

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Determinación de la actividad celulolítica de la larva  
Stenodontes spinibarbis "joti"**

**Tesis para optar el título profesional de Bióloga,  
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

**Bach. Lizbett Maribel, Ramírez Vargas**

Asesor:

**Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua**

**Ayacucho - Perú**

**2004**

## DEDICATORIA

A mis padres Adrián y Dolores, por sus enseñanzas morales, humanas, por su sacrificio y su comprensión.

A mí hermano Adrián por su apoyo incondicional y verdadero.

## **AGRADECIMIENTO**

Expreso mi eterno agradecimiento a mi alma mater y tricentenaria Casa Superior de Estudios, la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme dado en sus aulas los principios de una hermosa profesión como es, las Ciencias Biológicas.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, y en ella, a toda su plana docente, por haberme brindado sus sabios conocimientos y consejos que hicieron posible la realización de mis ideales, también mis sinceros agradecimientos a los señores del personal interno y de servicio.

Expreso mi reconocimiento especial a mi asesor el Mg. Fidel R. Mujica Lengua, por su asesoramiento, colaboración, paciencia y apoyo para la ejecución del presente trabajo.

Agradezco al Mg. José Diez Macavilca, por su apoyo y colaboración en la ejecución del presente trabajo.

A todos mis ex – compañeros de estudios, quienes conjuntamente contribuyeron en mi formación profesional, en especial a mis mejores amigas de estudio Jeanne, Sheila y Jenny.

## INDICE

|   | PAG.      |
|---|-----------|
| <b>RESUMEN</b>                                  |           |
| <b>I. INTRODUCCION</b>                          | <b>1</b>  |
| <b>II. MARCO TEORICO</b>                        | <b>4</b>  |
| 2.1. Insectos plaga de plantas leñosas          | 4         |
| 2.1.2. Plagas de árboles forestales             | 4         |
| 2.1.2. Plagas de árboles frutales               | 8         |
| 2.2. Características del joti                   | 9         |
| 2.2.1. Ubicación taxonómica                     | 9         |
| 2.2.2. Morfología                               | 9         |
| 2.2.2.1. Descripción general                    | 9         |
| 2.2.2.2. Aparato bucal                          | 11        |
| 2.2.2.3. Sistema digestivo                      | 11        |
| 2.2.3. Hábitat y ciclo biológico                | 12        |
| 2.2.4. Importancia                              | 13        |
| 2.3. Celulosa                                   | 14        |
| 2.3.1. Estructura química                       | 14        |
| 2.3.2. Degradación biológica                    | 17        |
| 2.4. Celulasas microbianas y celulosomas        | 19        |
| 2.5. Celulasas animales                         | 24        |
| 2.5.1. Celulasas endógenas y exógenas           | 24        |
| 2.5.2. Los insectos que atacan la celulosa pura | 26        |
| 2.5.3. Especies que poseen endoglucanasa sola   | 28        |
| 2.5.4. Las enzimas adquiridas                   | 28        |
| 2.6. Enzimas digestivas de insectos             | 30        |
| 2.7. Aplicaciones biotecnológicas de celulasas  | 32        |
| <b>III. MATERIALES Y METODOS</b>                | <b>35</b> |
| 3.1. Materiales                                 | 35        |
| 3.1.1. Población y muestra                      | 35        |
| 3.1.2. Recolección de larvas                    | 36        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2. Métodos  | 36        |
| 3.2.1. Disección y descripción morfológica                  | 36        |
| 3.2.2. Obtención del extracto enzimático total              | 37        |
| 3.2.3. Determinación de la actividad celulolítica           | 37        |
| 3.2.3.1. Determinación de la actividad endoglucanasa        | 37        |
| 3.2.3.2. Determinación de la actividad exoglucanasa         | 39        |
| 3.2.3.3. Determinación de la actividad $\beta$ -glucosidasa | 40        |
| 3.2.4. Determinación de azúcares reductores                 | 42        |
| 3.2.5. Determinación de la actividad de amilasas            | 43        |
| 3.2.6. Determinación de proteína total soluble              | 45        |
| <b>IV. RESULTADOS</b>                                       | <b>46</b> |
| <b>V. DISCUSIONES</b>                                       | <b>59</b> |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b>                                     | <b>66</b> |
| <b>VII. RECOMENDACIONES</b>                                 | <b>68</b> |
| <b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b>                     | <b>69</b> |
| <b>IX. ANEXOS</b>   | <b>73</b> |

## Determinación de la actividad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti"

Autor : RAMIREZ VARGAS, Lizbett. M  
Asesor: MUJICA LENGUA, Fidel. R

---

### RESUMEN

El presente trabajo de investigación tubo como objetivo determinar la actividad celulolítica en larvas de *Stenodontes spinibarbis*, insecto conocido como "joti" y a partir de los resultados explorar su potencial biotecnológico como fuente de celulasas. Se trabajó con un total de 60 larvas, las cuales fueron recolectadas de árboles infestados como lúcuma, palto, molle y sauce de dos lugares, el Distrito de Luricocha, Provincia de Huanta y el Centro Ecológico Recreacional y Experimental "Las Totorilla" perteneciente a la UNSCH. Las muestras de larvas fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde se realizó el estudio correspondiente.

