihovoj evoluciji, tako i o samom procesu varenja. Da bi se jedan enzim okarakterisao potrebno ga je prvo prečistiti do homogenosti.



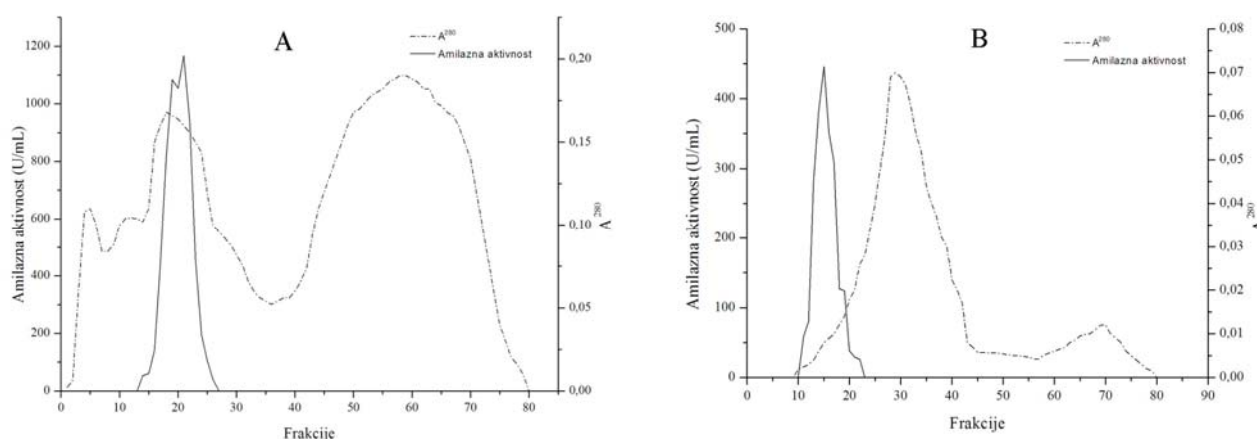
### 3.4 Prečišćavanje i karakterizacija glavne izoforme $\alpha$ -amilaze (AMF 3) srednjeg creva larve bukove strižibube (*M. funereus*)

Za prečišćavanje digestivne  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube korišćene su dve hromatografske tehnike, gel hromatografija koja razdvaja proteine po veličini i jonoizmenjivačka hromatografija koja razdvaja proteine po naelektrisanju.

Zbog ograničene količine polaznog materijala i male količine enzima u ekstraktima srednjeg creva, bilo je neophodno izabrati pogodne tehnike za izolovanje AMF-3 u kojima se gubitak enzima svodi na minimum.

#### 3.4.1 Gel hromatografija

Glavna izoforma  $\alpha$ -amilaze (AMF-3) je prečišćena do homogenosti iz larvi bukove strižibube koje su sakupljene u prirodi (PL). Proteini sirovog ekstrakta su razdvojeni gel hromatografijom. Korišćena je kolona Sephadex G 100 (1,6 x 60 cm, Pharmacia, Uppsala, Sweden) ekvilibrisana u acetatnom puferu pH 6,0. Eluiranje proteina je praćeno protočnom UV ćelijom na 280 nm. Frakcije su testirane na amilaznu aktivnost. One koje su sadržavale amilazu su sakupljene i rehromatografisane na isti način. Hromatogram obe hromatografije amilazne aktivnosti i apsorbancije proteina na talasnoj dužini 280 nm je prikazan na slici 22.



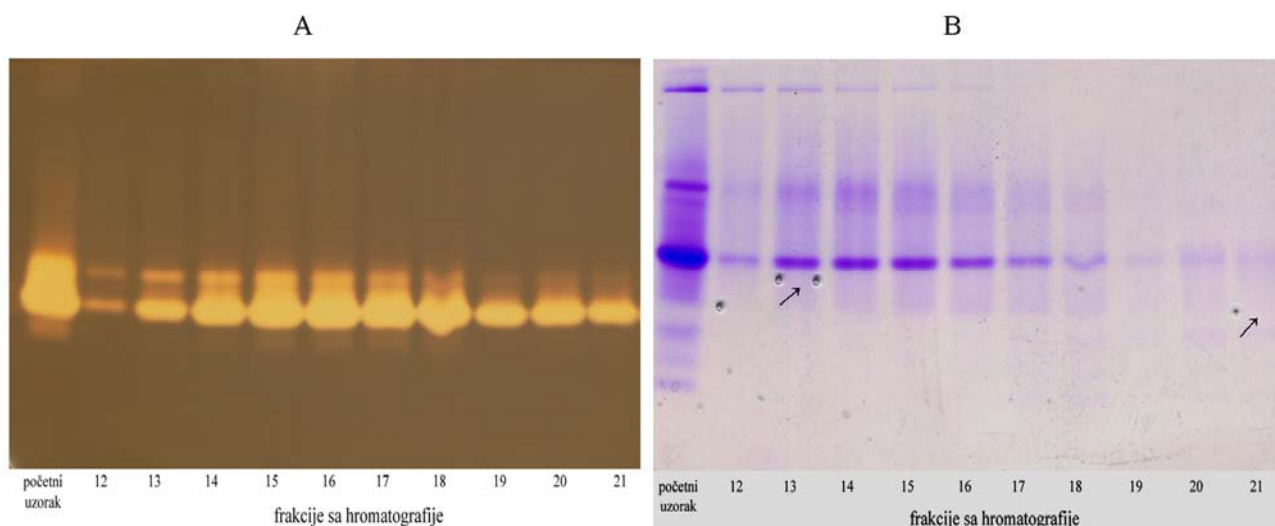
Slika 22. Elucioni profil proteina i  $\alpha$ -amilaze aktivnosti bukove strižibube posle dve gel hromatografije. A) I gel hromatografija na Sephadex G100. B) II gel hromatografija na Sephadex G100. Punom linijom su označene amilazne aktivnosti, a isprekidanom A<sup>280</sup>.

Sa elucionog profila na slici 22A se vidi da je amilaza odvojena od drugih proteina ali i da se pik amilazne aktivnosti poklapa sa značajno visokom koncentracijom proteina. Posle rehromatografije dobijen je elucioni profil bez ovih proteina (slika 22B).

Frakcije koje su bile pozitivne na amilaznu aktivnost posle rehromatografije na Sephadex 100 su analizirane zimogramom posle nativne PAGE.

### 3.4.1.1 Zimogramska detekcija amilaze u frakcijama gel hromatografije

Nakon nativne PAGE amilazne izoforme u frakcijama su detektovane zimogramom, a zatim je gel obezbojen od jednog reagensa i proteini su obojeni CBB-om. Rezultati zimogramske detekcije i bojenje proteina CBB-om su prikazani na slici 23.



Slika 23. Elektroforegram frakcija sa amilaznom aktivnošću posle gel hromatografije sa nativne PAGE. A) Zimogramska detekcija amilaznih izoformi. B) Bojenje gela CBB-om.

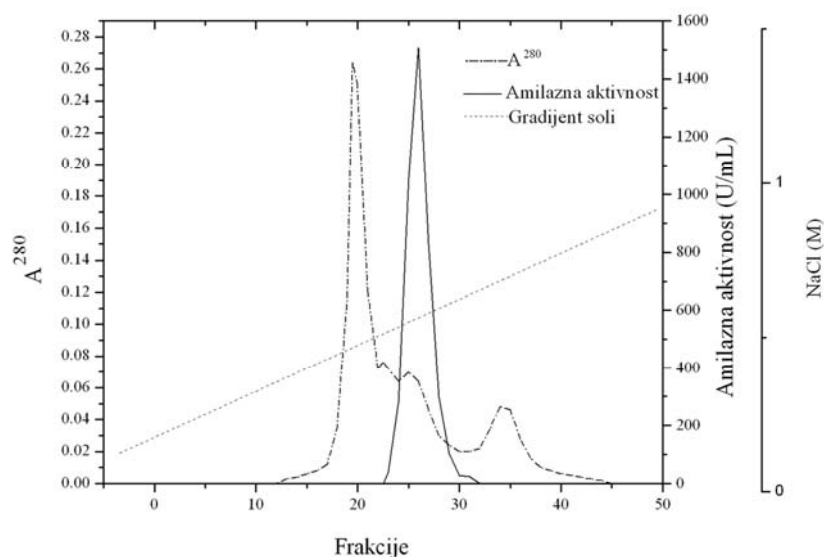
Pokazano je da se izoamilazni profili razlikuju po frakcijama. AMF-3 je prisutna u svim frakcijama, dok su ostale amilazne izoforme drugačije raspoređene po frakcijama. AMF-3 je obeležena u gelu na mestu gde je detektovana u frakciji 21 a AMF-4 je obeležena u bunaru 13 strelicama. Bojenjem proteina iz gela sa CBB-om dobijen je proteinski profil po frakcijama. Može se zaključiti da su amilazne izoforme prisutne u maloj količini u odnosu na druge proteine, jer se nisu obojile CBB-om na

mestima gde su obeležene u gelu. Frakcije sa amilaznom aktivnosti (od 12 do 21) su sakupljene kako bi se obezbedila što veća količina amilaze za dalje izolovanje iako se proteinski profili razlikuju u ovim frakcijama.

Za dalje izolovanje AMF-3 je izabrana jonoizmenjivačka hromatografija. Zimogramom u IEF gelu je pokazano da su amilazne izoforme kiseli proteini (dve izoforme sa pI oko 3,5 i dve sa manjim pI). Za matriks je izabran anjonski jonoizmenjivač DEAE – Sepharose CL–6B. Na pH 4,5 amilaze su negativno naelektrisane i vezuju se za matriks, dok će se nevezani bazni proteini eluirati.

### 3.4.2 Jonoizmenjivačka hromatografija

Sakupljene frakcije sa gel hromatografije su dijalizovane prema acetatnom puferu pH 4,5, i posle centrifugiranja supernatant je nanet na kolonu DEAE Sepharose CL-6B (1,5 x 6,5 cm), pri protoku od 30 mL/h, koja je ekvilibrisana u istom puferu kao i uzorak. Vezani proteini su eluirani gradijentom soli od 0 do 1M NaCl u polaznom puferu. Tok je praćen protočnim UV detektorom ( $A_{280}$ ). Hromatogram jonoizmenjivačke hromatografije je prikazan na slici 24.



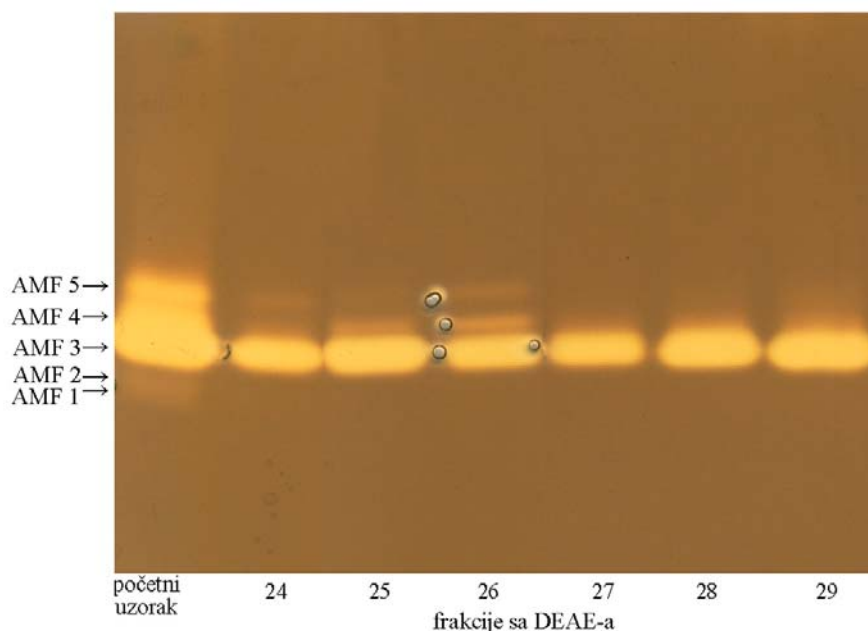
Slika 24. Elucioni profil  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube posle jonoizmenjivačke hromatografije.

Sa elucionog profila na slici 24 se vidi da se pik amilazne aktivnosti po frakcijama poklapa sa jednim manjim pikom sa proteinskog hromatograma. Najveći

proteinski pik ne odgovara piku amilazne aktivnosti i potpuno je odvojen je od nje. Frakcije sa amilaznom aktivnošću su analizirane zimogramski da bi im se odredio izoamilazni profil.

### 3.4.1.1 Zimogramska analiza amilaza u frakcijama sa jonoizmenjivačke hromatografije

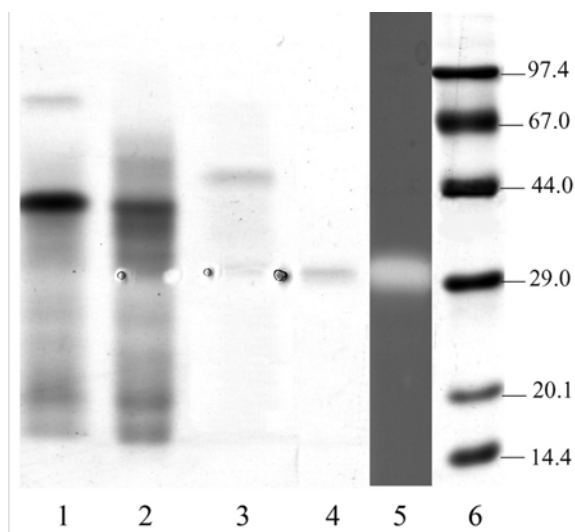
Frakcije su nanete na gel nativne PAGE i amilazna aktivnost je detektovana zimogramski, što je prikazano na slici 25.



Slika 25. Zimogramska detekcija nakon nativne PAGE amilaznih izoformi srednjeg creva larvi bukove strižibube posle jonoizmenjivačke hromatografije. Amilazne izoforme su obeležene strelicama i označene sa AMF 1- AMF 5.

Početni uzorak na jonoizmenjivačkoj hromatografiji je sadržavao svih pet amilaznih izoformi. U svim frakcijama je prisutna glavna izoforma – AMF-3. Izoforme AMF-1 i AMF-2 nisu prisutne ni u jednoj frakciji od 24 do 29. U frakcijama 27 i 28 je prisutna samo AMF-3 tako da se može zaključiti da je glavna amilazna izoforma prečišćena od ostale četiri.

Na slici 26 je prikazana elektroforetska analiza svih koraka u prečišćavanju  $\alpha$ -amilaze iz srednjeg creva larve bukove strižibube.



Slika 26. Elektroforetski profili glavne amilazne izoforme larve bukove strižibube (AMF-3) tokom prečišćavanja. 1: sirovi ekstrakt, 2: proteini posle I gel hromatografije, 3: proteini posle II gel hromatografije, 4: prečišćena  $\alpha$ -amilaza (AMF-3) posle jonoizmenjivačke hromatografije (frakcije 27 i 28), 5: zimogramaska detekcija prečišćene  $\alpha$ -amilaze (AMF-3), 6: proteini standardnih molekulske masa (97,4, 67,0, 44,0, 29,0, 20,1, 14,4 kDa).

Sa slike 26 se vidi da se posle gel rehromatografije broj proteinskih traka znatno smanjuje u amilaznom ekstraktu (traka 3). U traci 4 (što odgovara frakcijama 27 i 28 posle DEAE-a) samo jedna proteinska traka je detektovana u SDS PAGE kada su proteini bojeni CBB-om. Ova traka odgovara po položaju  $\alpha$ -amilazi dobijenoj zimogramskom detekcijom (traka 5).  $\alpha$ -Amilaza je prečišćena do homogenosti. Ovaj uzorak je korišćen za dalje karakterizacije.

Rezultati prečišćavanja  $\alpha$ -amilaze srednjeg cerva larve bukove strižibube su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Prečišćavanje glavne izoforme amilaze (AMF-3) iz srednjeg creva larve bukove strižibube

Faza prečišćavanja	Amilazna aktivnost (U)	Ukupni proteini (mg)	Specifična aktivnost (U/mg)	Stepen prečišćenja	Prinos (%)
Sirovi ekstrakt	277,2	29,1	9,5	1	100,0
I gel hromatografija (Sephadex G 100)	161,8	5,5	29,4	3	58,4
II gel hromatografija na (Sephadex G 100)	112,2	0,6	187,0	20	40,5
Jonoizmenjivačka hromatografija (DEAE Sepharose CL-6B)	42,7	0,04	1067,5	112	15,4

Glavna amilazna izoforma (AMF-3) larve bukove strižibube je prečišćena 112 puta sa prinosom od 15,4%. AMF-3 je dobijena u dovoljnoj količini za biohemijску

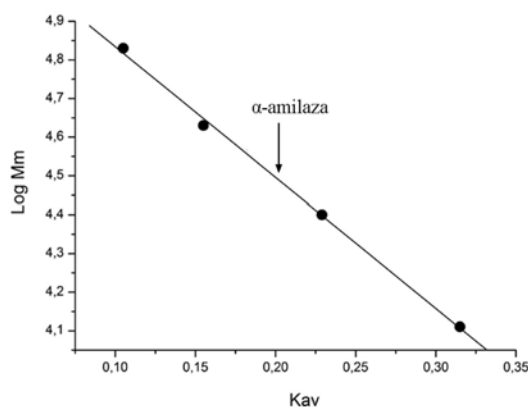
karakterizaciju. Kombinovanje gel hromatografije i jonoizmenjivačke hromatografije se pokazalo kao dobar izbor za prečišćavanje AMF-3, a istim hromatografskim tehnikama, pri drugačijim uslovima je izolovana i  $\alpha$ -amilaza larve *P. truncatus* (80).

### 3.4.3 Karakterizacija AMF-3

Prečišćena  $\alpha$ -amilaza srednjeg creva larve bukove strižibube je biohemijski okarakterisana i po osobinama je poređena sa amilazama drugih filogenetski bliskih vrsta insekata.

#### 3.4.3.1 Određivanje molekulske mase AMF-3

Molekulska masa (MM)  $\alpha$ -amilaze (AMF 3) larve bukove strižibube je određena gel hromatografijom pomoću FPLC sistema na koloni Superdex 75. MM je očitana sa grafika zavisnosti  $\log MM / K_{av}$ , koji je prikazan na slici 27, i iznosi 31 kDa.



