

Aplicación industrial de la biotecnología de insectos

Alfonso Juárez Olvera y López Ortiz Oscar Emiliano. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.



Resumen

El empleo de insectos posee potenciales aplicaciones en la industria biotecnológica y alimenticia, ya que las propiedades características de la fisiología de diversas especies, así como de los órganos altamente especializados que poseen, permite que puedan ser empleados como una alternativa al uso común que se posee en la actualidad de microorganismos dentro de la industria, ya que las características de la especie particular permite obtener moléculas útiles para mimetizar

Introducción

Los insectos son la clase animal taxonómica más diversa de la tierra, colonizando casi todos los nichos ecológicos del planeta. Para sobrevivir en varios hábitats, los insectos han establecido diversos sistemas biológicos y químicos para la producción de moléculas de defensa, proteínas estabilizadoras o enzimas líticas [1]. Los componentes principales para estos sistemas son enzimas que les permiten a los insectos alimentarse de diferentes fuentes nutritivas. El uso de estas enzimas para aplicaciones tales como el área alimenticia y el área industrial ha obtenido gran importancia para su estudio [1].

Ejemplos prominentes de enzimas derivadas de insecto son, peptidasas, amilasas, lipasas y β -D-glucosidasas. Las peptidasas altamente potentes sirven para la degradación del gluten, una proteína de almacenamiento que puede causar trastornos intestinales, pueden ser recibidas de plagas de granos [2].

Insectos de corteza, escarabajos ambrosia y termitas, son capaces de alimentarse de la madera

de los árboles. En el campo de la biotecnología blanca, sus sistemas enzimáticos celulolíticos, principalmente de endo-1,4- β -D-glucanasas y β -D-glucosidasas, pueden emplearse para la sacarificación del polímero más prominente sobre la tierra, celulosa [2].

Enzimas en la industria alimenticia

Las enzimas son herramientas indispensables para la producción de varios productos alimenticios así también para la síntesis de aditivos, vitaminas y saborizantes. Las enzimas juegan un papel crucial en la conservación de comida, la eliminación de componentes tóxicos o factores no nutritivos [3].

El aumento de personas que sufren intolerancias o alergias, ha liderado la búsqueda de enzimas con nuevas propiedades en un campo fértil de investigación para la solución de estos problemas [3].

Hasta ahora las enzimas utilizadas en la producción de alimentos han sido obtenidas de bacterias, hongos, plantas y mamíferos.

Tabla 1 Habilidad de los insectos para hidrolizar proteínas de alimentos en zimogramas

Plaga de grano	Caseína	Gluten	Proteína del arroz
<i>Alphitobius diaperinus</i>	+	+	n.d.
<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	+	+	+
<i>Rhizopertha dominica</i>	+	+	n.d.
<i>Sitophilus granaries</i>	n.d.	n.d.	+
<i>Tenebrio molitor</i>	+	+	+
<i>Tribolium castaneum</i>	-	-	+

+ positivo, - negativo, n.d. no determinado Fuente: Mika, N., Zorn, H., & Rühl, M. (2013). *Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology*. In *Yellow Biotechnology II* (pp. 1-17). Springer Berlin Heidelberg.

Plagas de granos

Los Coleópteros (escarabajos) representan la mayor biodiversidad de todas las criaturas. Las plagas de cereales en particular están distribuidas a nivel mundial. Con un ciclo de vida corto de sólo 3-4 semanas, muchas plagas de granos son fáciles de mantener en el laboratorio [3]. Debido a que las plagas de granos dependen de las mismas fuentes de alimento que los seres humanos, sus estrategias para digerir las proteínas

de la semilla pueden ser copiadas, como para la producción de alimentos sin gluten [4].

El grupo de plagas de granos incluye *Sitophilus granarius*, *Rhizopertha dominica*, *Oryzaephilus surinamensis*, *Alphitobius diaperinus* y *Tribolium castaneum* (Figura 1).

Las plagas de granos producen varias hidrolasas, incluyendo glicosidasas y peptidasas, para la degradación de carbohidratos y proteínas de almacenamiento, para satisfacer su demanda de carbono y nitrógeno [5]. Se ha detectado

actividad de α -amilasa en plagas de granos diferentes, como *Helicoverpa armigera*, *Eurygaster integriceps*, y en el bien estudiado *T. castaneum* [5].