Slika 27. Kalibracija Superdex 75 kolone i određivanje MM AMF 3 larve bukove strižibube. Standardni proteini BSA (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), himotripsinogen (25 kDa) i citohrom C(13 kDa). Strelicom je obeležen položaj elucione zapremine  $\alpha$ -amilaze.

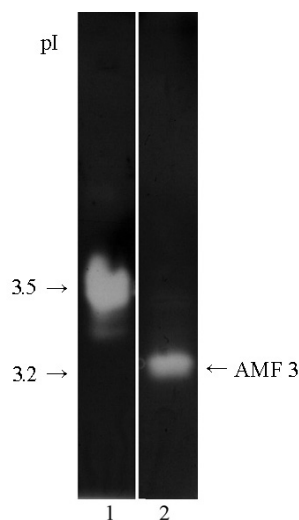
Slična MM  $\alpha$ -amilaze – 33 kDa je dobijena i SDS PAGE-om kada su upoređene Rf vrednosti amilaze (traka 4 na slici 26) i molekulskih markera (traka 6 na slici 26). Kombinovanjem ova dva rezultata se može zaključiti da je AMF 3 jednolančani polipeptidni lanac MM oko 31 kDa. I kod drugih Coleoptera su pronađene  $\alpha$ -amilaze malih MM – od 28 kDa do 36 kDa. Dve amilaze srednjeg creva larvi semenog žiška *C. maculatus* su masa 33 i 36 kDa (129).  $\alpha$ -Amilaza larve pamučnog moljca *Z. subfasciatus* ima molekulska masu od 28 kDa (79), dok amilaza

larve tzv rebraste borove strižibube *Rhagium inquisitor* ima takođe masu manju od 35 kDa (137).

### 3.4.3.2 Određivanje izoelektrične tačke AMF-3

Izoelektrična tačka (pI vrednost)  $\alpha$ -amilaze je određena IEF-om u kiselom regionu pH vrednosti (od 2,5 do 4,5). Korišćeni su pI markeri u regionu kiselih pI vrednosti (Low pI kit, GE Healthcare). Položaj  $\alpha$ -amilaze i glukoamilaze iz serije pI markera je određen zimogramom nakon završene elektroforeze. Rezultati su prikazani na slici 28. Isecanjem gela na tračice od po 0,5 cm i merenjem pH vrednosti u svakom segmentu kao i poređenjem sa položajem pI markera na gelu je određena pI vrednost AMF-3.

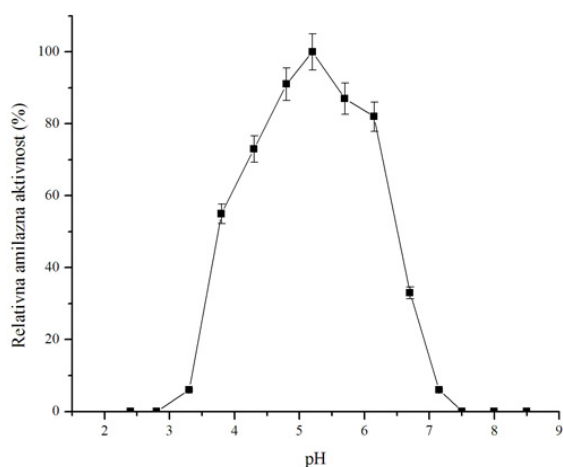
Slika 28. Zimogramska detekcija amilaze i glukoamilaze iz pI markera za određivanje pI vrednosti  $\alpha$ -amilaze IEF-om. 1 – pI marker: glukoamilaza (pI 3,50), 2 – prečišćena  $\alpha$ -amilaza bukove strižibube. Strelicom je označen položaj  $\alpha$ -amilaze. Strelicama su označeni položaji pI vrednosti na položajima glukoamilaze i  $\alpha$ -amilaze bukove strižibube.



pI vrednost AMF-3 iznosi 3,2. Kod većine Coleoptera je pI vrednost  $\alpha$ -amilaze ispod 6,5 a kod nekih predstavnika Curculionidae je oko 3,8 (64). Još neki predstavnici roda Coleoptera imaju  $\alpha$ -amilaze izuzetno kiselih pI vrednosti: *H. hampei* – manje od 3,5 (144). Veoma malom broju amilaza strižibuba je određena pI vrednost. Larve *P. semipunctata* imaju dve amilazne izoforme sa pI od 4,0 i 4,2 (78). Može se reći da su pomenute pI vrednosti približne, pošto je za njihovo određivanje korišćeno IEF u opsegu pH od 3,5 do 10 što nije dovoljno precizno za određivanje pI vrednosti kiselih proteina.

### 3.4.3.3 pH optimum AMF-3

pH optimum je određen merenjem enzimske aktivnosti koristeći 1% rastvorni skrob u puferima pH opsega od 2,0 do 8,5 sa razlikom od 0,5 pH jedinice. Korišćeni su sledeći 50 mM puferi: glicinski za pH vrednosti 2,0 – 2,5, acetatni za pH vrednosti od 3,0 do 6,5 i fosfatni za pH vrednosti 6,5 – 8,5. Kriva zavisnosti amilazne aktivnosti od pH je prikazana na slici 29.



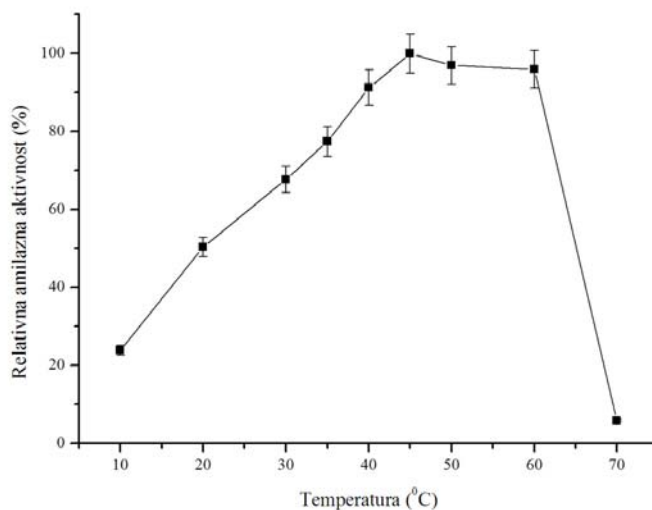
Slika 29. pH optimum  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri merenja. SEM svakog merenja je bila manja od 5%.

Kriva zavisnosti enzimske aktivnosti od pH ima karakterističan zvonasti izgled. Na pH ispod 3,0 i preko 7,5 nije zabeležena amilazna aktivnost. Optimalan pH za AMF-3 je između 4,5 i 6,5 sa maksimalnom vrednošću na 5,2. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim objavljenim rezultatima dobijenim na larvama bukove strižibube (157). Većina Coleoptera ima  $\alpha$ -amilazu sa pH optimumom oko 5,0 (64). Optimalni opseg pH kao i maksimum aktivnosti AMF-3 je potpuno u skladu sa pH koji je određen u lumenu prednjeg dela srednjeg creva larve bukove strižibube gde je i jedino zabeležena aktivnost duž srednjeg creva (odeljak 3.1.3). Duž srednjeg creva larvi bukove strižibube dobijen je pH gradijent (od 5,5 do 9,0). Na pH preko 8,0 AMF-3 je potpuno neaktivna što objašnjava odsustvo amilazne aktivnosti duž srednjeg i zadnjeg regiona mezenterona gde je detektovana veoma bazna sredina.



### 3.4.3.4 Temperaturni optimum AMF-3

Temperaturni optimum je određen merenjem enzimske aktivnosti koristeći 1% rastvorni skrob na pH 5,2 na temperaturama od 10°C do 70°C sa razlikom od 10°C. Kriva zavisnosti amilazne aktivnosti od temperature je prikazana na slici 30.



Slika 30. Temperaturni optimum  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri merenja. SEM svakog merenja je bila manja od 5%.

Maksimalna amilazna aktivnost je zabeležena na 45°C. Na 10°C amilaza zadržava samo 20% aktivnosti.  $\alpha$ -Amilaza pokazuje značajnu aktivnost u temperaturnom opsegu od 40°C do 60°C, dok je na 70°C potpuno denaturisana. Dobijeni plato aktivnosti  $\alpha$ -amilaze od 45°C do 60°C nije karakterističan za amilaze insekata, ali je zato sličan plato aktivnosti  $\alpha$ -amilaze na temperaturama iznad 50°C dobijen kod plavih dagnji *Mytilus galloprovincialis* (175). Temperaturni optimum od 40°C do 45°C je nađen kod amilaza nekih Coleoptera, ali su ove amilaze na 60°C denaturisane (80, 176), dok AMF-3 zadržava čak 75% aktivnosti na 60°C.

### 3.4.3.5 $K_m$ i $V_{max}$ AMF 3

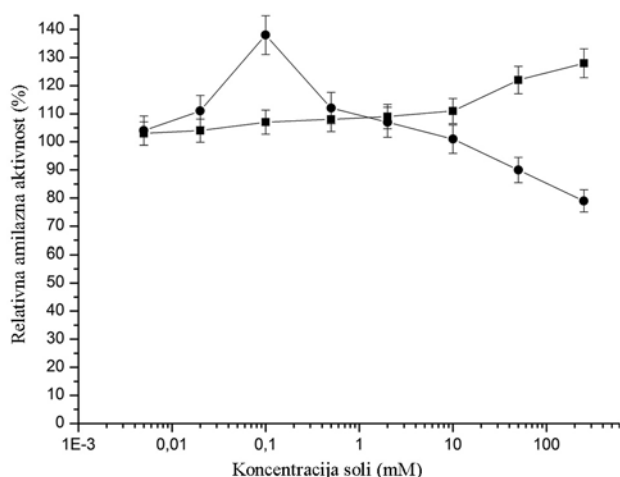
Početna brzina reakcije je određena korišćenjem različitih koncentracija rastvornog skroba - 1, 5, 10, 15, 20, 30 i 40 mg/mL za određivanje amilazne aktivnosti.  $K_m$  i  $V_{max}$  su izračunati ne lineranom regresijom korišćenjem GraphPad Prism 3,0 programa.

- $K_m = 0,43 \text{ mg/mL}$
- $V_{max} = 94 \text{ } \mu\text{mol/min}$

Publikovano je svega nekoliko rezultata za  $K_m$   $\alpha$ -amilaze drugih Coleoptera: *T.molitor* – 1,8 mg/mL (177), *Callosobruchus chinensis* – 2,3 mg/mL (176), *R. dominica* – 0,98 mg/mL (132). Dobijena  $K_m$  za AMF-3 je značajno manje vrednosti što ukazuje na veću enzimsku efikasnost u poređenju sa gore pomenutim amilazama.

### 3.4.3.6 Uticaj soli na aktivnost AMF 3

Ispitan je uticaj NaCl i CaCl<sub>2</sub> na aktivnost  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube. AMF-3 je inkubirana sa različitim koncentracijama svake soli (0,005; 0,02; 0,1; 0,5; 2,0; 10,0; 50,0 i 250,0 mM) 15 minuta, a zatim joj je dodat supstrat (1% rastvorni skrob). Aktivnost je određena na već opisan način. Rezultati su prikazani grafički na slici 31.



Slika 31. Uticaj soli na aktivnost AMF 3. (●) CaCl<sub>2</sub> (■) NaCl. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost tri merenja. SEM svakog merenja je bila manja od 5%.

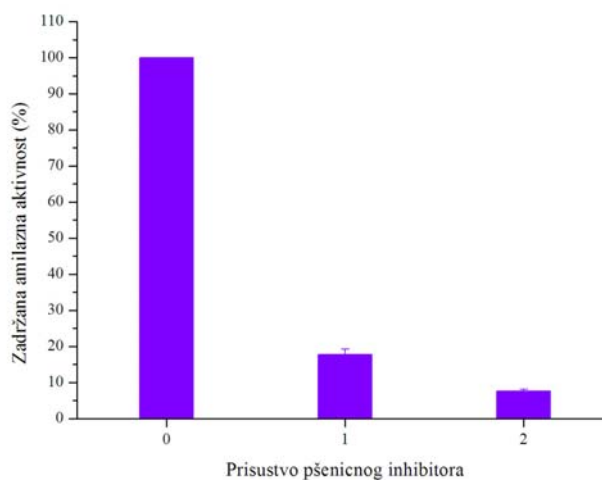
Aktivnost AMF-3 se povećava pri koncentracijama Ca<sup>2+</sup> od 0,005 do 5 mM. Maksimalna aktivnost AMF-3 se postiže u prisustvu 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>. Pri većim koncentracijama CaCl<sub>2</sub> opada aktivnost AMF-3. Ovaj fenomen nije do sada pronađen kod  $\alpha$ -amilaza insekata, ali je zato publikovan kao karakteristika  $\alpha$ -amilaze iz lista graška (178). Mnoge endoamilaze kao što su humana (pljuvačna), svinjska (pankreasna), zatim iz mikroorganizama (*Bacillus subtilis* i *Aspergillus oryzae*) su kalcijum–zavisne i sadrže Ca<sup>2+</sup> u aktivnom mestu (179).  $\alpha$ -Amilaze insekata su takođe Ca<sup>2+</sup> zavisni enzimi (70).

NaCl aktivira  $\alpha$ -amilazu pri koncentracijama  $> 10$  mM. Većina  $\alpha$ -amilaza Coleoptera se blago aktivira NaCl (79, 136, 140). Pri koncentraciji NaCl od 250 mM postiže se povećanje aktivnosti za 28%. Pri primenjenim koncentracijama NaCl u reakcionoj smeši ne postiže se maksimum aktivnosti AMF-3, ali upotreba većih koncentracija od 250 mM nema fiziološkog značaja za enzim, pa nije ispitivana.

### 3.4.3.7 Uticaj pšeničnih inhibitora na aktivnost AMF-3

U okviru karakterizacije  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube je ispitan i uticaj amilaznog inhibitora iz pšenice (*Triticum* sp.). Korišćen je sirovi ekstrakt pšenice. Ekstrakt dobijen posle centrifugiranja je inkubiran na  $75^{\circ}\text{C}$  1 sat da bi se denaturisala pšenična amilaza. Uzorci AMF-3 su inkubirani sa ovako dobijenim ekstraktom i sa 5 puta razblaženim ekstraktom kome je dodat rastvorni skrob, 2,0 mM NaCl i 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Reakcija je trajala 24 sata na  $35^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani na slici 32.

Slika 32 Uticaj pšeničnog inhibitora na glavnu izoformu  $\alpha$ -amilaze iz srednjeg creva larve bukove stražibube (*M. funereus*). 0 – bez prisustva pšeničnog inhibitora, 1 – Sirovi pšenični inhibitor razblažen 5 puta, 2 – Sirovi pšenični inhibitor. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri merenja  $\pm$  SEM.



82% inhibicije  $\alpha$ -amilaze je postignuto korišćenjem razblaženog ekstrakta pšeničnog inhibitora i čak 92% inhibicije je postignuto upotrebom nerazblaženog ekstrakta. Rezultati inhibicije AMF-3 pšeničnim inhibitorom se poklapaju sa rezultatima koje dobijaju i drugi autori koji se bave ovim enzimima insekata. Pšenični inhibitori efikasno inhibiraju većinu  $\alpha$ -amilaza insekata, što je pokazano na enzimskom nivou, a takođe to utiče direktno i na larveno razviće (132, 145, 146).

Amilazni inhibitori iz pšenice su najviše ispitivani. Prvi put su izolovani i okarakterisani još 1970 (180), a istraživanja su intenzivna i u skorije vreme (152).

### 3.4.3.8 Aktivnost AMF-3 prema sirovom skrobu

Ispitana je i aktivnost  $\alpha$ -amilaze prema sirovom skrobu. Korišćene su četiri vrste skroba, izolovane iz pšenice (*Triticum* sp.), krompira (*Solanum tuberosum*), rena (*Armoracia rusticana*) i kukuruza (*Zea mays*). Ove vrste skrobova se međusobno razlikuju po veličini i obliku pa je zato bilo zanimljivo ispitati da li  $\alpha$ -amilaza deluje na njih i da li postoje razlike u aktivnosti. Skrobovi su pripremani ispiranjem 4 puta puferom pH 5,1 koji sadrži 2,0 mM NaCl i 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, kako bi se sa čestica uklonile supstance koje bi eventualno mogle da utiču na reakciju, a ujedno i da se stvore uslovi (najpovoljniji) za aktivnost AMF-3. Reakciona smeša je sadržavala 1% (m/V) skroba. Reakcija je trajala 24 sata na 35°C, a rezultati su prikazani u tabeli 5.

Tabela 5. Aktivnost glavne izoforme  $\alpha$ -amilaze srednjeg creva larve bukove strižibube (*M. funereus*) prema sirovom skrobu različitog porekla

Poreklo sirovog skroba	Amilazna aktivnost (U)
ren	1,51 ± 0,03
kukuruz	0,51 ± 0,01
pšenica	0,33 ± 0,01
krompir	0,00

Najveću aktivnost AMF-3 je pokazala prema skrobu iz rena. Prema krompirovom skrobu nije zabeležena aktivnost. Manje od 50% aktivnosti u odnosu na aktivnost prema skrobu iz rena je zabeleženo prema skrobu iz žitarica (pšenica i kukuruz). Značajna razlika u aktivnosti AMF-3 prema četiri vrste skroba se može objasniti strukturom zrna skroba.

Ispitivanjem aktivnosti  $\alpha$ -amilaze iz larvi meksičkog pasuljevog žiška *Z. subfasciatus* dobijeno je da nema razlike u aktivnosti prema različitim vrstama skroba (130), što nije slučaj i sa AMF-3. Aktivnost amilaze *Z. subfasciatus* je ispitivana prema dve vrste nativnog skroba, oba poreklom iz semena leguminoza. Aktivnost

AMF-3 je ispitana prema nativnom skrobu izolovanom iz različitih biljaka. S obzirom na to da se skrob poreklom iz različitih biljaka odlikuje specifičnom strukturom i veličinom, moguće je očekivati razlike u amilaznoj aktivnosti prema njima.

Iako se amilaza konvencionalno ispituje koristeći rastvorni skrob kao supstrat, sa tačke fizioloških ispitivanja digestivnih enzima ispitivanje amilazne aktivnosti na sirovom skrobu može dati značajne informacije. AMF-3 i  $\alpha$ -amilaza larve *Z. subfasciatus* su pokazale manju aktivnost prema sirovom skrobu nego prema rastvornom. To ide u prilog teoriji da amilaze insekata deluju u digestivnom traktu na čestice skroba koje su već mehanički oštećene usitnjavanjem u ustima i u prednjem crevu (130).

Može se zaključiti da AMF-3 larve bukove strižibube se po svojim osobinama uklapa u tipične  $\alpha$ -amilaze (EC 3.2.1.1) (118).

### **3.5 Prečišćavanje $\alpha$ -amilaze srednjeg creva larve velike hrastove strižibube (*C. cerdo*)**

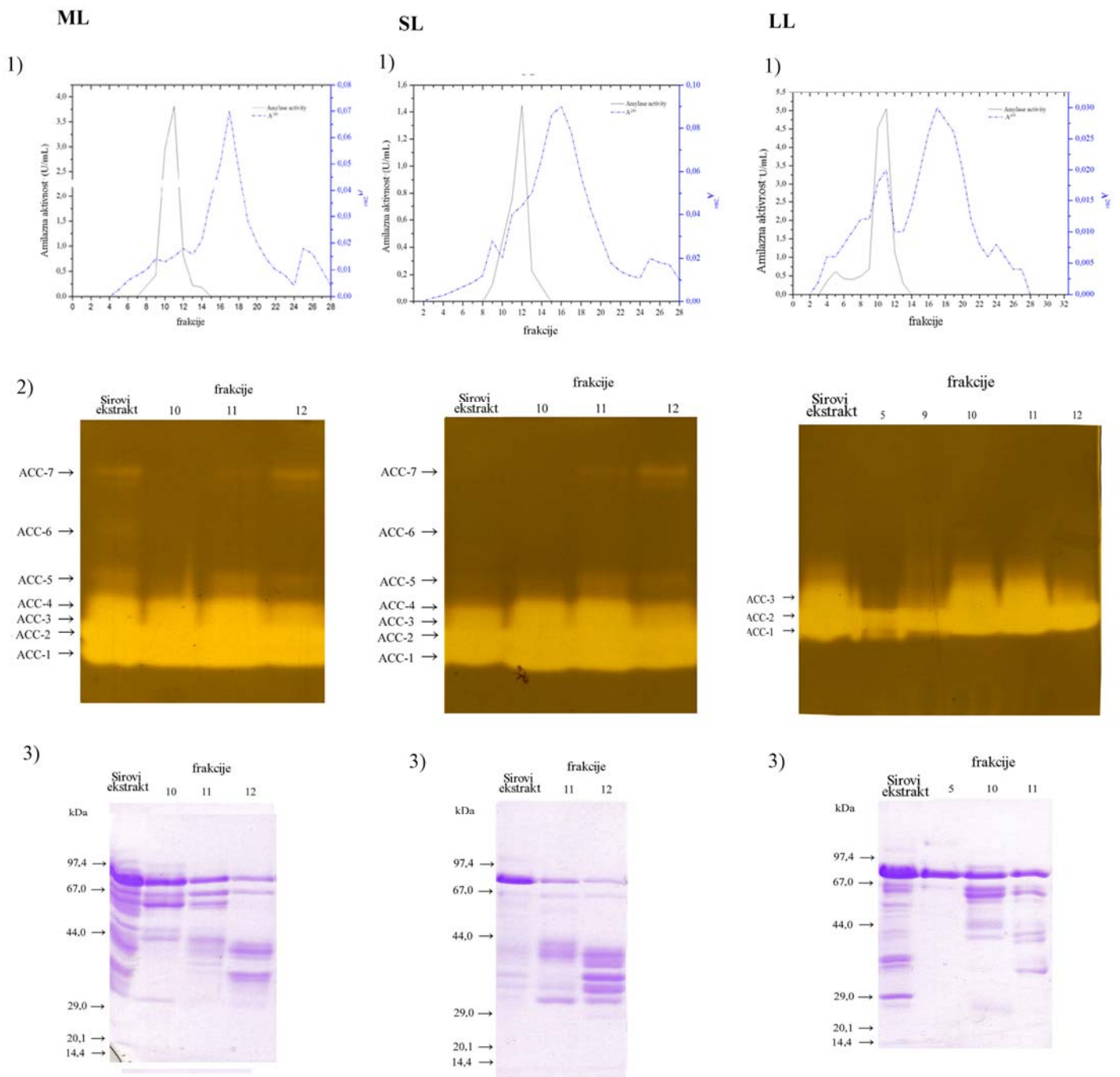
$\alpha$ -Amilaza larvi bukove strižibube je prečišćena klasičnim hromatografskim tehnikama. Za prečišćavanje  $\alpha$ -amilaze larvi velike hrastove strižibube su izabrane FPLC hromatografske tehnike koje se odlikuju daleko većom rezolucijom u razdvajanju proteina. Razlog za ovakav izbor je taj što je za izolovanje  $\alpha$ -amilaze iz srednjeg creva larvi velike hrastove strižibube bila na raspolaganju znatno manja količina polaznog materijala, odnosno manji broj larvi.

#### **3.5.1 FPLC gel hromatografija amilaznih izoformi tri grupe larvi velike hrastove strižibube (*C.cerdo*)**

Ekstrakti srednjeg creva larvi velike hrastove strižibube dobijeni iz tri grupe larvi (ML, SL i LL) hromatografisani su na Superose 12 HR 10/30 koloni na FPLC sistemu. Frakcije su testirane na amilaznu aktivnost i pozitivne su analizirane zimogramskom tehnikom posle native PAGE i SDS PAGE-om. Na slici 33 su prikazani rezultati sve tri hromatografije.

Sa elucionih grafika na slici 33 se uočavaju različiti UV ( $A^{280}$ ) profili ML, SL i LL ekstrakta. Amilaza je eluirana u istim zapreminama u sva tri ekstrakta (slika 33. 1) što govori da je u pitanju enzim iste MM. Frakcije sa amilaznom aktivnošću se razlikuju između ML, SL i LL ekstrakta po broju i intenzitetu amilaznih izoformi (slika 33. 2), ali i po sadržaju proteina (slika 33. 3).

Hromatografisanjem tri sirova ekstrakta srednjeg creva larvi velike hrastove strižibube je postignuto razdvajanje proteina bliskih MM po frakcijama.



Slika 33. Gel hromatografija na HPLC-u tri ekstrakta srednjeg creva larvi velike hrastove strižibube. ML – martovske larve, SL – septembarske larve, LL – larve gajene u laboratorijskim uslovima. 1) – Elucioni profili amilazne aktivnosti posle gel hromatografije. 2) – Zimogramska detekcija  $\alpha$ -amilaze posle nativne PAGE u frakcijama sa amilaznom aktivnošću, ACC 1 do ACC 7 prikazuju položaje amilaznih izoformi. 3) – Proteinski profil nakon SDS PAGE sirovih ekstrakata kao i frakcija sa amilaznom aktivnošću, kDa – molekulske mase standardnih proteina.

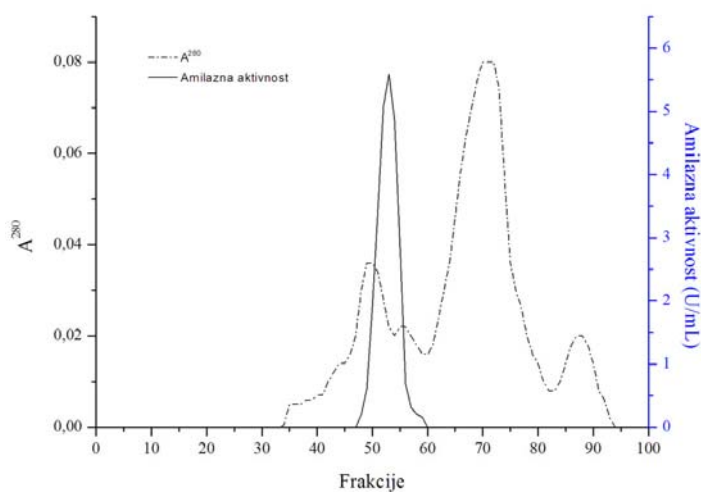
### 3.5.1.1 Određivanje molekulske mase ACC-2

Kolona korišćena za gel hromatografiju je predhodno kalibrisana proteinima poznatih molekulskih masa. Sa kalibracione prave  $\log MM - K_{av}$  (MM) je određena molekulska masa ACC-2 koja je ista u sva tri ispitivana uzorka (ML, SL i LL) i iznosi 34 kDa.

Rezultati pokazuju da su  $\alpha$ -amilaze larvi bukove i velike hrastove strižibube enzimi sličnih osobina: MM 31 (bukova strižibuba) i 34 kDa (velika hrastova strižibuba) i sličnih pI vrednosti (manje od 3,5). Gel hromatografija i jonoizmenjivačka hromatografija su korišćene za izolovanje AMF-3 pa su iste hromatografske tehnike izabrane i za prečišćavanje ACC-2. Hromatografisanjem malih količina tri sirova ekstrakta larvi velike hrastove strižibube na FPLC sistemu pokazano je da ove tehnike za kraće vreme daju bolje rezultate razdvajanja od klasičnih hromatografija te je zato za prečišćavanje ACC-2 izabran FPLC sistem hromatografija.

### 3.5.2 Prečišćavanje ACC-2 FPLC gel hromatografijom

Za prečišćavanje ACC-2 korišćen je ML ekstrakt, koji je nakon centrifugiranja nanešen na FPLC Superose 12 HR 16/50 kolonu. U sakupljenim frakcijama je merena  $A_{280}$  i zabeležen proteinski profil. U svakoj frakciji je određena amilazna aktivnost a elucioni profil je prikazan na slici 34



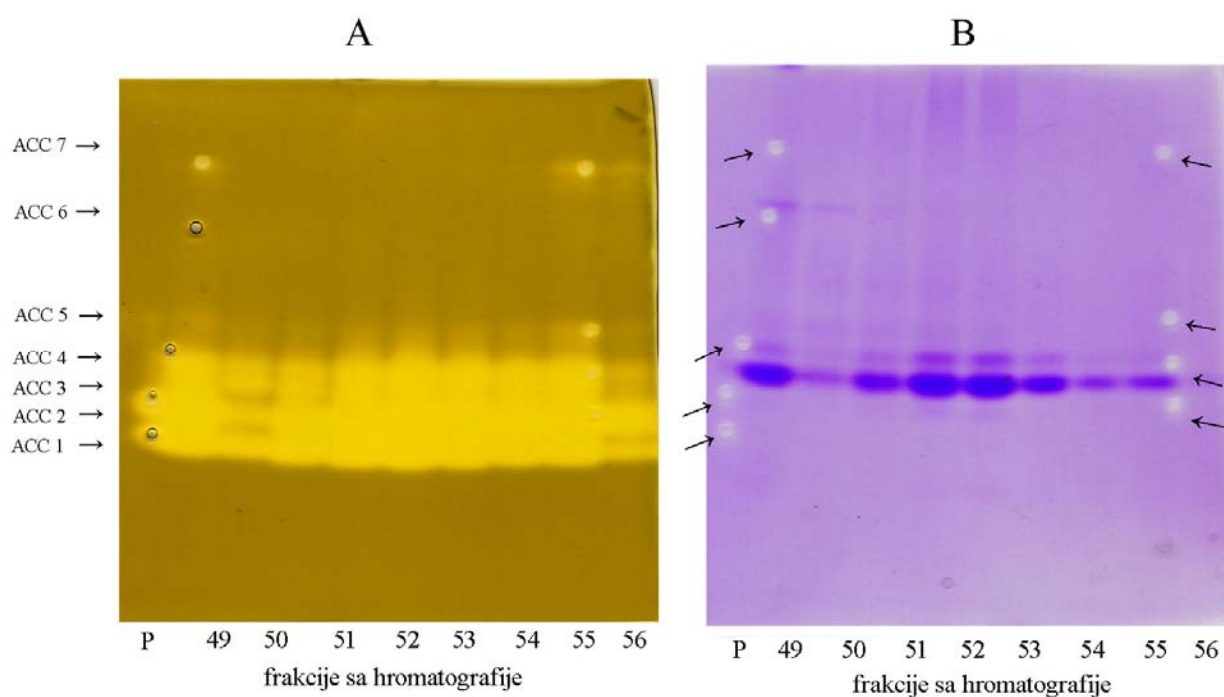
Slika 34. Elucioni profil amilaze ML ekstrakta nakon FPLC gel hromatografije.



Amilazna aktivnost je detektovana u frakcijama od 49 do 56. Sa elucionog profila se vidi da su frakcije sa amilaznom aktivnošću odvojene od glavnog pika proteinskog hromatografa. Ove frakcije su analizirane elektroforetski.

### 3.5.2.1 Zimogramska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa gel hromatografije

U gelu posle native PAGE amilazne izoforme su detektovane zimogramom a posle toga je gel bojen CBB-om. Rezultati su prikazani na slici 35.



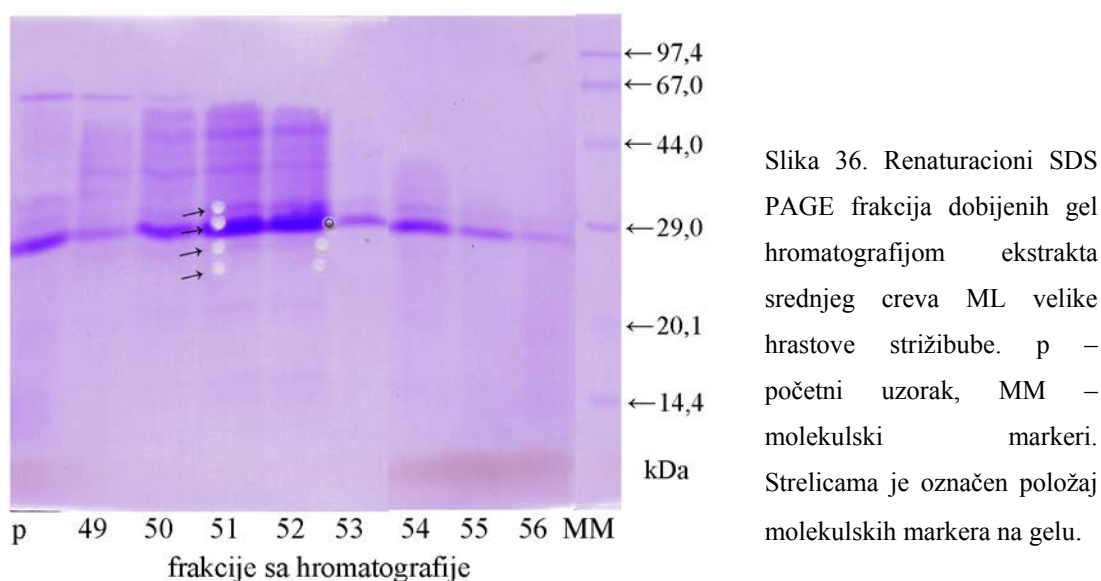
Slika 35. Nativna EF frakcija  $\alpha$ -amilaze larve velike hrastove strižibube sa gel hromatografije (FPLC). A – Zimogramska detekcija frakcija sa amilaznom aktivnošću. B – Proteini obojeni CBB-om. P – početni uzorak na hromatografiji – sirovi ekstrakt srednjeg creva larve velike hrastove strižibube, 49 – 56 frakcije sa hromatografije. ACC 1 – ACC 7 položaji amilaznih izoformi su označeni strelicama.

U frakcijama posle FPLC gel hromatografije je detektovano prisustvo različitih amilaznih izoformi. ACC-6 nije prisutna u frakcijama sakupljenim sa hromatografske kolone. ACC-7 je detektovana samo u frakcijama 55 i 56. Intenzitet ACC-1 do ACC-5 izoformi je različit u frakcijama, pri čemu je najslabiji u prvoj i u poslednjoj frakciji sa amilaznom aktivnošću. Položaji amilaznih izoformi su

obeleženi u gelu strelicama u početnom uzorku i frakciji 55. Bojenjem proteina u gelu CBB-om uočava se prisustvo jedne proteinske trake u svim frakcijama koja se nalazi između obeleženih amilaznih izoformi ACC-2 i ACC-3, a ACC-4 traka je obojena CBB-om. Može se zaključiti da su aktivnije amilazne izoforme prisutne u manjoj količini u frakcijama.

### 3.5.2.2 Renaturacioni SDS PAGE frakcija sa gel hromatografije

Frakcije sa amilaznom aktivnošću su analizirane na renaturacionom SDS PAGE-u u 12% AA gela. Uzorci su pre nanošenja na EF delimično denaturisani SDS-om. Posle elektroforeze amilaza je renaturisana korišćenjem Triton X-100 i detektovana zimogramom, posle čega su proteini obojeni CBB-om. Poređenjem Rf vrednosti za glavnu amilaznu izoformu sa Rf vrednostima molekulskih markera je određena MM ACC-2. Izgled gela sa proteinima obojenim CBB-om je prikazan na slici 36.



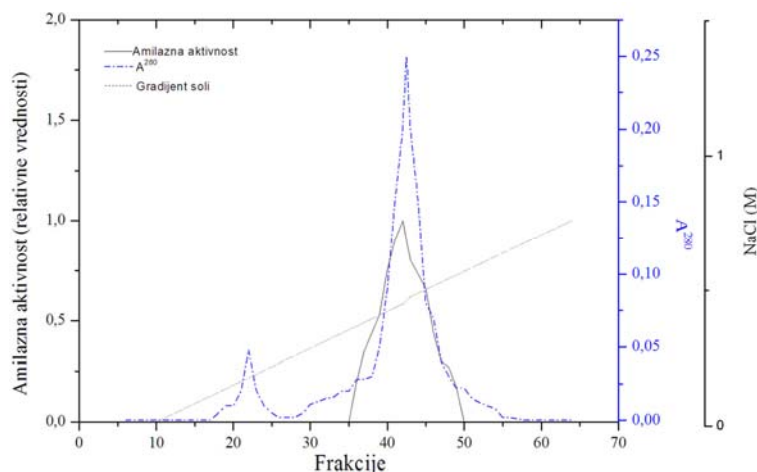
Sa slike 36 se uočava prisustvo proteina MM između 29 i 67 kDa u frakcijama koje su imale amilaznu aktivnost. Zimogramom su detektovane 4 amilazne izoforme koje imaju sposobnost renaturacije (rezultat nije prikazan), čiji su položaji obeleženi strelicama (slika 36).