Además, se han descubierto varias exo y endo-peptidasas en numerosos insectos que se

alimentan de cereales: tripsina y quimotripsina tipo peptidasas en *Plodia interpunctell*, una cisteína peptidasa en *Tenebrio molitor*, y serina peptidasas en *Prostephanus trunca*. Una de las plagas de grano mejor caracterizadas es el gusano amarillo de la harina, *T. molitor* [5].

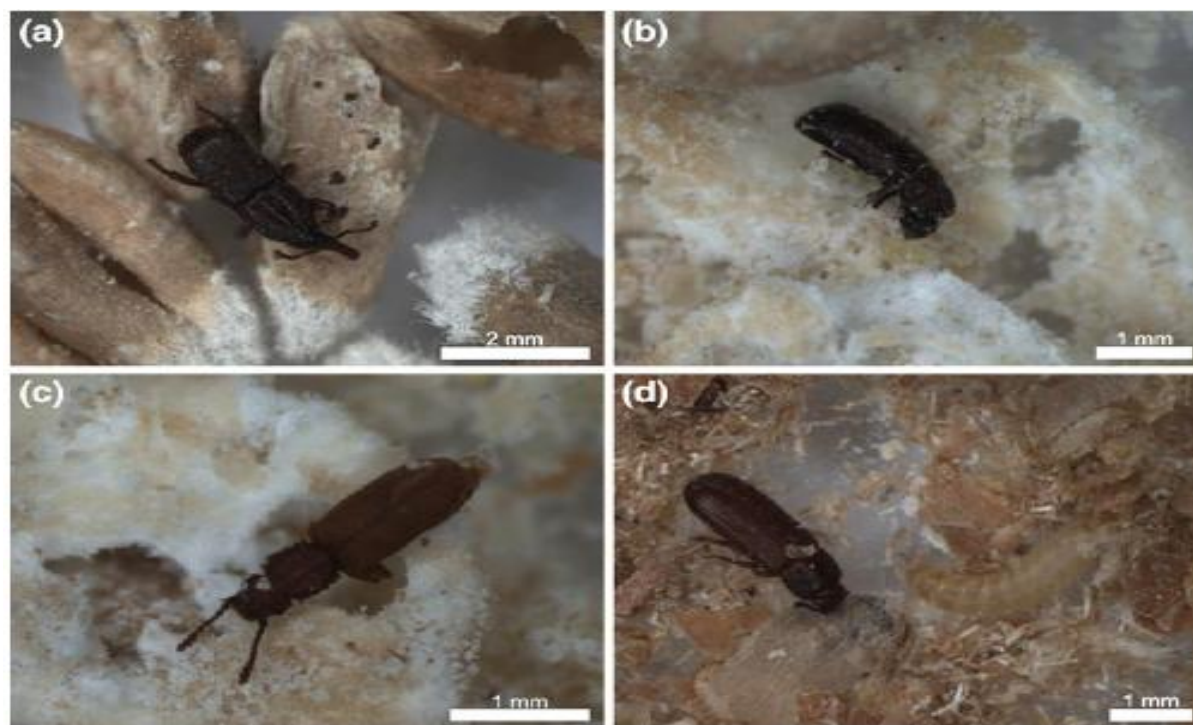


Figura 1 ejemplos de plagas de grano: *S. granaries* (a), *R. dominica* (b), *O. surinamensis* (c) y *T. castaneum* (d) Fuente: Mika, N., Zorn, H., & Rühl, M. (2013). *Insect-Derived Enzymes: A Treasure For Industrial Biotechnology And Food Biotechnology. In Yellow Biotechnology II (Pp. 1-17). Springer Berlin Heidelberg*

Enzimas degradadoras de gluten.

La enfermedad celíaca es un trastorno intestinal causado por una respuesta inmune no controlada sobre el gluten de trigo y proteínas similares,

tales como avena, centeno y cebada. Los síntomas típicos incluyen diarrea, desnutrición y trastornos del crecimiento. Debido a que la enfermedad celiaca se diagnostica en infantes por la ingesta de cereales, los productores de alimentos para bebés deben de ofrecer una gama sin gluten, la cual es bastante limitada, por eso representa un papel importante la búsqueda de enzimas de interés alimentario [6].