Poređenjem sa položajem standardnih proteina izračunata je molekulska masa ACC-2 od 33,9 kDa. Ovo se u potpunosti slaže sa masom koja je određena gel hromatografijom (34 kDa). Može se zaključiti da je ACC-2 monomerni protein mase oko 34 kDa.

$\alpha$ -Amilaza larve velike hrastove strižibube iz ML ekstrakta je kiseli protein sa pI oko 3,5. Za sledeći korak u prečišćavanju je izabrana jonoizmenjivačka hromatografija na Q Sepharosi u FPLC sistemu za hromatografiju. Pri pH 4,5  $\alpha$ -amilaza je negativno naelektrisana i vezuje se za izabrani katjonski matriks.

### 3.5.3 FPLC Jonoizmenjivačka hromatografija ACC-2

Sakupljene frakcije sa gel hromatografije su nanete na XK 16/10 Q Sepharose FF kolonu u acetatnom puferu pH 4,5 provodljivosti 780  $\mu$ S/cm. Vezani proteini su eluirani gradijentom jonske sile. Korišćen je rastvor NaCl od 0,0 do 0,5 M u istom puferu. Elucioni profil proteina sa jonoizmenjivačke hromatografije je prikazan na slici 37.

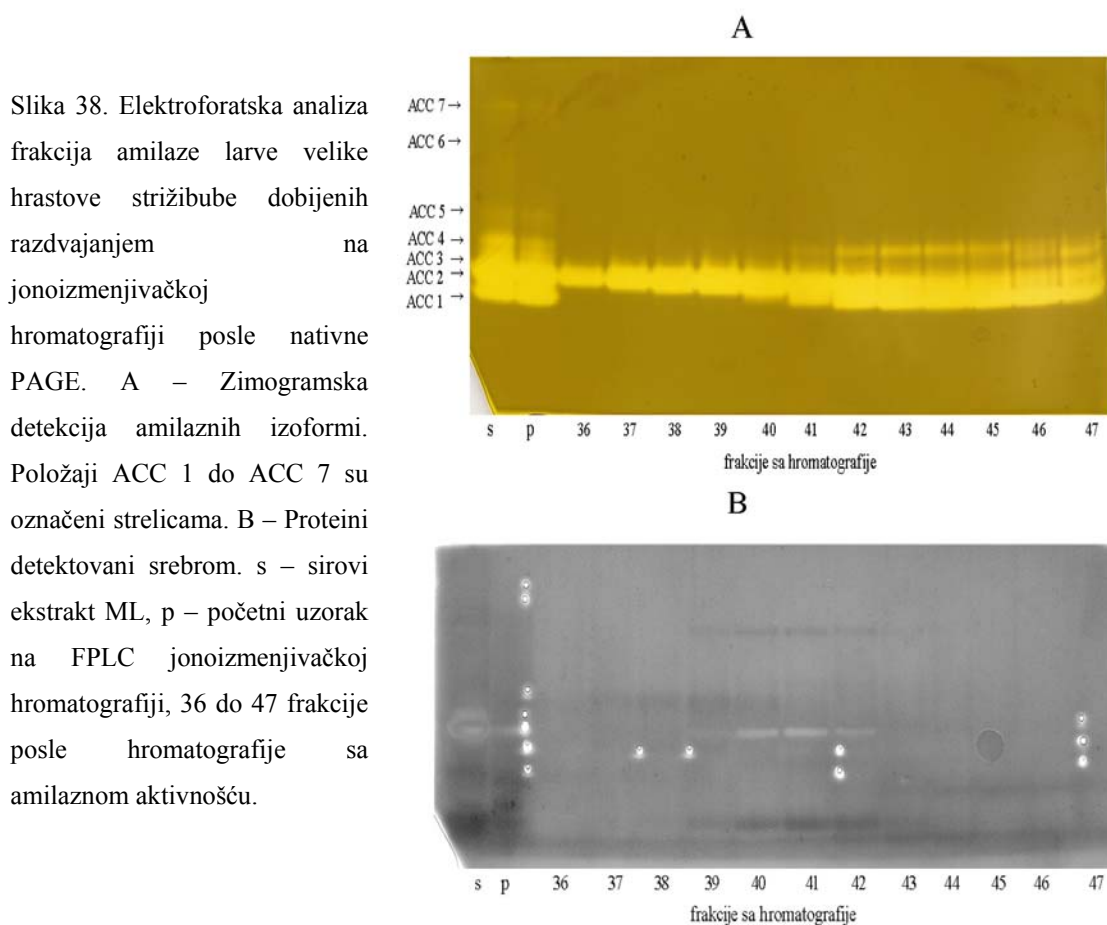


Slika 37. Elucioni profil amilaze i proteina srednjeg creva larve velike hrastove strižibube na FPLC jonoizmenjivačkoj hromatografiji, XK 16/10 Q Sepharose FF.

Analizom prikazanog hromatograma (slika 36) vidi se da se amilazna aktivnost po frakcijama sa Q Sepharose poklapa sa proteinskim pikom. Frakcije su analizirane i zimogramski.

### 3.5.3.1 Zimograska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa jonoizmenjivačke hromatografije

Amilazne izoforme su detektovane u gelu posle native PAGE, a zatim je gel obojen srebrom. Proteini su u ekstraktu srednjeg creva larvi prisutni u malim količinama pa sa njima i  $\alpha$ -amilaza, te je ova tehnika bojenja izabrana da bi se pokazalo prisustvo i slabo zastupljenih proteina u frakcijama. Rezultati su prikazani na slici 38.



Kombinovanjem gel i jonoizmenjivačke hromatografije na FPLC-u dobijena je čista izoforma  $\alpha$ -amilaze larve velike hrastove strižibube ACC-2. U frakcijama od 36 do 38 posle Q Sephadex FF je detektovana samo ACC-2 (slika 38A). Poređenjem sa slikom 38B uočava se razlika u prisutnosti drugih proteina u ovim frakcijama. U frakciji 36 nije detektovana nijedna druga proteinska traka. Frakcije 37 i 38 sadrže jednu proteinsku traku koja odgovara položaju ACC-4. Detektovana traka je prisutna i

u 39 i 40 ali ne odgovara ACC-4 jer na tom mestu nije zabeležena amilazna aktivnost. Frakcije 39 do 42 sadrže ukupno po tri proteinske trake koje odgovaraju pratećim proteinima u smeši. U frakcijama 40 do 42 ACC-2 je negativno obojena što je posledica bojenja proteina posle zimogramske detekcije i dešava se kao neželjeni efekat bojenja proteina srebrom. Frakcije od 43 do 46 sadrže po jednu prateću proteinsku traku. ACC-2 je prečišćena korišćenjem FPLC sistema u dva koraka (frakcija 36 sa slike 38A i 38B).

Izolovanje amilaza iz larvi bukove i velike hrastove strižibube je zahtevan posao obzirom na to da su ovi enzimi veoma aktivni a prisutni u malim količinama, u odnosu na ostale proteine ekstrakta. Ovo je karakteristično i za druge enzime digestivnog trakta insekata (70). Za izolovanje AMF-3 i ACC-2 su korišćeni ekstrakti dostupni u malim količinama te su izabrane metode bile najpogodnije jer su imale minimalne gubitke i ostvarena su razdvajanja zadovoljavajućeg kvaliteta. AMF-3 je izolovana u tri koraka korišćenjem klasičnih hromatografskih metoda a ACC-2 je izolovana praktično samo u dva koraka FPLC hromatografijama. Za izolovanje amilaze larve *T. molitor* je korišćena takođe FPLC hromatografija i to tri vrste jonoizmenjivačka, hidrofobna i gel hromatografija, ali tek posle preparativne EF-e (67). I za izolovanje  $\alpha$ -amilaza iz škorpije je korišćena FPLC hromatografija, ali u kombinaciji sa još dve klasične hromatografije i dve taložne metode (128). Do sada nije publikovano izolovanje  $\alpha$ -amilaze upotrebom samo FPLC hromatografija.

Problem male zastupljenosti amilaze u digestivnom traktu larvi bukove i velike hrastove strižibube se može donekle prevazići gajenjem larvi u veštačkim uslovima jer se na taj način dobija veća količina materijala za izolovanje enzima. U ovom radu su izolovane  $\alpha$ -amilaze iz ekstrakata larvi iz prirode. U budućim radovima će se izolovati i okarakterisati amilaze iz larvi gajenih u laboratoriji. Poređenjem karakteristika ovih amilaza dobiće se i nova saznanja o uticaju hranljivog supstrata na ekspresiju enzima, kao i o adaptivnosti ovih polifagnih vrsta na molekulskom nivou.

### 3.6 Zaključci

- Uspešno su odgajeni reproduktivno sposobni adulti bukove strižibube u laboratorijskim uslovima i opisano im je larveno razviće. Poređene su prva i druga generacija laboratorijski odgajenih larvi statističkim metodama i uočeno je da se u drugoj generaciji larve međusobno manje razlikuju po svim parametrima koji su pratili larveno razviće. Dobijanje reproduktivno sposobnih adulta bukove strižibube je značajno kao prvi korak za eventualni program zaštite, koji bi obuhvatio reintegraciju ovih retkih insekata u prirodu. Istovremeno na ovaj način se obezbeđuje dovoljan broj larvi za laboratorijska istraživanja i prevazilazi se problem male količine polaznog materijala za izolovanje i karakterizaciju digestivnih enzima.
- Određeno je pH duž srednjeg creva larvi bukove strižibube. U prednjem delu srednjeg creva je pH 5,5 gde je jedino i detektovana amilazna aktivnost.
- Detektovane su razlike u amilaznoj aktivnosti i nivou drugih proteina digestivnog trakta kod larvi gajenih u laboratoriji i larvi razvijenih u prirodi. Izoamilazni profil larve bukove strižibube zavisi od tipa hranljivih supstrata koje konzumira tako da najviše izoformi proizvode na kompleksnom supstratu – drvetu u prirodnoj sredini.
- Saharoza utiče na razviće larvi bukove strižibube. Larve se u odsustvu saharoze brže razvijaju.
- Saharoza, kao prost šećer, utiče negativno na produkciju  $\alpha$ -amilaze larve bukove strižibube. Larve koje konzumiraju saharozu proizvode manje amilaze i manji broj amilaznih izoformi od larvi koje ne konzumiraju saharozu.
- Nivo amilaze i izoenzimski profil larve velike hrastove strižibube zavisi od tipa hranljivih sastojaka i vremenskih uslova u kojima se razvija. Najveći broj izoformi imaju larve koje se razvijaju na prirodnom supstratu – drvetu tokom proleća kada je temperatura viša i povoljnija za rast larvi.
- Odabirom klasičnih hromatografskih tehnika i uslova rada koji odgovaraju masi i pI vrednosti AMF-3 dobijen je čist enzim. Glavna  $\alpha$ -amilazna izoforma larve bukove strižibube je prečišćena do homogenosti korišćenjem gel

homatografije i jonoizmenjivačke hromatografije 112 puta sa prinosom od 15%.

- AMF-3 ima molekulsku masu od 33 kDa, pI vrednost 3,2, optimalno pH za aktivnost je 5,2 a optimalna temperatura je na 45°C. AMF-3 je kalcijum zavistan enzim. Pšenični inhibitori inhibiraju AMF-3. Pokazuje aktivnost i prema sirovom skrobu, a najviše prema skrobu izolovanom iz rena.
- ACC-2 je delimično prečišćena iz sirovog ekstrakta, a potpuno izoenzimski korišćenjem dve vrste FPLC hromatografije.
- Molekulska masa ACC-2 je 34 kDa. Nađeno je da ima pI vrednost manju od 3,5 veoma sličnu AMF-3.
- Pokazano je da larve bukove i velike hrastove strižibube svoju polifagnost i veliku adaptivnost prema hranljivim supstratima i uslovima sredine obezbeđuju zahvaljujući mogućnosti da produkuju veliki broj amilaznih izoformi po potrebi.

## 4 EKSPERIMENTALNI DEO

Spisak korišćene opreme:

FPLC sistem Pharmacia LCC501-plus

Tehnička vaga Mettler PE 3600

Analitička vaga Mettler

Ispravljač Pharmacia ECPS 2000/300

Protočni vodeni termostat Multitemp 2209 LKB, Bromma

Vertikalna Hoefler kada za elektroforezu

Vertikalna mini Hoefler kada za elektroforezu

Kada za horizontalnu elektroforezu Pharmacia Biotech, Multi Temp III

Ispravljač Pharmacia Biotech, EPS 3500

Magnetna mešalica IKA Mag Rec G

Vibraciona mešalica Tehnica EV -100

Pisač Pharmacia, model 481

UV ćelija 2238 Uvicord S II, LKB

Kolektor 2112 Redirac LKB

Kolona 1,6 x 60 cm LKB

Spektrofotometar UV-VIS-NIR PU 8630 Philips

pH metar Checker sa kombinovanom elektrodom

Konduktometar WTW LF521, inoLab

Mikrotalasna pećnica, Samsung

Centrifuga Tehnica LO-72

Centrifuga, miniSpin plus, Eppendorf

Sušnica Sutjeska



## **4.1 Gajenje strižibuba u laboratorijskim uslovima**

### **4.1.1 Gajenje bukove strižibube (*M. funereus*) u laboratorijskim uslovima**

#### **4.1.1.1 Gajenje insekata**

Insekti su gajeni u plastičnim kutijama (18 x 12 x 12 cm) koje su imale otvore na vrhu za ventilaciju. Na dno kutija je postavljen filter papir preko koga su postavljane hrastove grančice sa lišćem. Insekti su hranjeni i keksom i sezonskim voćem. Vata nakvašena vodom je dodavana u kutije kao izvor vode i za održavanje vlažnosti. Temperatura je varirala od 22°C tokom hladnijeg perioda u godini do 26°C tokom toplog perioda. Vlažnost u laboratoriji je bila prosečno 50%. Lišće i hrana su menjani na sedam dana. Položena jaja su sakupljana svakodnevno i prebacivana na hranljivu podlogu na Petrijevim šoljama i čuvana na 23°C i vlažnosti od 50%. Jaja su pregledavana svakodnevno.

#### **4.1.1.2 Gajenje larvi bukove strižibube**

Larve se zbog svog kanibalističkog ponašanja gaje pojednično u kutijama (prečnika 6 cm) sa ventilacionim rupama na poklopcima. Razviće larvi se odvija u mraku na 23°C i vlažnosti od oko 50%. Hranljiva podloga se menja na 7 dana kada se i meri težina larvi. Presvlačenje larvi se prati svakodnevno.

Ukupno 580 larvi je gajeno u laboratoriji tokom tri godine. Odgajeno je 507 larvi prve generacije, od kojih je 31 larva odgajena do adulta za praćenje larvenog razvića. Odgajene su 73 larve druge generacije, od kojih je njih 30 odgajeno do adulta. Ostale larve su disecirane tokom šestog larvenog stupnja i korišćene su za ispitivanje digestivnih enzima.

#### Sastav podloge:

„Palenta”	100 g
Agar – agar	10 g
Saharoza	25 g
Suvi kvasac	25 g
Nipagin (0,2 g/mL etanola) (metil estar <i>p</i> -hidroksibenzoeve kiseline)	12 mL
Voda	1000 mL

„Palenta” je proizvod napravljen od kukuruznog griza proizvođača „Mitrosrem”.

#### Hemijski sastav „Palente”:

Rastvorni skrob	70 – 80 %
vlaga	13 – 15 %
proteini	7 – 9 %
celuloza	0,35 – 0,70 %
pepeo	0,4 – 0,8 %

Podloga se priprema tako što se odmerene supstance pomešaju sa vodom i prokuvaju. Na temperaturi oko 70°C dodaje se rastvor nipagina. Dobijena podloga se razliva u Petrijeve šolje i okrugle plastične kutije u kojima se gaje larve.

#### **4.1.1.3 Statistička obrada rezultata**

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni upotrebom programa GraphPad Prism 5. Težina larvi tokom razvića je statistički analizirana „One-way analysis of variance” (ANOVA) testom korišćenjem Tukey – ovog testa za poređenje rezultata između dve grupe. Nivo značajnosti je bio  $\alpha=0,05$ .

Dužine svakog larvenog stupnja, odnosno broj dana provedenih u svakom stupnju, unutar iste grupe rezultata je analiziran upotrebom „D’Agostino i Pearson” testa. Rezultati dobijeni u dve grupe larvi su međusobno poređeni t-testom sa intervalom pouzdanosti od 95%.

#### 4.1.2 Gajenje velike hrastove strižibube (*C. cerdo*) u laboratorijskim uslovima

Jedna grupa larvi velike hrastove strižibube je gajena u laboratoriji – larve sakupljene u prirodi i prebačene na hranljivu podlogu. Larve su sakupljane sa hrasta na Fruškoj Gori u martu kada su larve najaktivnije. Starost larvi je određena na osnovu njihove veličine. Larve su sakupljene tokom petog larvenog supnja. Larve su gajene u laboratoriji godinu dana i nisu se ulutkale. Disecirane su tokom sedmog larvenog stadijuma i korišćene za analizu amilaze.

Larve su gajene u uslovima i na hranljivoj podlozi kao i larve bukove strižibube što je opisano u odeljku 4.1.1.2.