Las posibilidades de degradar los péptidos relevantes para la enfermedad celíaca se han demostrado en una serie de estudios. Se ha discutido la hidrólisis de las proteínas asociadas a la enfermedad celíaca con enzimas del ascomiceto *Aspergillus niger* y de los cereales germinados. Aunque una hidrólisis parcial de los péptidos de interés se logró, peptidasas más eficaces y específicos son necesarios. Una conclusión obvia es centrarse en los insectos, como las plagas de granos, cuya fuente de alimento son las proteínas de almacenamiento de granos de cereales [7].

En estudios recientes se ensayaron los extractos enzimáticos de las plagas de grano: *A. diaperinus*, *S. granary*, *T. castaneum*, *T. molitor*, *O. surinamensis* y *R. dominica* para determinar su capacidad para hidrolizar caseína, gluten, seroalbúmina bovina y proteína de arroz (Tabla 1)

Para localizar las actividades de la peptidasa, se comparó la capacidad de los insectos para hidrolizar las proteínas alimentarias entre los escarabajos desvenados y completos (Figura 2).

T. molitor es una de las plagas de granos mejor examinadas. Por lo tanto, las peptidasas digestivas de *T. molitor* se encuentran altamente estudiadas. La digestión de las proteínas de almacenamiento en larvas de *T. molitor* ocurre en el intestino medio. Los estudios de Vinokurov *et al.* [8] y Elpedina y Goptar [9] revelaron un fuerte

gradiente de pH de 5.6 en el intestino medio anterior (AM) a 7.9 en el intestino medio posterior (PM), y las enzimas digestivas se disponen a su pH óptimo en la AM o PM. De acuerdo con su pH óptimo, las cisteínas peptidasas y las glicosidasas se encuentran principalmente en la AM, mientras que las serina peptidasas se encuentran preferiblemente en la PM.

En resumen, varios estudios se centran en las enzimas derivadas de insectos para la degradación del gluten, y varias enzimas se han caracterizado. Sin embargo, ninguna se ha comercializado hasta ahora. Por esa razón, otros estudios que se centren en nuevas enzimas de insectos son de especial interés.

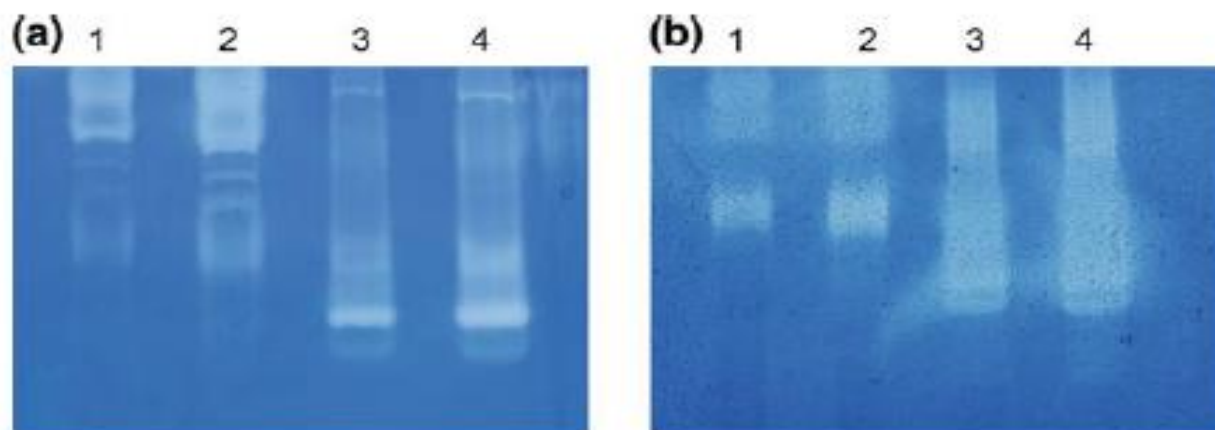


Figura 2 Comparación de extractos enzimáticos obtenidos de escarabajos desvenados (1,3) y completos (2,4), *O. surinamensis* (1,2) y *R. dominicana* (3,4). Los zimogramas contienen proteínas de arroz (a) y gluten (b). Fuente: Mika, N., Zorn, H., & Rühl, M. (2013). Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology. In *Yellow Biotechnology II* (pp. 1-17). Springer Berlin Heidelberg

Amilasas

Las amilasas, en especial α -amilasa (EC. 3.2.1.1), pertenecen a las enzimas digestivas más importantes. Se emplean para la degradación del almidón en el mosto, la fabricación de productos de panadería y la producción de glucosa y otras especialidades azucareras [10].