#### 4.1.3 Priprema sirovog ekstrakta srednjeg creva larvi bukove (*M. funereus*) i velike hrastove strižibube (*C. cerdo*)

Sve ispitivane grupe larvi obe vrste strižibuba (sakupljene u prirodi i gajene u laboratoriji) žrtvovane su na isti način. Nakon dekapitacije, srednja creva su disecirana na ledu, a zatim homogenizovana u ohlađenom avanu sa tučkom, 0,9%-nim natrijum hloridom u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 (1:2), uz dodatak silika gela (1:0,3). Pufer je pripremljen na sledeći način:

##### 20 mM Acetatni pufer pH 6,0:

Glacijalna sirćetna kiselina	1,14 mL
destilovana voda do	1 L

pH je podešeno na 6,0 titrovanjem sa 1 M rastvorom NaOH.

Nakon homogenizacije, homogenati su ekstrahovani 90 minuta u frižideru, a nakon toga centrifugirani 10 minuta na 10000 x g. Talozci su reekstrahovani istim puferom 60 minuta u frižideru i centrifugirani. Dobijeni ekstrakti i reekstrakti su spojeni, a zatim odmašćeni dodatkom jednake zapremine CCl<sub>4</sub> i centrifugiranjem na 5000 x g, 2 minuta. Odmašćivanje je ponovljano tri puta, a dobijeni bistri supernatanti su odvađeni i čuvani na -20°C do upotrebe.

#### 4.1.4 Određivanje pH vrednosti srednjeg creva bukove strižibube

Tri creva larvi bukove strižibube su podeljena na tri dela, kao što je prikazano na slici 15 (3.1.4). Svakom delu je dodata voda u odnosu 1:2, usitnjeno je i homogenizovano. pH vrednost svakom ekstraktu je određena univerzalnom pH indikatorskom hartijom. Korišćene su Merck-ove univerzalne indikator tračice pH 0–14.

##### 4.1.4.1 Određivanje amilazne aktivnosti

Amilazna aktivnost je određivana upotrebom DNS reagensa i rastvornog skroba kao supstrata po proceduri Bernfelda (119).

*Potrebni rastvori:*

##### 1. 3.5-dinitro – salicilatni (DNSA, dinitrosalicilna kiselina) reagens:

*A) 0,4 M dinitrosalicilna kiselina u 0,4M NaOH*

NaOH	8 g
DNS	5 g
voda do	100 mL

*B) Tartaratni rastvor:*

K,Na-tartarat	150 g
vode do	250 mL

Rastvor B se dodaje u rastvor A i dopuni vodom do 500 mL.

##### 2. Maltozni standard, 10 mM:

maltoza	3,42 mg
voda do	10 mL

##### 3. Acetatni pufer pH 5,0, 50 mM:

glacijalna sirćetna kiselina	1,42 mL
0,1 M NaOH	do pH 5,0
voda do	500 mL

4. 100 mM CaCl<sub>2</sub>:

CaCl <sub>2</sub>	1,1 g
voda do	100 mL

5. 100 mM NaCl:

NaCl	0,58 g
voda do	100 mL

4. Skrobni rastvor, 1,0%:

rastvorni skrob	3,0 g
CaCl <sub>2</sub> (4)	30 μL
NaCl (5)	60 μL
acetatni pufer pH 5,0 (3)	do 0,3 L

*Postupak:*

Po 50 μL rastvora enzima (potrebnog razblaženja) se odmeri u epruvete i doda se 0,45 mL rastora 4. Epruvete se inkubiraju 10 minuta na 35°C. Reakcija se prekida dodatkom 500 μL DNS reagensa i zatim se smeše prokuvaju 5 minuta u ključalom vodenom kupatilu. Kada se ohlade rastvori se razblaže vodom do 5 mL, promešaju i meri se A<sub>540</sub>. Slepa proba je istog sastava samo što se rastvori dodaju drugim redosledom: enzim, DNS, skrob. Za odmerenu vrednost A<sub>540</sub> se sa standardne prave očita koncentracija redukujućih šećera, odnosno maltoze, na osnovu koje se izračunava amilazna aktivnost (U/mL).

*Standardna prava*

Od 10 mM rastvora maltoze (rastvor 2) se pripreme razblaženja tako što se u epruvete odmeri po:

Koncentracija maltoze (mM)	V <sub>rastvor 2</sub> (μL)	V <sub>H<sub>2</sub>O</sub> (μL)
10	500	0
8	400	100
6	300	200
4	200	300
2	100	400
1	50	450
0,5	25	475
0	0	500

Jedna jedinica amilaze je ona količina enzima koja oslobodi 1  $\mu\text{mol}$  redukujućeg šećera (obračunato na maltozu) u jednom minutu na 35°C.

## **4.2 $\alpha$ -Amilaza larve bukove strižibube (*M. funereus*)**

### **4.2.1 Uporedna analiza amilaza larvi bukove strižibube (*M. funereus*) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji**

#### **4.2.1.1 Određivanje amilazne aktivnosti**

Amilazna aktivnost u sirovim ekstraktima tri grupe larvi bukove strižibube (larve iz prirode, I i II generacija laboratorijskih larvi) je određena kao u odeljku 4.1.3.2. Sirovi ekstrakti su razblaživani 10 puta. Reakcija je trajala 10 minuta na 35°C.

#### **4.2.1.2 Određivanje koncentracije proteina po Bradfordu**

##### **1. Boja, Coomassie brilliant blue G-250 (CBB G-250):**

CBB G-250	100 mg
95% etanol	50 mL
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mL
destilovana voda do	200 mL

Boja se rastvori u etanolu, pa se dodaju redom kiselina i voda do finalne zapremine.

2. Rastvor goveđeg serum albumina (BSA) za standardnu pravu 1 mg/mL se razblažuje u opsegu 0,1 do 1,0 mg/mL:

BSA (1mg/mL) ( $\mu$ L)	dest. voda ( $\mu$ L)	finalna konc. mg/mL
10	90	0,1
20	80	0,2
40	60	0,4
60	40	0,6
80	20	0,8
100	-	1.0
-	100	-

3. Bradford-ov reagens:

*Potrebni rastvori:*

rastvor 1	100 mL
destilovana voda do	500 mL

Sveže procedeni rastvor je stabilan 2 – 3 nedelje na sobnoj temperaturi.

*Postupak:*

U 100  $\mu$ L rastvora (uzorak + pufer) dodaje se 5 mL razblaženog rastvora boje.

Promeša se na vibracionoj mešalici.

Nakon 5 minuta do 30 minuta najviše meri se apsorbancija na 595 nm.

## 4.2.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi i SDS PAGE

### 4.2.2.1 Nativna PAGE

*Potrebni rastvori, način pripreme rastvora i tok rada:*

1. Monomerni rastvor (30% T<sup>1</sup>, 2,7% C). Oznaka ovog rastvora u tablici je AA:

akrilamid	58,4 g
bisakrilamid	1,6 g
destilovana voda do	200,0 mL

2. Pufer za razdvajajući gel (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8). Oznaka u tablici je Tris pH 8,8:

Tris	36,3 g
destilovana voda do	200,0 mL
4 M HCl do	pH 8,8

3. Pufer za koncentrujući gel (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8). Oznaka ovog rastvora u tablici je Tris pH 6,8:

Tris	6,0 g
destilovana voda do	100,0 mL
4 M HCl do	pH 6,8

4. Inicijator (amonijum-persulfat) 10% m/V. Oznaka ovog rastvora u tablici je APS:

APS	0,2 g
destilovana voda do	2,0 mL

5. Rastvor za nadslojavanje (2-butanol ili *n*-butanol zasićen vodom):

<i>n</i> -butanol ili 2-butanol	100 mL
destilovana voda	do postojanog donjeg sloja vode

Rastvor se pre upotrebe promućka i ostavi da se slojevi razdvoje. Koristi se gornji sloj.

---

<sup>1</sup> T je g akrilamida + g bisakrilamida u 100 mL rastvora, C je g bisakrilamida u odnosu na zbirnu masu akrilamida i bisakrilamida. Obe vrednosti se izražavaju u procentima.



6. Pufer za obradu uzoraka (PUZ):

rastvori za PUZ	za 25 mL, 3X <sup>2</sup>
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	9,38 mL
99% glicerol	7,5 mL
ili 85% glicerol	9,0 mL
0,1% bromfenol-plavo	1,5 mL
destilovana voda do	25,0 mL

*Priprema uzoraka:*

Uzorci se mešaju sa puferom za uzorke (PUZ) u odnosu 2:1.

7. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, pH 8,3), radni pufer i 10 puta koncentrovaniji pufer, koji se do upotrebe čuva zamrznut.

komponente	1 x
Tris	3,0 g
glicin	14,4 g
destilovana voda do	1,0 L

8. Rastvor za fiksiranje, bojenje i obezbojavanje (50% (V/V) metanol, 10% (V/V) sirćetna kiselina):

metanol	500 mL
sićetna kiselina	100 mL
destilovana voda do	1L

9. Rastvor boje (0,1% (m/V) CBB , 50% (V/V) metanol, 10% (V/V) sićetna kiselina):

CBB G ili R 250	0,5 g
rastvor 8 do	500,0 mL

---

<sup>2</sup>Za razblažene uzorke.

10. Rastvor sirćetne kiseline, 7% (V/V) sirćetna kiselina:

sirćetna kiselina	70 mL
destilovana voda do	1 L

*Priprema gela i postupak:*

rastvori	gel za razdvajanje	gel za koncentrovanje
	(10%)	(4%)
AA	3,33	0,66
Tris pH 8,8	2,5	-
Tris pH 6,8	-	1,25
destilovana voda	4,0	3,0
temed	0,004	0,005
	dezaeracija 5– 10 minuta	
APS	0,05	0,025
finalna zapremina	10,0 mL	5,0 mL

Dezaerisani rastvor gela za razdvajanje se sipa između dve staklene ploče, i nadsloji rastvorom 5. Kada je polimerizacija donjeg gela završena sipa se dezaerisani rastvor za koncentrujući gel. U rastvor se stavi "češalj". Kada je polimerizacija gornjeg gela završena, izvadi se češalj, a nastali "bunarčići" se operu i u njih unesu uzorci.

Uslovi elektroforeze: Napon je konstantan (80 V) dok uzorci uđu u gel za razdvajanje, a povišava se od 150 do 400 V do kraja rada ili se kroz koncentrujući gel koristi konstantna jačina struje od 12 mA i 25 mA kroz razdvajajući gel.

*Detekcija proteina CBB-om R 250*

*Postupak bojenja po fazama:*

faza	rastvor	vreme (min)
ispiranje	dest. voda	1
fiksiranje	8	20
bojenje	9	20
obezbojavanje	8	20
obezbojavanje	10	preko noći

#### 4.2.2.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF) pH opsega od 2,5 do 4,2

Izoelektrično fokusiranje je urađeno na Multiphor II sistemu za elektroforezu. Kao pI markeri korišćeni su standardni proteini i boje (Low pI kit, GE Healthcare) odnosno: pepsinogen (2,80), amiloglukozidaza (3,50), metil–crveno (3,75) glukoza–oksidaza (4,15), tripsinski inhibitor (4,55),  $\beta$ -laktoglobulin A (5,20), goveđa karboanhidraza B (5,85), humana karboanhidraza B (6,55).

*Priprema 7,5%-nog gela:*

akrilamid (30%)	3,5 mL
amfoliti pI 2,5-4,0	0,6 mL
amfoliti pI 3,5-5,0	0,3 mL
amfoliti pI 4,0-6,0	0,1 mL
glicerol (50%)	4,0 mL
destilovana voda	6,75 mL
temed	12 $\mu$ L
dezaeracija par minuta	
APS	75 $\mu$ L

Rastvor za polimerizaciju se nadsloji *n*-butanolom prethodno zasićenim vodom ili umesto toga prekrije parafilmom. Nakon jednog sata polimerizovanja sendvič se pažljivo otvori i gel postavi na hladnjak. Hladnjak se nakvasi destilovanom vodom. Ploča se postavlja tako da se tečnost ravnomerno rasporedi u obliku filma ispod ploče. Višak rastvora koji ploča istisne ukloni se papirnom vatom. Na gel se postavljaju papirne elektrode natopljene elektrodnim rastvorima.

Elektrodni rastvori:

Anodni elektrolit 0,25 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
koncentrovana H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,17 mL
destilovana voda do	10 mL
Katodni elektrolit 0,2 M HEPES	
HEPES	0,475 g
destilovana voda do	10 mL

Elektrodni papiri se umoče u odgovarajuće rastvore i prosuše u sendviču od papirne vate. Tako pripremljene trake se stave na gel, a platinske elektrode preko njih. Radna temperatura je 10°C.

*Priprema i nanošenje uzoraka:*

Sirovi ekstrakti srednjeg creva larvi bukove strižibube iz prirode i gajenih u laboratoriji (I i II generacija) su naneti 5 puta razblaženi po 10 µL.

*Fokusiranje:*

faza	$U$ (V)	$I$ (mA)	$P$ (W)	vreme (min)
fokusiranje	do 1 000	do 50	3	90
kraj	do 1 000	do 50	4	15

Nakon fokusiranja u gelu je zimogramski određivana amilaza pa zatim obojen.

*Bojenje, potrebni rastvori i tok rada:*

1. Fiksir:

TCA	120g
destilovana voda do	1 L

2. Boja CBB R u fiksiru (45/10/45, metanol/sirćetna kiselina/voda, V/V/V):

0,1% CBB R	1 mL
fiksir (12% TCA) do	100 mL

Posle fiksiranja i bojenja gel se prebacuje u normalni fiksir (50/10/40, metanol/sirćetna kiselina/voda, V/V/V) ili 7% sirćetnu kiselinu i trake postaju plavo obojene.

#### 4.2.2.3 Zimogramska detekcija $\alpha$ -amilaze

Za amilazni zimogram gel se po završetku elektroforeze prenese u staklenu posudu gde se amilaza detektuje po sledećoj proceduri:

*Potrebni rastvori:*

1. 100 mM CaCl<sub>2</sub>:

CaCl <sub>2</sub>	1,1 g
voda do	100 mL

2. 100 mM NaCl:

NaCl	0,58 g
voda do	100 mL

3. 50 mM Acetatni pufer pH 5,0, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM NaCl:

glacijalna sirćetna kiselina	1,42 mL
0,1 M NaOH	do pH 5,0
CaCl <sub>2</sub> (1)	0,5 mL
NaCl (2)	1 mL
voda do	500 mL

4. 1% Skrobni rastvor, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM NaCl:

rastvorni skrob, 1%	3,0 g
CaCl <sub>2</sub> (1)	30 $\mu$ L
NaCl (5)	60 $\mu$ L
acetatni pufer pH 5,0 (3)	do 0,3 L

5. Jodni reagens:

KI	2,2 g
I <sub>2</sub>	1,1 g
voda do	100 mL

6. Tinktura joda:

KI	4 g
I <sub>2</sub>	5 g
voda	10 g
etanol do	100 mL

*Postupak:*

A) Za gel posle posle nativne EF, debljine 1mm:

<i>A)</i>	<i>Faza</i>	<i>Vreme i temperatura</i>
1	Ispiranje vodom	2-5 minuta
2	Acetatni pufer pH 5,0 (3)	2 minuta
3	1% skrob (4)	30 min na 30 <sup>0</sup> C
4	Ispiranje vodom	2 minuta
5	Kratko ispiranje puferom (3)	1 minuta
6	Pufer iz faze 2 (3).	30 min na 30 <sup>0</sup> C
7	Ispiranje vodom	5 puta po 30 sekundi
8	Jodni reagens (5), 5 puta razblažen	do pojave prosvetljenja na gelu
9	Tinktura joda (6), 10 puta razblažen	1 minut do izoštravanja dobijenih traka u fazi 8
10	Ispiranje vodom	

B) Za gel posle posle IEF-a, debljine 1mm:

<i>B)</i>	<i>Faza</i>	<i>Vreme i temperatura</i>
1	Ispiranje vodom	2-5 minuta
2	Acetatni pufer pH 5,0 (3)	20 minuta
3	0,5% skrob u puferu (4 dva puta razblažen)	15 min na 30 <sup>0</sup> C
4	Ispiranje vodom	2 minuta
5	Kratko ispiranje puferom (3)	1 minut
6	Pufer iz faze 2 (3).	20 min na 30 <sup>0</sup> C
7	Ispiranje vodom	5 puta po 30 sekundi
8	Jodni reagens (5), 10 puta razblažen	do pojave prosvetljenja na gelu
9	Tinktura joda (6), 100 puta razblažen	1 minut do izoštravanja dobijenih traka u fazi 8
10	Ispiranje vodom	

#### 4.2.2.4 SDS-PAGE sirovih ekstrakata srednjeg creva larvi bukove strižibube iz prirode i larvi gajenih u laboratoriji

*Potrebni rastvori, način pripreme rastvora i tok rada:*

Potrebni rastvori su isti kao za nativnu elektroforezu (odjeljak 4.2.3.1) uz dodatak rastvora detergenta koji se priprema na sledeći način:

##### 1. Rastvor detergenta 10% (m/V) SDS (natrijum-dodecil-sulfat):

SDS	10,0 g
destilovana voda do	100,0 mL

Puferi koji se razlikuju od onih za nativnu elektroforezu pripremaju se na sledeći način:

##### 2. Pufer za obradu uzoraka (PUZ):

rastvori za PUZ	za 25 mL, 3X
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	9,38 mL
85% glicerol	9,0 mL
čvrst SDS	1,5 g
0,1% bromfenol-plavo	1,5 mL
komercijalni $\beta$ -merkaptoetanol	3,75 mL
destilovana voda do	25,0 mL

*Priprema uzoraka:*

Uzorci se pomešaju sa puferom za uzorke (PUZ) u odnosu 2:1. Rezultujući rastvor se tretira zagrevanjem 2 minuta na ključalom vodenom kupatilu. Uzorci su razblaženi 10 puta, pomešani sa PUZ-om i naneti po 30  $\mu$ L (sirovi ekstrakti laboratorijskih larvi) i po 15  $\mu$ L (sirovi ekstrakti larvi iz prirode) u bunarčiče gela.

3. Pufer za elektroforezu (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS pH 8,3), radni pufer i 10 puta koncentrovani pufer, koji se do upotrebe čuva zamrznut.

komponente	1 x
Tris	3,0 g
glicin	14,4 g
10% SDS	10,0 mL
destilovana voda do	1,0 L

*Priprema gela:*

rastvori	gel za razdvajanje	gel za koncentrovanje
	(10%)	(4%)
AA	3,33	0,66
Tris pH 8,8	2,5	-
Tris pH 6,8	-	1,25
destilovana voda	4,0	3,0
temed	0,004	0,005
	dezaeracija 5–10 minuta	
SDS	0,10	0,05
APS	0,05	0,025
finalna zapremina	10,0 mL	5,0 mL

Dezaerisani rastvor gela za razdvajanje se sipa između dve staklene ploče. Nakon sipanja rastvora za gel površina se nadsloji rastvorom 6 ili vodom. Kada je polimerizacija donjeg gela završena sipa se dezaerisani rastvor za koncentrujući gel. U rastvor se stavi "češalj". Kada je polimerizacija gornjeg gela završena, izvadi se češalj, a nastali "bunarčići" se operu i u njih unesu uzorci.

Uslovi elektroforeze: napon je konstantan (80 V) dok uzorci uđu u gel za razdvajanje, a povisava se od 150 do 400 V do kraja rada ili se sve vreme drži konstantna struja od 12 mA kroz koncentrujući gel i 25 mA kroz razdvajajući gel. Nakon završene elektroforeze, gel je obojen CBB–om kao što je opisano u odeljku nativne EF (4.2.2.1).



### **4.2.3 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće i produkciju amilaze larve bukove strižibube (*M. funereus*)**

#### **4.2.3.1 Ispitivanje uticaja saharoze na larveno razviće larve bukove strižibube (*M. funereus*)**

Korišćene su larve bukove strižibube sakupljene u prirodi tokom proleća na Fruškoj gori sa hrastovih posečenih debala koja su ležala u šumi godinu dana. Podeljene su u tri grupe:

1. Prva grupa larvi je gajena na podlozi sa saharozom kao što je opisano u odeljku 4.1.1.
2. Druga grupa larvi je gajena na istoj podlozi bez saharoze.
3. Treća grupa larvi je gajena na podlozi sa saharozom (kao u 4.1.1.2) 14 dana, a zatim tokom III larvenog stadijuma prebačena na podlogu bez saharoze.

Larve su gajene 38 dana u uslovima opisanim u odeljku 4.1.1.2 Larveno razviće je praćeno svakodnevno. Mase larvi su merene jednom nedeljno kada im je i dodavana sveža podloga.

Rezultati masa larvi tokom razvića iz sve tri grupe su obrađeni statistički kao što je opisano u odeljku 4.1.1.3.

#### **4.2.3.2 Ispitivanje uticaja saharoze na produkciju amilaznih izoformi larve bukove strižibube (*M. funereus*)**

Larve su disecirane i sirovi ekstrakti su pripremljeni na način kako je opisano u odeljku 4.1.3. Larve su bile teške oko 1,2 do 1,6 g.

Amilazna aktivnost je određena kao što je opisano u odeljku 4.1.3.2.

Koncentracija proteina je određena kao što je opisano u odeljku 4.2.1.2. Korišćeno razblaženje ekstrakata je bilo 20 puta.

Amilazne izoforme su zimogramski detektovane posle native PAGE i IEF-a na način koji je opisan u poglavljima 4.2.2.1, 4.2.2.2 i 4.2.2.3. Za native PAGE naneti su uzorci 10 puta razblaženi po 30  $\mu$ L, a za IEF 5 puta razblaženi po 10  $\mu$ L.

#### **4.2.4 Analiza amilaze larvi bukove strižibube (*M. funereus*) tokom larvenog razvića**

Larve bukove strižibube odgajene u laboratoriji – I generacija laboratorijskih larvi su gajene na hranljivoj podlozi kao što je opisano u odeljku 4.1.1.2. Tokom aktivnog perioda drugog ili trećeg larvenog stadijuma larve su prebačene na podlogu bez saharoze. Nakon 30 dana larve su disecirane i pripremljeni su ekstrakti srednjeg creva na način koji je opisan u odeljku 4.1.3.

Amilazna aktivnost je određena kao što je opisano u odeljku 4.1.3.2.

Koncentracija proteina je određena kao što je opisano u odeljku 4.2.1.2.

Amilazne izoforme su zimogramski detektovane posle native PAGE i IEF-a na način koji je opisan u poglavljima 4.2.2.1, 4.2.2.2 i 4.2.2.3. Za native PAGE naneti su uzorci 10 puta razblaženi po 30  $\mu$ L, a za IEF 5 puta razblaženi po 10  $\mu$ L.

### **4.3 $\alpha$ -Amilaza larve velike hrastove strižibube (*C. cerdo*)**

#### **4.3.1 Uporedna analiza amilaza larvi velike hrastove strižibube (*C. cerdo*) koje su se razvijale u prirodi i larvi gajenih u laboratoriji**

Tri grupe larvi velike hrastove strižibube su obuhvaćene u ovim istraživanjima:

1. Prva grupa larvi su bile larve sakupljene u prirodi u martu mesecu, na Fruškoj gori, sa hrastovih panjeva (ML – martovske larve)
2. Drugu grupu larvi su činile larve koje su sakupljene iz prirode tokom septembra meseca, na Fruškoj gori, sa hrastovih panjeva (SL – septembarske larve).
3. Treća grupa su bile larve koje su u martu sakupljene iz prirode pa zatim prebačene na hranljivu podlogu i gajene na istoj hranljivoj podlozi i pod istim uslovima koji su korišćeni za gajenje larvi bukove strižibube u laboratorijskim uslovima a što je opisano u odeljku 4.1.1.2 (LL – laboratorijske larve).

Larve su žrtvovane i pripremljeni su ekstrakti srenjeg creva (odeljak 4.1.3). Težina larvi sakupljenih u prirodi je bila od 1,1 g do 3,2 g. Larve iz grupe LL su bile teške oko 3,1 g.

Amilazna aktivnost je određena kao što je opisano u odeljku 4.1.3.2. Ekstrakti srednjeg creva su razblaživani 10 puta. Reakcija je trajala 10 minuta na 35°C.

Koncentracija proteina je određena kao što je opisano u odeljku 4.2.2. Korišćeno razblaženje ekstrakata je bilo 20 puta.

#### **4.3.2 Zimogramska analiza amilaznih izoformi**

Amilazne izoforme su zimogramski detektovane posle native PAGE i IEF-a na način koji je opisan u poglavljima 4.2.2.1, 4.2.2.2 i 4.2.2.3. Za native PAGE naneti su uzorci 10 puta razblaženi po 30  $\mu$ L, a za IEF 5 puta razblaženi po 10  $\mu$ L.

## 4.4 Prečišćavanje i karakterizacija glavne izoforme $\alpha$ -amilaze (AMF-3) srednjeg creva larve bukove strižibube (*M. funereus*)

### 4.4.1 Gel hromatografija

Sephadex G-100 je pripremljen na sledeći način: 10 g praškastog gela ostavljeno je preko noći da bubri u 300 mL 0,15 M NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 na 37°C. Pufer je pripremljen na sledeći način:

20 mM acetatni pufer pH 6,0:

glacijalna sirćetna kiselina	1,14 mL
NaCl	9 g
destilovana voda do	1 L

Podušeno pH na 6,0 titracijom sa 1 M NaOH.

Posle bubrenja suspenzija gela je dezaerisana 30 minuta i sipana u kolonu. Kolone su ekvilibrisane preko noći prethodno dezaerisanim puferom 0,15 M NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0. Hidrostatički pritisak je bio 12–20 cm.  $V_0$  kolone određene su propuštanjem 0,01%-nog rastvora plavog dekstrana kroz kolonu. Kolona koja je korišćena tokom izrade ovog rada bila je dimenzija 1,6 x 60 cm. Na kolonu je naneto 2 mL ekstrakata creva larvi *M. funereus*, odnosno 26,7 mg/mL proteina. Kolona je eluirana 0,15 M NaCl u 20 mM acetatnom puferu pH 6,0 pri konstatnom protoku na sobnoj temperaturi. Sakupljane su frakcije od 1,5 mL kojima je merena apsorbancija na 280 nm.

Sakupljene frakcije u kojima je amilaza detektovana su sakupljene. Rehromatografisano je pri istim uslovima.

#### 4.4.1.1 Zimogramska detekcija amilaze u frakcijama gel rehromatografije

Sirovi ekstrakt creva larve bukove strižibube je razblažen 5 puta, pomešan sa PUZ-om i naneto je 15  $\mu$ L na gel za nativnu PAGE (odeljak 4.2.2.1). Frakcije sa

amilaznom aktivnosti su razblažene po 5 puta i nanete po 20  $\mu$ L na gel. Po završetku elektroforeze amilaza je detektovana zimogramom kao što je opisano u odeljku 4.2.2.3. Zatim su proteini fiksirani 15 minuta u rastvoru za fiksiranje (odeljak 4.2.2.1), pa je gel obezbojen od jednog reagensa u 7% sirćetnoj kiselini preko noći. Proteini su detektovani CBB-om kao što je opisano u odeljku 4.2.2.1.

#### 4.4.2 Jonoizmenjivačka hromatografija

Frakcije sa amilaznom aktivnošću dobijene posle dve gel hromatografije su sakupljene i dijalizovane prema 10 mM acetatnom puferu, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 70 mM NaCl pH 4,5 ( $\gamma = 8,5 \text{ mS/cm}$ ) na 4 °C. Dijalizat je centrifugiran 5 minuta na 5000 x g. Supernatant je nanet na DEAE Sepharose CL – 6B kolonu (1,5 x 6,5 cm) koja je prethodno ekvilibrisana u istom puferu koji je korišćen za dijalizu. Proteini su eluirani gradijentom jonske sile koristeći rastvore NaCl od 0 do 1 M. Protok je bio 30 mL/h. Frakcije po 2 mL su sakupljane i protočnom UV ćelijom detektovani proteini na  $A_{280}$ . U frakcijama je određivana amilazna aktivnost (odeljak 4.2.1.1) tako što su frakcije razblaživane 5 puta, a test je trajao 15 minuta na 35°C.

10 mM acetatni pufer pH 4,5, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 70 mM NaCl:

glacijalna sirćetna kiselina	0,57 mL
$\text{CaCl}_2$	0,22 g
NaCl	4,06 g
1 M NaOH	do pH 4,5
destilovana voda do	1 L

##### 4.4.2.1 Zimogramska detekcija amilaze u frakcijama jonoizmenjivačke hromatografije

Sirovi ekstrakt creva larve bukove strižibube je razblažen 5 puta, pomešan sa PUZ-om i naneto je 10  $\mu$ L na gel za nativnu PAGE (odeljak 4.2.2.1). Frakcije sa amilaznom aktivnošću su razblažene po 5 puta i nanete po 20  $\mu$ L na gel. Po završetku elektroforeze amilaza je detektovana zimogramom kao što je opisano u odeljku

4.2.2.3. Zatim su proteini fiksirani 15 minuta u rastvoru za fiksiranje (odjeljak 4.2.2.1), pa je gel obezbojen od jodnog reagensa u 7% sirćetnoj kiselini preko noći. Proteini su detektovani CBB-om kao što je opisano u odeljku 4.2.2.1.

Frakcije koje su sadržavale samo  $\alpha$ -amilazu su spojene i dijalizovane prema destilovanoj vodi. Takav uzorak je korišćen za karakterizaciju AMF-3.

#### 4.4.3 Karakterizacija AMF-3

##### 4.4.3.1.1 Određivanje molekulske mase AMF-3 gel filtracijom

Molekulska masa AMF-3 je određena gel filtracijom na koloni Superdex 75 (10 x 300 mm) na FPLC sistemu. Pufer za ekvibraciju je bio PBS pH 7,2 a protok 36 mL/h. Frakcije od po 150  $\mu$ L su ispitane na amilolitičku aktivnost. Kolona je kalibrisana standardnim proteinima BSA (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), himotripsinogen (25 kDa) i citohrom c (13 kDa) (GE Healthcare).

Sa kalibracione krive  $\log M_m / K_{av}$  je određena MM AMF-3.

50 mM PBS pH 7,2:

Primarni natrijum-fosfat	6,95 g
NaCl	0,9 g
1 M NaOH	do pH 7,2
destilovana voda do	1 L

##### 4.4.3.1.2 Određivanje molekulske mase AMF-3 SDS PAGE-om

Molekulska masa  $\alpha$ -amilaze je takođe određena i renaturacionom SDS PAGE. Procedura za SDS PAGE je opisana u odeljku 4.2.2.4. Za renaturacionu SDS PAGE za pripremu uzoraka se koristi PUZ koji ne sadrži  $\beta$ -merkaptoetanol i uzorci se ne kuvaju na ključalom vodenom kupatilu, a ostala procedura je ista kao i za SDS PAGE. Korišćen je 10 % AA razdvajajući gel. Kao molekularni markeri korišćeni su proteini poznatih molekularnih masa iz LMW-SDS marker kit, GE Healthcare:  $\alpha$ -laktoalbumin (14,4 kDa), tripsinski inhibitor (20,1 kDa), karboanhidraza (30 kDa), ovalbumin (43 kDa), albumin (67 kDa) i fosforilaza B (97,4 kDa). Posle elektroforeze gel je ispran

vodom tri puta po 2 minuta a zatim inkubiran u 1% Tritonu X-100 45 minuta uz mešanje. Posle toga je amilaza detektovana zimogramom kao što je opisano u odeljku 4.2.2.3 A). Proteini u gelu su fiksirani u rastvoru za fiksiranje 15 minuta, a zatim je gel obezbojen u 7% sirćetnoj kiselini preko noći. Proteini su obojeni CBB-om kao što je opisano u odeljku 4.2.2.1.

Sa kalibracione krive log MM / Rf vrednosti molekulskih standarda je očitana MM AMF-3.

1% Triton X-100:

Triton X-100	1 g
voda do	100 mL

#### **4.4.3.2 Određivanje izoelektrične tačke AMF-3**

pI vrednost AMF-3 je određena IEF-om kiselog pH opsega kao što je opisano u odeljku 4.2.2.2. Na gel za IEF su naneti uzorak prečišćene AMF-3, pI standardi i jedan bunar je ostao prazan. Po završetku IEF-a položaj AMF-3 je određen zimogramom (odeljak 4.2.2.3 B). Deo gela gde nije bilo proteina je isečen od kisele do bazne strane na trake širine 0,5 cm. Svaka traka je prebačena u posebnu epruvetu i preko nje je naliveno po 1 mL prokuvane destilovane vode. Nakon sat vremena je mereno pH. Poređenjem ovih pH vrednosti sa položajem AMF-3 u gelu i položajem pI markera je određena pI vrednost AMF-3.

#### **4.4.3.3 pH optimum AMF-3**

pH optimum je određen merenjem  $\alpha$ -amilazne aktivnosti na različitim pH vrednostima u opsegu od 2,0 do 8,5 sa 0,5 pH jedinica razlike. Amilazna aktivnost je određivana kao što je opisano u odeljku 4.1.3.2 samo što su korišćeni sledeći 50 mM puferi za pravljenje 1% skroba: za pH vrednosti 2,0 i 2,5 glicinski pufer, od 3,0–6,5 acetatni pufer i za pH vrednosti od 6,5–8,5 fosfatni pufer.

#### 50 mM Glicinski pufer:

Gly	0,375 g
voda	do 100 mL

1 M NaOH je korišćen za podešavanje pH za pufer 2,0

1 M HCl je korišćena za podešavanje pH za pufer 2,5

#### 50 mM fosfatni pufer:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 g
voda	do 100 mL

1 M NaOH je korišćen za podešavanje pH puferima od 7,0 do 8,5.

#### **4.4.3.4 Temperaturni optimum AMF-3**

Temperaturni optimum je određen merenjem aktivnosti amilaze na različitim temperaturama opsega od 10°C do 70°C sa razlikom od 10°C. Uzorci (10 µL enzima) su inkubirani u 900 µL 1% skroba u 50 mM acetatnom puferu pH 5,0, 2 mM NaCl i 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> 60 minuta na određenoj temperaturi. Reakcija je prekidana dodatkom 500 µL DNS-a. Aktivnost je dalje određivana na način kako je opisano u odeljku 4.1.4.2.

#### **4.4.3.5 $K_m$ i $V_{max}$ AMF 3**

Početna brzina reakcije je određena upotrebom sedam različitih koncentracija rastvornog skroba: 1, 5, 10, 15, 20, 30 i 40 mg/mL. Reakcije su trajale 30 sekundi na 35°C. Rastvori su pripremani upotrebom određene količine skroba:

Konc skroba	Potrebno za 100 mL
1 mg/mL	0,1 g
5 mg/mL	0,5 g
10 mg/mL	1,0 g
15 mg/mL	1,5 g
20 mg/mL	2,0 g
30 mg/mL	3,0 g
40 mg/mL	4,0 g



Odmereni skrob je rastvoren u acetatnom puferu pH 5,0 i dalje je amilazna aktivnost određena na način kako je opisano u odeljku 4.1.3.2.  $K_m$  i  $V_{max}$  su određeni pomoću GraphPad Prism 3.0 programa, upotrebom ne linerane regresione analize.

#### 4.4.3.6 Uticaj soli na aktivnost AMF 3

Uzorci  $\alpha$ -amilaze su inkubirani sa različitim koncentracijama soli 15 minuta na 35°C pre dodatka supstrata. Reakcija je trajala 30 minuta na 35°C a aktivnost je određena na način koji je već opisan (odeljak 4.1.4.2). Koncentracije soli su date u tabeli:

NaCl (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)
0,005	0,005
0,02	0,02
0,1	0,1
0,5	0,5
2,0	2,0
10,0	10,0
50,0	50,0
250,0	250,0

#### 4.4.3.7 Uticaj pšeničnog inhibitora na aktivnost AMF 3

Za ispitivanje uticaja pšeničnog inhibitora korišćen je ekstrakt pšenice (*Triticum* sp.) koji je pripremljen tako što je samlevena pšenica prelivena sa 3 mM CaCl<sub>2</sub> u odnosu 1:3 (m/V). Ekstrakcija je trajala 3 sata na sobnoj temperaturi uz mešanje. Ekstrakt je centrifugiran 10 minuta na 5000 x g. Dobijeni supernatant je inkubiran na 75°C 1 sat (do inaktivacije pšenične amilaze). Nakon centrifugiranja, dobijeni supernatant je korišćen kao inhibitor u amilaznom testu.