En la literatura, se pueden encontrar muchos estudios sobre amilasas aisladas de insectos o

especies asociadas a insectos. Mehrabadi *et al.* [11], por ejemplo, determinaron y caracterizaron la actividad α -amilasa de diversas plagas de granos, tales como *S. granarius* y *R. dominica*. Otras amilasas fueron descritas por Saadati Bezdí *et al.* [12]. Caracterizaron el sistema enzimático de las glándulas salivales de *E. integriceps* e identificaron dos α -amilasa.

Tabla 2: Condiciones óptimas de β -glucosidasas derivadas de insectos

Organismo	pH	T [°C]	Km	V
Termitas				
<i>Coptotermes formosanus</i>	5.6-6.2	49	n.d.	n.d.
<i>Macrotermes barneyi</i>	5.0	50	n.d.	n.d.
<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	5.5	65	n.d.	n.d.
<i>Neotermis koshunensis</i>	5.0	50	3.8 mM *	3.8 mM *
<i>Neotermis koshunensis</i>	5.0	50	0.77 mM **	0.77 mM **
<i>Reticulitermes flavipes</i>	7.0	n.d.	1.44 ± 0.14 mM ***	1.44 ± 0.14 mM ***
Escarabajos				
<i>Bombyx mori</i>	6.0	35	n.d.	n.d.
<i>Rhynchophorus palmarum</i>	5.0	50	0.31 mM	n.d.

*220 $\text{lmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, ** 16 $\text{lmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, 638.0 ± 39.0 lmol min^{-1} . Fuente: Mika, N., Zorn, H., & Rühl, M. (2013). *Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology*. In *Yellow Biotechnology II* (pp. 1-17). Springer Berlin Heidelberg

Enzimas de Insectos para la Biotecnología Industrial

La biotecnología industrial (biotecnología blanca) utiliza enzimas o microorganismos para mejorar procesos industriales ya existentes o para desarrollar nuevos productos y procesos demandados por el mercado. Los recursos renovables más importantes son los polímeros vegetales, particularmente la lignocelulosa que representa el principal compuesto de plantas leñosas [13].

La liberación de azúcares fermentables a partir de lignocelulosas (por ejemplo madera y paja) para la producción de diversos productos químicos tales como etanol, butanol o ácidos orgánicos es una de las principales áreas de investigación en la biotecnología blanca [14].

Uno de los pasos más importantes hacia productos valiosos de la lignocelulosa es el ataque inicial del polímero complejo y reticulado. Para ello se necesitan enzimas oxidativas e hidrolíticas.

El biopolímero más abundante en la tierra es la celulosa. Se encuentra en las paredes celulares de plantas herbáceas y en plantas leñosas junto

con hemicelulosa y lignina. En la naturaleza, la lignocelulosa se degrada principalmente por hongos filamentosos. Tienen un eficiente sistema enzimático oxidativo capaz de degradar el polímero lignocelulósico completo en fuentes de nitrógeno y carbono consumibles [15].

La degradación ambiental de las lignocelulosas por hongos superiores es un proceso eficiente pero muy tedioso.

Los insectos que se alimentan de madera dependen de procesos metabólicos significativamente más rápidos. Esto genera muchas esperanzas en las características bioquímicas y catalíticas de las enzimas de los insectos, y que puedan acelerar la descomposición de las lignocelulosas en futuros conceptos de bio-refinería [15].

Varios insectos, los escarabajos de ambrosía y las termitas, son capaces de alimentarse de la madera (xilófagos). A pesar de que esto sea

información ya conocida durante siglos, sus sistemas digestivos todavía en gran medida quedan por aclarar [15].

En particular, el aparato enzimático necesario para la oxidación de la lignina y la hidrólisis de la celulosa es sólo marginalmente comprendido. Una razón podría ser las diversas fuentes de las enzimas clave, que pueden ser producidas por microorganismos, por hongos simbióticos cultivados por los insectos, o por los propios insectos como enzimas endógenas [16].