Uzorci AMF-3 (po 10  $\mu$ L) inkubirani su sa 10  $\mu$ L pšeničnog ekstrakta i 5  $\mu$ L (0,1 M PMSF) 10 minuta na 35°C. Zatim je dodato po 475  $\mu$ L 1% skroba u acetatnom puferu pH 5,0 sa 2,0 mM NaCl i 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>. Na isti način je korišćen i ekstrakt pšenice koji je 5 puta razblažen. Reakcija je trajala 24 sata na 35°C. Aktivnost je određena dalje na način koji je opisan u odeljku 4.1.3.2.

#### 4.4.3.8 Aktivnost AMF 3 prema sirovom skrobu

Sirovi skrobovi su izolovani iz pšenice (*Triticum* sp.), krompira (*Solanum tuberosum*), rena (*Armoracia rusticana*) i kukuruza (*Zea mays*) centrifugiranjem i ispiranjem u vodi pa zatim u etanolu 5 puta. Osušeni su na vazduhu na sobnoj temperaturi. Po 10 mg svakog skroba je isprano četiri puta 50 mM acetatnim puferom pH 5,1, 2,0 mM NaCl i 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> u odnosu 1:3 (m/V) sa centrifugiranjem između pojedinačnih inkubiranja. Po 20 µL enzima je pomešano sa skrobom (1%) u 50 mM acetatnom puferu pH 5,1 sa 2,0 mM NaCl i 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> i inkubirano 24 sata na 35°C. Amilazna aktivnost je određena kao što je opisano u odeljku 4.1.3.2.

## 4.5 Prečišćavanje $\alpha$ -amilaze srednjeg creva larve velike hrastove strižibube (*C. cerdo*)

### 4.5.1 FPLC gel hromatografija amilaznih izoformi tri grupe larvi velike hrastove strižibube (*C.cerdo*)

Sirovi ekstrakti srednjeg creva ML, SL i LL (po 250  $\mu$ L) velike hrastove strižibube su frakcionisani na Superose 12 HR (10/30) FPLC koloni. Kolona je prethodno ekvilibrisana sa 20 mM acetat pH 6 + 0.9% NaCl puferom, pri brzini protoka od 0,5 mL/min i pritisku od 1 MPa.  $V_0$  kolone je bio 8 mL. Sakupljenim frakcijama (po 0,5 mL) je određivana amilazna aktivnost kao što je opisano u odeljku 4.1.3.2. Frakcije sa amilaznom aktivnošću su analizirane zimogramski (odeljak 4.2.3.3 A) i SDS PAGE-om (odeljak 4.2.2.4).

20 mM acetatni pufer pH 6 + 0,9% NaCl:

glacijalna sirćetna kiselina	0,57 mL
0,1 M NaOH	do pH 6,0
NaCl	4,5 g
voda do	500 mL

#### 4.5.1.1 Određivanje molekulske mase ACC-2

Kolona je predhodno kalibrisana proteinima poznatih molekulskih masa: BSA – 66,5 kDa, ovalbumin – 44,0 kDa, himotripsinogen – 28,5 kDa i lizozim – 14,4 kDa pod istim uslovima pod kojima su frakcionisani proteini ekstrakta creva ML, SL i LL. Sa grafika  $\log MM / K_{av}$  je određena MM glavnoj izoformi  $\alpha$ -amilaze u sva tri ispitivana uzorka.

#### 4.5.2 Prečišćavanje ACC-2 FPLC gel hromatografijom

2,0 mL supernatanta dobijenog centrifugiranjem ekstrakta creva ML je naneto na kolonu Superose 12 HR 16/50 pri protoku od 0,7 mL/min. Pufer za eluiranje je bio

20 mM acetat pH 6 + 0,9% NaCl (odjeljak 4.4.1).  $V_0$  kolone je bilo 35,7 mL. Sakupljane su frakcije od po 1,05 mL. Postupak je ponovljen sa istom zapreminom uzorka na isti način tako da su frakcije sakupljane jedne preko drugih, te je ukupna zapremina po frakcijama bila 2,1 mL. U sakupljenim frakcijama je određena amilazna aktivnost i zimogramska detekcija. Pozitivne frakcije su sakupljene i rasoljene kako bi se pripremile za sledeći korak izolovanja.

#### 4.5.2.1 Zimogramska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa gel hromatografije

Frakcije su nanete na nativnu PAGE (odjeljak 4.2.2.1) i amilaza je detektovana zimogramom (odjeljak 4.2.2.3), a proteini bojeni CBB-om. Naneto je po 10  $\mu$ L svakog uzorka na gel za EF. Početni uzorak je razblažen 5 puta pre mešanja sa PUZ-om a frakcije 53 i 54 dva puta.

#### 4.5.2.2 Renaturacioni SDS PAGE frakcija sa gel hromatografije

Frakcije sa gel hromatografije su elektroforetski razdvajane renaturacionim SDS PAGE i amilaza je detektovana zimogramom, kao što je opisano u odeljku 4.4.3.1.2. Nakon toga su proteini obojeni CBB-om (4.2.2.1). Korišćen je 12% AA razdvajajući gel.

*Priprema gela:*

rastvori	gel za razdvajanje (12%)	gel za koncentrovanje (4%)
AA	4,0	0,66
Tris pH 8,8	3,0	-
Tris pH 6,8	-	1,25
destilovana voda	4,8	3,0
temed	0,0048	0,005
	dezaeracija 5–10 minuta	
SDS	0,12	0,05
APS	0,06	0,025
finalna zapremina	10,0 mL	5,0 mL

Svih uzoraka je naneto po 30  $\mu$ L. Početni uzorak, 53 i 54 su razblaženi 5 puta pre mešanja sa PUZ-om. Poređenjem Rf vrednosti za molekulske standarde i Rf vrednosti  $\alpha$ -amilaze (koja je određena zimogramom) određena je MM ACC-2.

#### **4.5.3 FPLC Jonoizmenjivačka hromatografija ACC-2**

Amilazne frakcije dobijene gel filtracijom (ukupno 17 mL) su nanete na kolonu Q Sepharose FF – XK 16/10 pri protoku od 1,5 mL/min i frakcionisane korišćenjem FPLC sistema. Kao polazni pufer korišćen je 20 mM acetat pH 4,5 i provodljivost 780  $\mu$ S/cm. Vezani proteini su eluirani gradijentom jonske sile od 0 M do 0,5 M NaCl u istom puferu. Sakupljane su frakcije od po 3 mL, koje su testirane na amilaznu aktivnost.

##### **4.5.3.1 Zimograska detekcija amilaznih izoformi u frakcijama sa jonoizmenjivačke hromatografije**

Frakcije su nanete na nativnu PAGE (odjeljak 4.2.2.1) i amilaza je detektovana zimogramom (odjeljak 4.2.2.3). Naneseno je po 30  $\mu$ L na gel za EF (10% AA razdvajajući gel). Sirovi ekstrakt je razblažen 10 puta pre mešanja sa PUZ-om.

Nakon zimogramske detekcije proteini su **bojeni srebrom** po proceduri datoj u tabeli:

rastvori	vreme (min)
1. Ispiranje destilovanom vodom	1
2. 50% metanol, 20% TCA, 2% CuCl <sub>2</sub> (100 mL, 40 g, 4 g do 200 mL vode)	15
3. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina (100 mL, 50 mL u 1L dest. vode)	10
4. 0,01% KMnO <sub>4</sub> (0,1 g u 1 L dest. vode)	10
ispiranje 2 puta destilovanom vodom	1
5. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina	10
6. 10 % etanol (100 mL etanola u 1 L dest. vode)	10
ispiranje 2 puta destilovanom vodom	1
7. destilovana voda	10
8. 0,1% AgNO <sub>3</sub> (0,2 g u 200 mL dest. vode)	10
ispiranje destilovanom vodom	20 sekundi
9. 10% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (20 g u 200 mL dest. vode)	1
10. 2% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,01 % formaldehid (10 g K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 125 µL HCHO u 500 mL destilovane vode)	do pojave traka
11. 10% etanol, 5% sirćetna kiselina	20 sekundi
ispiranje destilovanom vodom	20 sekundi
12. čuvanje u 0,02% K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,2 g K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> u 1L dest. vode)	neograničeno

Gel se boji u staklenoj šolji. Tehnika detekcije je jako osetljiva i gel se tokom rada ne sme dodirivati rukama. Kratko se ispere destilovanom vodom (1 minut). Rastvori za korake 8 i 10 se prave neposredno pre upotrebe. Za sve faze rada koristi se veoma čisto posuđe, bidestilovana voda i predestilovani rastvarači. Za svaki korak koristi se oko 200 mL rastvora po gelu, izuzev za korak 3.

## 5 LITERATURA

1. Selye, H., *Nature*, **138**, 32 (1936)
2. Ivanović, J., U: Hormones and metabolism in insect stress: Metabolic response to stressors, urednici: Ivanović, J., Janković-Hladni, M., CRC Press, Boca Raton, 27-69 (1991).
3. Ivanović, J., Janković-Hladni, M., Nenadović, V., Frušić, M., Satnić, V., U: Endocrinological Frontiers in Physiological Insect Ecology: Endocrinological and biochemical aspects of stress and adaptation of phytophagous insects to environmental changes, urednici: Sehnal, F., Zabza, H., Denlinger, D. L., Technical University Press, Wroclow, 141-159 (1988).
4. Gullan, P.J., Cranston, P.S., *The insects: an outline of entomology*, drugo izdanje. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. (2005).
5. Ilić, N., Longhorn beetles (Coleoptera, Cerambycidae) from Serbia. Faunistic review, SZGR«Joksimović», Belgrade [in Serbian] (2005)
6. Bobić, M., Koleoptere u Kruševcu i okolini (jedan prilog za građu faune Kraljevine Srbije). *Nastavnik*, 2 (1-6), Beograd (1891).
7. Gillot, C., U: *Entomology, The Remaining Endopterygote Orders*, treće izdanje, Springer Netherlands, Dordecht, 305-306 (2005).
8. <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/13875/0>
9. Campanaro, A., Bardiani, M., Spada, L., Carnevali, L., Montalto, F., Antonini, G., Audisio, P., Mason, F., Book of abstracts, 6th European symposium on the conservation of saproxylic beetles, Ljubljana, str 14-15 (2010).
10. Ambrožič, Š., Kapla, A., Vrezec, A., Book of abstracts, 6th European symposium on the conservation of saproxylic beetles, Ljubljana, str 16 (2010).
11. Vrezec, A., Ambrožič, Š., Kapla, A., Book of abstracts, 6th European symposium on the conservation of saproxylic beetles, Ljubljana, str 20-21 (2010).
12. Ivanović, J., *Zbornik za prirodne nauke*, **35**, 108-123(1968).
13. Polak, S., Book of abstracts, 6th European symposium on the conservation of saproxylic beetles, Ljubljana, str 19 (2010).

14. Ivanović, J., Janković – Hladni, M., Milanović, M., *Comp. Biochem. Physiol.*, **50A**, 125-130 (1975).
15. Stanić, V., Ivanović, J., Janković – Hladni, M., Nenadović, V., Marović R., *Acta Entomol. Jug.*, **21**, 87-94 (1985).
16. Nenadović, V., Ivanović, J., Stanić, V., Janković – Hladni, M., *Acta Entomol. Jug.*, **22**, 39-45 (1986).
17. Ivanović, J., U: Hormones and metabolism in insect stress: Metabolic response to stressors, urednici: Ivanović, J., Janković-Hladni, M., CRC Press, Boca Raton, 27-69 (1991).
18. Janković – Hladni, M., Chen, A., Ivanović, J., Đorđević, S., Stanić, V., Perić, V., Frusić, M., *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **20**, 205-214 (1992).
19. Đorđević, S., Nenadović, V., Ivanović, J., *Comp. Biochem. Physiol.*, **122A**, 191-198 (1999).
20. Leković, S., Lazarević, J., Nenadović, V., Ivanović, J., *Eur. J. Entomol.*, **98**, 13-18 (2001).
21. <http://www.arkive.org/cerambyx-longicorn/cerambyx-cerdo/range-and-habitat.html>
22. Kimoto, T., Duthie-Holt, M. U: Exotic forest Insect Guidebook: *Cerambyx cerdo* Linnaeus - Great Capricorn beetle, Her Majesty in Right of Canada (Canadian Food Inspection Agency), 30-32 (2006).
23. Martin, J., Cabezas, J., Buyolo, T., Paton, D., *Forest Ecol. Management*, **216**, 166-174 (2005).
24. Lista Ekonomski štetnih organizama, insekti (4.2.2). Službeni glasnik Republike Srbije, **25** (2008)
25. O'Toole C., *The New Encyclopedia of Insects*, Oxford University Press, Oxford (2002).
26. Antry, E.S., *IOBC/WPRS Bull*, **22** (3) (1999).
27. Bily, S., Mehl., O., U: *Fauna Entomologica Scandinavica*, Longhorn Beetles (Coleoptera: Cerambycidae) of Fennoscandia and Denmark, **22**, New York (1989).
28. Buse, J., Ranius, T., Assmann, T., *Conserv. Biol.*, **22**, 329-337 (2008).



29. Nenadović, V., Janković-Hladni, M., Ivanović, J., Stanić, V., Marović, R., *Acta Entomol. Jug.*, **18**, 91-96 (1982).
30. Nenadović, V., Janković-Hladni, M., Prolić, Z. i Ivanović, J., u: Zaštita bilja danas i sutra, urednici: Šestović, M., Nešković, N.K. i Perić, I., Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd (1994).
31. Nenadović, V., Prolić, Z., Lazarević, J., Al Arid, L., Ivanović, J. *Acta Veterinaria*, **49**, 105-116 (1999).
32. Red List of Threatened Species, <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist>.
33. Decree on protection of Natural Rarities, Službeni glasnik Republike Srbije 50 (1993).
34. Adamović, Ž., *Glasnik Prirodnjačkog muzeja srpske zemlje*, **20**, 147-183 (1965).
35. Lewis, O.T., Thomas, C.D., *J. Insect Conserv.*, **5**, 55-63 (2001).
36. Pearce-Kelly, P., Jones, R., Clarke, D., Walter, C., Atjin, P., Cunningham, A.A., *J. Insect Conserv.*, **2**, 201-210 (1998).
37. Miklin, J., Kment, J., Riedl, V., Čížek, L., Book of abstracts, 6th European symposium on the conservation of saproxylic beetles, Ljubljana, 48 (2010).
38. Platek, M., Čížek, L., Book of abstracts, 6th European symposium on the conservation of saproxylic beetles, Ljubljana, 24 (2010).
39. Stanić, V., Janković-Hladni, M., Ivanović, J., Nendaović, V., *Entomol. Exp. Appl.*, **51**, 261-267 (1989).
40. Ivanović, J., Janković – Hladni, M., Stanić, V., Nenadović, V., Frušić, M., *Comp. Biochem. Physiol*, **94A**, 167-171 (1989).
41. Đorđević, S., Ivanović, J., Janković- Hladni, M., *Comp. Biochem. Physiol.*, **111A**, 139-145 (1995).
42. Ivanović, J., Janković-Hladni, M., Stanić, V., Kalafatić, D. *Acta Entomol. Jug.*, **21**, 75-78 (1985).
43. Ivanović, J., Janković-Hladni, M., Đorđević, S., Stamenković, S., Lazarević, J. 1992. *J. Insect Physiol.*, **38**, 877-883 (1992).
44. Lončar, N., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J., Vujčić, Z., *Arch. Insect Bioch.*, **74**, 232-146 (2010).

45. Nation, J., U: *Insect Physiology and Biochemistry, Digestion*, drugo izdanje, CRC Press, Boca Raton, 29-69 (2008).
46. Ratte, H.T., 1985. U: *Environmental Physiology and Biochemistry of insects, Temperature and insect development*, urednik Hoffmann, K.H., Springer-Verlag, Berlin, 33-66 (1985).
47. Hagstrum, D.W., Milliken, G.A., *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **81**, 539-546 (1988).
48. Wagner, T.L., Olson, R.L., Willers, J.L., *J. Agr. Entomol.* **8**, 251-270 (1991).
49. Yoon, H., Mah, Y., *J. Asia-Pacific Entomol.*, **2**, 169-173 (1999).
50. Wang, Q., Shi, G., Song, D., Rogers, D., Davis, L., Chen, X., *J. Ecol. Entomol.*, **95**, 563-569 (2002).
51. Keena, M.A., *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **98**, 536-547 (2005).
52. Rogers, D., Lewthwaite, S., Dentener, P., *N. Z. J. Zool.*, **29**, 303-310 (2002).
53. Lee, C.Y., Lo, K.C., *Appl. Entomol. Zool.*, **33**, 105-109 (1998).
54. Caldeira, W., Dias, A., Terra, W., Ribeiro A., *Arch. Insect Biochem.*, **64**, 1-18 (2007).
55. Richards, A.G., Richards, P.A., *Annu. Rev. Entomol.*, **22**, 219-240 (1977).
56. Peters, W., *Peritrophic membranes*, Berlin, Springer-Verlag, 238 (1992).
57. Lehane, M., *Annu. Rev. Entomol.*, **42**, 525-550 (1997).
58. Terra, W., *Arch. Insect Biochem.*, **47**, 47-61 (2001)
59. Bolognesi, R., Terra, W., Ferreira, C., *J. Insect Physiol.*, **54**, 1413-1422 (2008).
60. Ferreira, C., Capella, A.N., Sitnik, R., Terra, W., *Arch. Insect Biochem.*, **26**, 299-313 (1994).
61. Jordão, B.P., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., *J. Insect Physiol.*, **45**, 29-37 (1999).
62. Bolognesi, R., Ribeiro, A., Terra, W., Ferreira, C., *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **47**, 62-75 (2001).
63. Terra, W., Ferreira, C., U: *Encyclopedia of Insects, Digestive System*, editori: Resh, V.H., Cardé, R.T., Academic Press, San Diego, 313-322 (2003).
64. Terra, W.R., Ferreira, C., (1994). *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**, 1-62 (1994).

65. Zverlov, V.V., Höll, W., Schwarz, W.H., 2003. *Int. Biodeter. Biodeg*, **51**, 175-179 (2003).
66. Ivanović, J., Milanović, M., *Zbornik za prirodne nauke*, **39**, 171-175 (1970).
67. Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W., *J. Insec Physiol.*, **47**, 143-155 (2001).
68. Terra, W.R., Ferreira, C., Baker, J.E., U: *Biology of the Insect Midgut, Compartmentalization of digestion*, editori: Lehane MJ, Billingsley PF, Chapman & Hall, London, 206-235 (1996).
69. Terra, W.R. i Ferreira, C., *J. Insect Physiol.*, **27L**, 325–331 (1981).
70. Terra, W.R., Ferreira, C., Jordão, B.P, Dillon, R.J., U: *Biology of the Insect Midgut, Digestive enzyme*, editori: Lehane MJ, Billingsley PF, Chapman & Hall, London, 153-194 (1996).
71. Terra, W., Ferreira, C., U: *Comprehensive Molecular Insect Science, Biochemistry and Molecular Biology, Biochemistry of digestion*, **4**, editori: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S., Pergamon, 171-212 (2004).
72. Jordao, B.P., Lehane, M.J., Terra, W.R., Ribeiro, A.F., Ferreira, C., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 445–453 (1996).
73. Blakemore, D., Williams, S., Lehane, M., *Comp. Biochem. Physiol.*, **110B**, 301-307 (1995).
74. Lehane, M., Blakemor, D., Williams, S., Moffat, M., *Comp. Biochem. Physiol.*, **110B**, 285-289 (1995).
75. Ivanović, J., Janković-Hladni, M., Milanović, M., u: *Neurosecretion and Neuroendocrine Activity; Evolution, Structure and Function*, urednici: Bergman, W., Oksehe, A., Polenov, A. i Schorrer, B., Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin (1978).
76. Biagio, F., Tamaki, F., Terra, W., Ribeiro, A.. *J Insect Physiol.*, **55**, 1125-1133 (2009).
77. Caldeira, W., Dias, A., Terra, W., Ribeiro, A., *Arch. Insect Biochem.*, **64**, 1-18 (2007).
78. Weber, M., Darzens, D., Coulombel, C., Foglietti, M.J., Chararas, C., *Comp. Biochem. Physiol.*, **80B**, 57-60 (1985).

79. Lemos, F.J.A., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **23**, 533–541 (1993).
80. Mendiola–Olaya, E., Valencia–Jiménez, A., Valdés–Rodríguez, S., Délano–Frier, J., Blanco–Labra, A., *Comp. Biochem. Physiol.*, **126B**, 425–433 (2000).
81. Cinco-Moroyoqui, F., Diaz-Malvárez, F., Alanis-Villa, A., Barrón-Hoyos, J., Cárdenas-López, J., Cortez-Rocha, M., Wong-Corral, F., *Comp. Biochem. Physiol.*, **150B**, 153–160 (2008).
82. Nishimoto, M., Kubota, M., Tsuji, M., Mori, H., Kimura, A., Matsui, H., Chiba, S., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **65**, 1610–1616 (2001).
83. Grossmann, G.A., Terra, W.R., *Comp. Biochem. Physiol.*, **128B**, 109–122 (2001).
84. Su, Z.H., Sato, Y., Yamashita, O., *Biochim. Biophys. Acta*, **1173**, 217–224 (1993).
85. Li, X., Yan, X., Luo, Y., Tian, G., Sun, H., *For. Stud. China*, **10**, 27–31 (2008).
86. Santos, C.D., Terra, W.R., *Insect Biochem.*, **16**, 819–824 (1986).
87. Shen, Z., Reese, J.C., Reeck, G.R., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 427–433 (1996).
88. Dootsdaar, H., McCollum, T.G., Mayer, R.T., *Comp. Biochem. Physiol.*, **118B**, 861–867 (1997).
89. Girard, C., Jouanin, L., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 1129–1142 (1999).
90. Tellam, R.L., Wijffels, G., Willadsen, P., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 87–101 (1999).
91. Royer, V., Fraichard, S., Bouhin, H., *Biochem. J.*, **366**, 921–928 (2002).
92. Regel, R., Matioli, S.R., Terra, W.R., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **28**, 309–319 (1998).
93. Lee, S., Kim, S.R., Yoon, H.J., Kim, I., Lee, K.S., Je, Y.H., Lee, S.M., Seo, S.J., Sohn, H.D., Jin, B.R., *Comp. Biochem. Physiol.*, **139B**, 107–116 (2004).
94. Bifano, T., Alegria, T., Terra, W., *Com. Biochem. Physiol.*, **157 B**, 1–9 (2010).
95. Leuchs, E.F., *Arch. Gesam. Natur. (Arch. All Sci.)*, **21**, 105–107 (1831).
96. History of biology,  
[http://www.normalesup.org/~adanchin/history/dates\\_1800.html](http://www.normalesup.org/~adanchin/history/dates_1800.html)
97. Payen, A., Persoz, J.F. *Ann. Chimie Physique*, **53**, 73–92 (1833).

98. A History of Fermentation and Enzymes,  
<http://users.navi.net/~rsc/cancer/enzymhis>.
99. Beijerinck, M.W., *Centr. Bakteriolog. Parasitenk.*, **1**, 221 (1895).
100. History of Enzymes, [http://www.mapsenzymes.com/History\\_of\\_Enzymes.asp](http://www.mapsenzymes.com/History_of_Enzymes.asp)
101. Meyer, K.H., Fischer, E.H., Bernfeld, P., *Experientia*, **3**, 106-107 (1947).
102. Janković, M., Ivanović, J., Marinković, D., *Archiv. Biol. Sci.*, **18**, 39-45 (1967).
103. Bernfeld, P., U: *Advances In Enzymology And Related Subjects Of Biochemistry, Enzymes Of Starch Degradation And Synthesis*, **12**: 379-428 (1951).
104. Beaupoil-Abadie, B., Raffalli, M., Cozzone, P., Marchis-Mouren, G., *Biochim. Biophys. Acta*, **297**, 436-439 (1973).
105. Granger, M., Abadie, B., Marchis-Mouren, G., *F.E.B.S. Lett.*, **56**, 189-193 (1975).
106. Steer, M., Tal, N., Levitzki, A., *Biochim. Biophys. Acta*, **334**, 389-392 (1974).
107. Levitzki, A., Steer, M., *Eur. J. Biochem.*, **41**, 171-175 (1974).
108. Božić, N., Ruiz, J., López-Santín, J., Vujčić, Z., *Biochem. Eng. J.*, doi:10.1016/j.bej.2010.10.014, (2010).
109. Czaja, A.T., *Taxon*, **27**, 463-470 (1978).
110. Cortella, A.R., Pochettino, M.L., *Econ. Bot.*, **48**, 171-181 (1994).
111. Kozolowski, T.T., *Bot. Rev.*, **58**, 107-222 (1992).
112. Nikitin, N.I., *Khimia drevesiny i tsellulosa*, Izy. Akad. Nauk. SSSR, Moskva, 376-391.
113. Pallardy, S., U: *Physiology of woody plants, Carbohydrates*, treće izdanje, Academic press, Elsevier, Burlington, 199-215 (2007).
114. Haddad, Y., Clair-Maczulajtys, D., Bory, D., *Tree Physiol.*, **15**, 135-140 (1995).
115. Campbell, W.G., *Biochem. J.*, **XXIX**, 1068-1080 (1935).
116. Shigo, A.L., Gregory, G.F., Campana, R.J., Dudzik, K.R., Zimel, D M., *Can. J. For. Res.* **16**, 204-210 (1986).
117. Keilin, D., Hartree, E.F., *Biochem. J.*, **42**, 230-238 (1948).

118. Dojnov, B., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J., Vujčić, Z. *Comp. Biochem. Physiol.*, **149B**, 153-160 (2008).
119. Bernfeld, P., U: Methods in enzymology, Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$ , editor: De Murray, P., I. Deutcher Acad. Press INC, San Diego, 149-158 (1955).
120. Coultate, T., U: Food: the chemistry of its components, Sugars, četvrto izdanje, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 7-19 (2002)
121. Swanson, M.A., *J. Biol. Chem.*, **172**, 825-837 (1948).
122. Briggs, D.E., *J. Inst. Brew.*, **67**, 427-431 (1961).
123. Sandstedt, R., Kneen, E., Blish, M., *J. Cereal Chem.*, **18**, 237-239 (1941).
124. Allan, B., Zager, N., Keller, P., *Arch. Biochem. Biophys.*, **136**, 529-540 (1970).
125. Lamberts, B.L., Meyer, T.S., Osborne R.M., *Arch. Oral Biology*, **16**, 517-526, (1971).
126. Mulimani, V.H., Thippeswamy, S., *Biochem. Mol. Biol. Edu.*, **29**, 250-254 (2001).
127. Baker, J., *Insect Biochem.*, **13**, 421-428 (1983).
128. Louati, H., Zouari, N., Fendri, A., Gargouri, Y., *J. Chromatogr. B*, **878**, 853-860 (2010).
129. Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P., Ary, M.B., *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 51-57 (1989).
130. Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M.F., Isejima, E.M., DaMatta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **31**, 41-50 (2001).
131. Ramzi, S., Hosseinaveh, V., *J. Asia-Pacific Entomol.*, **13**, 215-219 (2010).
132. Priya, S., Kaur, N., Gupta, A., *Pestic. Biochem. Phys.*, **98**, 231-237 (2010).
133. Božić, N., Vujčić, Z., Nenadović, V., Ivanović, J., *Biochem. Physiol.*, **149B**, 454-462 (2008).
134. Silvanovich, M., Hill, R., *Cereal Chem.*, **54**, 1270-1281 (1977).
135. Podoler, H., Applebaum, S.W., *Biochem. J.*, **121**, 317-320 (1971).
136. Baker, J., *Insect Biochem.*, **21**, 303-311 (1991).
137. Chipoulet, J.M., Chararas, C., *Comp. Biochem. Physiol.*, **80B**, 241-246 (1985).

138. Mehrabadi, M., Bandani, A.R., Saadati, F., Ravan, S., *J. Asia-Pacific Entomol.*, **12**, 79-83 (2009).
139. Elpidina, N.E., Vinokurov, S.K., Gromenko, A.V., Rudenskaya, A.Y., Dunaevsky, E.Y., Zhuzhikov, P.D., *Arch. Insect Biochem.*, **48**, 206-216 (2001).
140. Applebaum, S.W., Janković, M., Birk, Y., *J. Insect Physiol.*, **7**, 100-108 (1961).
141. Nagaraju, J., Abraham, E.G., *Comp. Biochem. Physiol.*, **110B**, 201-109 (1995).
142. Jbilou, R., Amri, H., Bouayad, N., Ghailani, N., Ennabili, A., Sayah, F., *Bioresource Technol.*, **99**, 959-964 (2008).
143. Franco, O., Rigden, D., Melo, F., Grossi-de-Sa, M., *Eur. J. Biochem.*, **269**, 397-412 (2002).
144. Valencia, A., Bustillo, A.E., Ossa, G.E., Chrispeels, M., *Insect Bioch. Mol. Biol.*, **30**, 207-213 (2000).
145. Silva, C.P., Terra, W.R., de Sá, M.F.G., Samuels, R.I., Isejima, E.M., Bifano, T.D., Almeida J.S., *J. Insect Physiol.*, **47**, 1283-1290 (2001).
146. Cinco-Moroyoqui, F., Rosas-Burgos, E., Borboa-Flores, J., Cortez-Rocha, M. *J. Econ. Entomol.*, **99**, 2146-2150 (2006).
147. Schuler, H.T., Poppy, M.G., Kerry, B.R., Denholm, L., *Trends Biotechnol.*, **16**, 168-174 (1998).
148. Ryan, C.A., *Annu. Rev. Phytopathol.*, **28**, 425-449 (1990).
149. Sales, M.P., Gerhard, I.R., Grossi-de-Sa, M.F., Xavier-Filho, J., *Plant Physiol.*, **124**, 515-522 (2000).
150. Bishop, J.G., Dean, A.M., Mitchell-Olds, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5322-5327 (2000).
151. Bryant, J.P., Raffa, K.A., U: Plant Stress: Physiology and Functional Morphology, Chemical antiherbivore defense, editor: Gartner, B.L., Academic Press, San Diego. 365–381 (1995).
152. Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Bloch, Jr.C., Silva, C.P., Grossi de Sa, M.F., *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1466-1473 (2000).
153. Feng, G.H., Richardson, M., Chen, M.S., Kramer, K.J., Morgan, T.D., Reeck, G., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 419-426 (1996).

154. Sanchez-Monge, R., Gomez, L., Garcia-Olmedo, F., Salcedo, G., *Eur. J. Biochem.*, **183**, 37-40 (1989).
155. Wagner, T.L., Olson, R.L., Willers, J.L., *J. Agr. Entomol.*, **8**, 251-270 (1991).
156. Ivanović, J., *Arch. Biol. Sci.*, **20**, 53-57 (1970).
157. Ivanović, J., Milanović, M., *Ekologija*, **2**, 177-188 (1967).
158. Ivanović, J., Marinković, D., *Genetika*, **2**, 105-111 (1970).
159. Sauberlich, H.E., Chang, W.Y., Salmon, W.D., *J. Nutr.*, **51**, 241 – 250 (1953).
160. Watson, T.G., *J. Gen. Microbiol.*, **96**, 263-268 (1976).
161. Linit, M.J., *Ann. Entomol. Soc. Amm.*, **78**, 212-213 (1985).
162. Hanks, L.M., McElfresh, J.S., Millar, J.G., Paine, T.D., *Entomol. Soc. Am.*, **7**, 96-102 (1993).
163. Michaud, J.P., Grant, A.K., *J. Insect Sci.*, **5**:25, 1-15 (2005).
164. Silva, C., Terra, W., Xavier-Filho, J., Grossi de Sa, M., Lopes, A., Pontes, E., *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **29**, 355-366 (1999).
165. Bradford, M.M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1976).
166. Davis, B.J., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404– 427 (1964).
167. Laemmli, U.K., *Nature*, **227**, 680-685 (1970).
168. Ilijin, L., Janković-Tomanović, M., Mrdaković, M., Vlahović, M., Perić-Mataruga, V., Lazarević, J., Nenadović, V., *Arch. Biol. Sci.*, **56**, 9-13 (2004).
169. Lončar, N., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J., Vujčić, Z., *Arch. Biol. Sci.*, **61**, 713-718 (2009).
170. Božić, N., Vujčić, Z., Nenadović, V., Ivanović, J., *Comp. Biochem. Physiol.*, **134B**, 231-234 (2003).
171. Gillot, U: *Entomology, Food Uptake and utilization.*, treće izdanje, Springer Netherlands, Dordrecht, 487-513 (2005).
172. Tomić-Carruthers, N., *J. Econ. Entomol.*, **100**, 1062-1070 (2007).
173. Ivanović, J., Đorđević, S., Ilijin, L., Janković – Tomanić, M., Nenadović, V., *Comp. Biochem. Physiol.*, **132A**, 555-566 (2002).
174. Dojnov, B., Lončar, N., Božić, N., Nenadović, V., Ivanović, J., Vujčić, Z., *Arch. Biol. Sci.*, **62**, 575-583 (2010).
175. Lombraña, M., Suárez, P., San Juan, F., *Comp. Biochem. Physiol.*, **142B**, 56-66 (2005).



176. Podoler, H., Applebaum, S.W., *Biochem J*, **121**, 321-325 (1971).
177. Buonocore, V., Poerio, E., Silano, V., Tomasi, M., *Biochem J*, **153**, 621-625 (1976).
178. Ziegler, P., *Plant Physiol.*, 86, 659-666 (1988).
179. Vallee, B.L., Stein, E.A., Sumerwell, W.N., Fischer, E.H., 1959. *J. Biol.Chem.*, **234**, 2901-2905 (1959).
180. Shainkin, R., Birk, Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **35673**, 502-513 (1970).

## BIOGRAFIJA

*Biljana Dojnov, rođ. Stajković, je rođena 31.08.1975. godine u Beogradu, Republika Srbija. Diplomirala je na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani biohemičar, 2000. godine. 2005. godine je odbranila specijalistički rad pod nazivom „Imunohemijska detekcija kandidoze kombinovanim ekstraktom antigena Candida albicans”. 2008. godine je odbranila magistarsku tezu pod nazivom „Dobijanje i standardizacija kombinovanog ekstrakta citosolnih i zidnih antigena kvasca Candida albicans za imunoblot“.*

*Član je Srpskog hemijskog društva, Srpskog biohemijskog društva, FEBS-a i Evropskog biotehnološkog društva.*

*Do sada je objavila 8 radova u međunarodnim časopisima, 3 u časopisima kategorije M21, 4 u časopisima kategorije M23 i jedan iz kategorije M51; dva saopštenja na skupovima međunarodnog značaja i 5 na skupovima nacionalnog značaja.*

Прилог

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Потписани/а

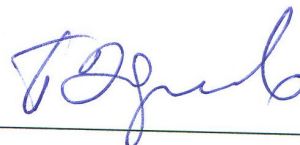
Изјављујем да је електронска верзија моје докторске дисертације

**Амилазе средњег црева ларви букове стрижибубе (*Morimus funereus*) и  
велике храстове стрижибубе (*Cerambyx cerdo*)**

коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума  
Универзитета у Београду** истоветна штампаној верзији која се налази у фонду  
Универзитетске библиотеке „Светозар Марковић“.

У Београду, 21.05.2014.

Потпис



---

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Дојнов, Биљана

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Амилазе средњег црева ларви букове стрижибубе (*Morimus funereus*) и велике хростове стрижибубе (*Cerambyx cerdo*)

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 03.04.2014.



---

Прилог 2.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Амилазе средњег црева ларви букове стрижибубе (*Morimus funereus*) и велике храстове стрижибубе (*Cerambyx cerdo*)**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (*Creative Commons*) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 03.04.2014.

Потпис