Recientemente, los estudios con transcriptoma revelaron conocimientos sobre los genes activos de la celulasa de los insectos. Las celulasas más prominentes son endo-1,4- β -D-glucanasas y β -D-glucosidasas. Una endo-1,4- β -D-glucanasa de termitas inferiores *Reticulitermes flavipes* se expresó heterológamente en un sistema de expresión de baculovirus [17]. La enzima mostró una actividad óptima contra la carboximetilcelulosa (CMC) a pH 6,5-7,5 y 50-60°C. Una β -glucosidasa recombinante derivada del mismo organismo mostró la mayor actividad contra celobiosa a pH neutro y demostró una buena estabilidad hasta temperaturas de 40°C. Otra β -glucosidasa de la termita *Neotermis koshunensis* mostró una actividad ligeramente superior contra el laminaribiose que contra la celobiosa, con una temperatura óptima de 50°C y un pH óptimo de 5,0. La β -glucosidasa de la termita superior *Nasutitermes takasagoensis*, expresada heterológamente en *Pichia pastoris*, mostró actividades similares contra la celobiosa y el laminaribiose, pero alcanzó su máxima actividad a 65°C y pH 5,5. La mayoría de las β -glucosidasas se caracterizaron por un pH óptimo en el intervalo de pH ligeramente ácido de 5,0-6,0 (Tabla 2), aunque el pH en el intestino de termitas varía entre pH 6 y 10 [5, 18].

Enzimas oxidativas

En un estudio realizado por Geib *et al.* [19], el escarabajo asiático *A. glabripennis* y el termitero del pacífico del Pacífico *Zootermopsis angusticollis* fueron alimentados con madera de roble y de pino, respectivamente. Ambos insectos podrían alterar dramáticamente las características químicas y físico-químicas de la lignina de la madera blanda y de la madera dura. Los autores observaron oxidación de cadena lateral,

hidroxilación y desmetilación de los monómeros de lignina, guayacol y siringol.

Muy probablemente, las peroxididasas degradantes de la lignina (LiP, MnP, VP o DyP) son producidas por organismos simbióticos y no por los mismos insectos. Por otro lado, las lacasas, que también son más prominentes en hongos filamentosos, se producen en insectos [19].

Las lacasas también están presentes en el sistema intestinal de insectos, como en la termita *R. flavipes*. Se identificaron dos lacasas, expresadas y caracterizadas heterológamente. Ambas laccasas comprenden todos los lados laccasespecíficos de unión al cobre (T1, T2 y T3), pero no mostraron actividad contra los sustratos generales de lacasa ABTS y syringaldazina. Ambas lacasas mostraron un aumento en la actividad cuando se añadió peróxido de hidrógeno, revelando una actividad de fenol oxidasa dependiente de peróxido [19]. Las aplicaciones potenciales de lacasas son amplias. Pueden emplearse para la producción de tableros de fibras de densidad media, para la decoloración de colorantes o para la clarificación de jugos [20].

Expresión de proteínas heterologas en células de insectos.

Las células de insectos, al ser células eucariotas tienen la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales a las proteínas, debido a esto los cultivos de células de insectos representan una plataforma factible para la expresión de proteína heterologas. El empleo células de insectos para la expresión de proteínas heterologas empieza a partir de la síntesis exitosa de baculovirus recombinantes.

El primer reporte de producción de interferón humano en células de mariposa fue publicado en 1938, en el cual se presenta un sistema que permite la expresión de un gen de interés con la ayuda de virus patogénicos de insectos, el punto principal de dicha estrategia es que estos baculovirus producen polihedrina, la cual no es esencial para la replicación del virus y es producida en cantidades mayores al 70% del contenido total de proteína celular. Utilizando el promotor fuerte de la polihedrina, se reemplazó el DNA viral por el cDNA del interferón humano

siendo posible obtener un rendimiento de 5mg/L de cultivo celular [21].

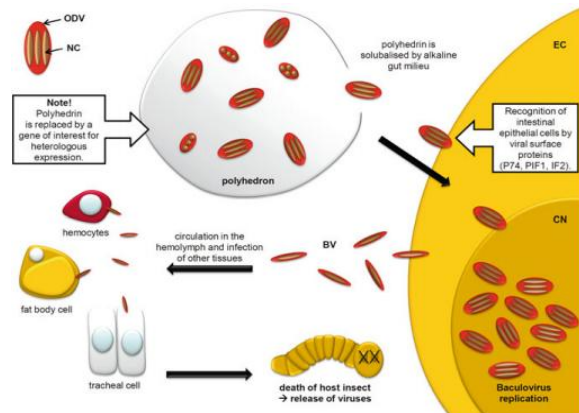


Figura 3. Replicación de baculovirus en larvas de lepidóptero. [23]

Existen aproximadamente 500 líneas celulares de insectos establecidas de Lepidópteros y Dípteros, mientras que cerca de 100 a partir de otros insectos. Las líneas celulares de insectos convencionales son derivadas de *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* y *Drosophila melanogaster* [22], estas células pueden ser utilizadas para la producción de virus o posterior a la infección con baculovirus para la producción de proteínas recombinantes.

Para que los baculovirus sean empleados como vector para la producción de proteínas recombinantes, el gen de interés debe insertarse próximo a un promotor potente sin afectar la replicación del virus, dicho promotor en la plataforma descrita corresponde al promotor de la polihedrina. Debido a la longitud del genoma de los baculovirus, no es práctico integrar directamente el DNA de interés, es por ello que variedad de vectores de transferencia se ofrecen comercialmente [24], dichos vectores comprenden un promotor, un sitio de clonación para la inserción del gen, una señal de terminación, una región que delimita el DNA viral y un sitio para la unión de un transposon bacteriano, adicionalmente la adición de un péptido señal permite la recuperación de la proteína secretada directamente del medio. El sistema *Bac-to-Bac* ofrecido por Invitrogen fue la primer plataforma disponible comercialmente para la expresión de proteínas heterólogas en células de insectos [25]. Dicho sistema

comprende el uso de un bacmido que contiene el genoma viral y un plásmido de transferencia pFastBac que contiene el genoma de interés específico el cuál será insertado posteriormente.

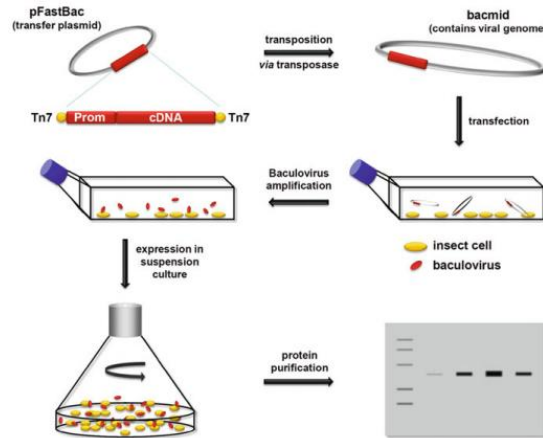


Figura 4. Sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen).[23]

La plataforma de expresión en baculovirus se ha utilizado para la producción de 5 vacunas humanas o productos veterinarios para el año 2012, entre ellas Boehringer Ingelheim's CircoFLEX para el Circovirus porcino Tipo 2 y GSK's CERVARIX para el tratamiento del virus del papiloma humano [26].

Biosensores

Los biosensores son sistemas que emplean componentes orgánicos tales como células, proteínas, organelos, u organismos completos acoplados a un dispositivo tecnológico. Combinando transductores físico o químicos con sensores biológicos es posible reproducir la capacidad de sensores naturales. El papel del transductor es convertir la interacción biológica o química y el analito en una respuesta física o química que genere una señal de salida cuantificable.

Biosensores basados en el olfato de los insectos han sido desarrollados a partir de las antenas, esto debido a que se encuentran entre los órganos más sensibles y selectivos químicamente en el reino animal [27]. La combinación de un órgano de insecto altamente especializado y operativo bioquímicamente con dispositivo de procesamiento electrónico permite la detección de compuestos volátiles en la atmósfera. Debido

a que diversas especies de insectos se encuentran en la mayoría de los ecosistemas del mundo y se encuentran adaptados a diversas interacciones con el ambiente basadas en el olfato la cantidad potencial de aplicaciones que posee es muy alta.

El método mayormente empleado para la cuantificación de la recepción de compuestos volátiles por insectos es la electroantenografía, reportada por primera vez en 1955 [28]. En estos dispositivos las antenas de los insectos son conectadas a 2 electrodos y 2 señales eléctricas son cuantificadas cuando el analito es recibido, los eventos de despolarización en la superficie de la dendrita genera un nanovoltaje que debe ser filtrado y amplificado para medir la señal.

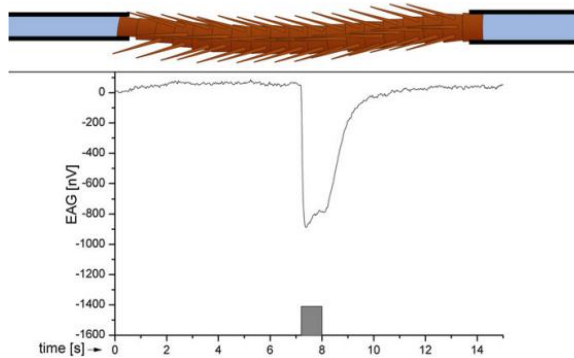


Figura 5- Conexión de una Electroantenografía y medición [29].

Los electrodos son unidos al tejido utilizando soluciones salinas, previniendo de esta manera la deshidratación o el saneamiento de los tejidos dañados, permitiendo así la medición de las señales producidas por la antena.

Se ha empleado el acoplamiento de la antena aislada del escarabajo de la papa de colorado en un transistor de efecto de campo, al aplicar aire cargado de un compuesto específico se obtiene una cascada bioquímica dentro de la antena permitiendo la formación de potenciales eléctricos a través de la membrana celular los cuales inducen una variación en la conductancia dependiente de la concentración particular del compuesto. Se ha desarrollado un sensor basado en la antena de *Melanophila acuminata* que

permite la detección de los componentes presentes en el humo provenientes de la pirólisis de la lignina como el guajacol, sin embargo la

combustión del combustible fósil no genera las mismas señales bioquímicas, de esta manera es posible diferenciar por medio de dicho sensor el origen del fuego [29].

Una de las limitantes de la electroantenografía es que se requiere la pureza de las sustancias a analizar para obtener mediciones exactas debido a que las reacciones de todas las neuronas antenales son medidas simultáneamente [30].

Leptinotarsa decemlineata tiene la capacidad de diferenciar por vía olfatoria plantas de papa infectadas con *Phytophthora infestans*, plantas con daño mecánico por prácticas agrícolas y plantas infectadas por *L. decemlineata*, ello debido a que las plantas de papa emiten distintas escencias cuando los escarabajos se alimentan de ella comparado a si se encuentra infectada por hongos o si tiene daño mecánico, estos compuestos marcadores pueden ser detectados aún en bajas concentraciones y reconocidas a largas distancias de la fuente de emisión por *L. decemlineata*, uno de estos compuestos es el 2-phenylethanol su concentración se correlaciona con el tipo de daño [31]. Esta estrategia es empleada para aplicar medidas químicas profilácticas si los niveles detectables representan un riesgo económico para la producción del cultivo.

Es posible desarrollar biosensores para la localización de cadáveres así como también para la estimación del intervalo post-mortem. *Calliphora vicina* tiene presencia en las etapas iniciales, tardías e incluso en la descomposición avanzada [32], convirtiendo a dicha especie en una opción factible para el desarrollo de un biosensor de este tipo. Dicho sistema también es posible aplicarlo en la industria alimenticia, con el fin de detectar carne en proceso de descomposición, debido a la producción que genera de compuestos sulfurados volátiles [33].

las funciones que realizan en su entorno natural y trasladarlo a la industria. Así mismo la capacidad de acoplar órganos de insectos a dispositivos electrónicos permite el desarrollo de herramientas que tengan como función la detección de compuestos específicos.

Referencias

- 1: Bale JS (2002) Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance. *Philos T Roy Soc B* 357:849–862
- 2: Landureau JC, Jolles P (1970) Lytic enzyme produced in vitro by insect cells: lysozyme or chitinase. *Nature* 225:968–969
- 3: Kazzazi M, Bandani AR, Hosseinkhani S (2005) Biochemical characterization of alphaamylase of the sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *Entomol Sci* 8:371–377
- 4: Applebaum SW, Konijn AM (1965) The utilization of starch by larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J Nutr* 85:275–282
- 5: Mika, N., Zorn, H., & Rühl, M. (2013). Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology. In *Yellow Biotechnology II* (pp. 1-17). Springer Berlin Heidelberg.
- 6: Green P, Cellier C (2007) Celiac disease. *N Engl J Med* 357:1731–1743
- 7: Geßendorfer B, Hartmann G, Wieser H (2011) Determination of celiac disease-specific peptidase activity of germinated cereals. *Eur Food Res Technol* 232:205–209
- 8: Vinokurov K, Elpidina E, Oppert B et al (2006) Fractionation of digestive proteinases from *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae and role in protein digestion. *Comp Biochem Phys B* 145:138–146
- 9: Elpidina E, Goptar I (2007) Digestive peptidases in *Tenebrio molitor* and possibility of use to treat celiac disease. *Entomol Res* 37:139–147
- 10: Konarev AV, Beaudoin F, Marsh J et al (2011) Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of sunn bug *Eurygaster integriceps* put. *J Agric Food Chem* 59:2462–2470
- 11: Mehrabadi M, Bandini AR, Saadati F et al (2011) α -amylase activity of stored products insects and its inhibition by medicinal plant extracts. *J Agric Sci Technol* 13:1173–1182
- 12: Saadati Bezdi M, Fatshbaf Pourabad R, Toorchi M et al (2012) Protein patterns in the salivary gland of the sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Put.) (Hemiptera: Scutelleridae). *Türk Entomol Derg* 36:215–223
- 13: Busch R, Hirth T, Liese A et al (2006) The utilization of renewable resources in German industrial production. *Biotechnol J* 1:770–776
- 14: Zhang YP (2008) Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:367–375
- 15: Liers C, Arnstadt T, Ullrich R et al (2011) Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood. *FEMS Microbiol Ecol* 78:91–102
- 16: Scharf ME, Karl ZJ, Sethi A et al (2011) Multiple levels of synergistic collaboration intermite lignocellulose digestion. *PLoS One* 6:e21709
- 17: King AJ, Cragg SM, Li Y et al (2010) Molecular insight into lignocellulose digestion by a marine isopod in the absence of gut microbes. *PNAS* 107:5345–5350
- 18: Yapi DYA, Gnakri D, Niamke SL et al (2009) Purification and biochemical characterization of a specific β -glucosidase from the digestive fluid of larvae of the palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *J Insect Sci* 9:1–13
- 19: Geib SM, Filley TR, Hatcher PG et al (2008) Lignin degradation in wood-feeding insects. *PNAS* 105:12932–12937
- 20: Xu F (2005) Applications of oxidoreductases: recent progress. *Ind Biotechnol* 1:38–50
- 21: Smith GE, Summers MD, Fraser MJ (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* 3:2156–2165
- 22: Lynn DE (2001) Novel techniques to establish new insect cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37:319–321
- 23: Becker-Pauly, C., Stöcker, W. (2011). Insect Cells for Heterologous Production of Recombinant Proteins. *Insect Biotechnology*.

- 24: Murhammer DW (2007) Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols. Humana Press, Totowa, NJ
- 25: Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 67:4566–4579
- 26: Cox MMJ (2012) Recombinant protein vaccines produced in insect 30(10):1759. doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.016
- 27: Schulz S (2010) The chemistry of pheromones and other semiochemicals I. Springer, Berlin Heidelberg
- 28: Schneider D (1955) Mikro-Elektroden registrieren die elektrischen Impulse einzelner Sinnesnervenzellen der Antenne des Seidenspinners *Bombyx mori* L. *Industrie-Elektronik* 5:3–7
- 29: Paczkowski, S., et al. (2011). Biosensors on the Basis of Insect Olfaction. *Insect Biotechnology*.
- 30: Schott, M., et al. (2013). Insect Antenna-Based Biosensors for In Situ Detection of Volatiles. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 136: 101–122
- 31-: Schütz S, Weißbecker B, Klein A, Hummel HE (1997b) Host plant selection of the Colorado potato beetle as influenced by damage induced volatiles of the potato plant. *Naturwissenschaften* 84:212–217
- 32: Smith KGV (1986) A manual of forensic entomology. Department of Entomology, British Museum (Natural History), London
- 33: Nicolay X (2006) Odors in the Food Industry. Springer, New York, NY