Primeramente se realizó la descripción morfológica de la larva, tanto externa como interna. A continuación se procedió a obtener el extracto enzimático total de mesenterón, para lo cual se mezcló un volumen del triturado con nueve volúmenes de agua desionizada, que luego fue dejado en agitación a 5°C por 3 h. Se centrifugó a 4000 rpm y el sobrenadante fue utilizado para realizar las siguientes determinaciones: actividad endoglucanasa, actividad exoglucanasa, actividad  $\beta$ -glucosidasa, actividad amilolítica y proteína total soluble. Las actividades enzimáticas fueron evaluadas a diferentes pH (7.0, 9.0 y 11.0) y a diferentes temperaturas (20, 37 y 50°C), por medio de la determinación de azúcares reductores (Método del DNS).

El extracto enzimático total de mesenterón de larvas de *Stenodontes spinibarbis*, mostró tener actividad enzimática tanto de endoglucanasas y exoglucanasas; sin embargo, la actividad de exoglucanasas fue marcadamente mucho mayor, lo que explica el carácter xilófago de las larvas y consecuentemente su alta capacidad para degradar sobre todo las regiones cristalinas de la celulosa de la madera, así como su gran habilidad para construir profusas galerías larvarias cuyas consecuencias se traducen en la muerte de la planta hospedera. Adicionalmente, la actividad de exoglucanasas, fue superior en todos los tratamientos frente al testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*), especialmente en los tratamientos a pH alcalino, lo que permite deducir de manera preliminar que se trata de exoglucanasas que podrían tener aplicación en la formulación de detergentes biológicos para la industria de la lavandería. De otro lado, el hecho de tener mayor actividad de exoglucanasas a la temperatura de 50°C, permite revelar el carácter termoestable de estas enzimas, lo cual es deseable si se trata de buscar su aplicación industrial.

Todos estos resultados, si bien son parciales, ameritan continuar estudiando este sistema celulolítico eucariota con miras a establecer su potencial biotecnológico. Y por otro lado, evaluar también su impacto negativo como plaga de árboles tanto frutales como forestales en nuestro medio, a partir de lo cual, se evalúe la necesidad de establecer estrategias dentro de un programa de control microbiológico de este insecto plaga.

## I. INTRODUCCION

La celulosa es un producto de gran importancia biológica y económica. Sin embargo el estudio de las celulasas ha estado descuidado mucho tiempo. Hasta los años 1950 era admitido que el nombre de celulasa encubría una sola enzima (15).

El descubrimiento de que algunos organismos incapaces de desarrollarse sobre la celulosa pura (como el algodón) podrían crecer sobre una forma modificada de celulosa hidrosoluble como la carboximetilcelulosa (CMC) condujo al concepto actual que admite la existencia de dos grupos de enzimas distintas que intervienen en la transformación de la celulosa en celobiosa, esta última después es transformada en glucosa por un tercer grupo de enzima (24, 42). El ataque de la celulosa se hace entre los microorganismos como entre los insectos, gracias a un complejo de tres hidrolasas (15).

Las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas (EC.3.2.1.4), las cuales se unen en las regiones amorfas de la celulosa y rompen los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos incrementando la disponibilidad de los extremos no reductores y generando oligosacáridos más pequeños con cadenas terminales libres; las  $\beta$ -1,4-exoglucanasas (EC.3.2.1.91), liberan unidades de celobiosa a partir de los extremos no reductores de la celulosa; las  $\beta$ -glucosidasas (EC.3.2.1.21), que hidrolizan las unidades de celobiosa en monómeros de glucosa (24, 27).

Estos tres grupos de enzimas actúan en forma cooperativa en la degradación de la celulosa (24).

A pesar de los avances logrados en el conocimiento de la hidrólisis enzimática de la celulosa, los procesos desarrollados hasta la fecha para aprovechar este polisacárido natural, aún no tienen la rentabilidad necesaria para explotarlo comercialmente. Sin embargo, se han realizado investigaciones sobre las enzimas (celulasas), que utilizan los microorganismos (hongos, bacterias y protozoarios), que viven en simbiosis con los animales rumiantes, existen también insectos que se alimentan de celulosa, tales como las termitas. Dentro de este último grupo, se encuentra el coleóptero de la familia Cerambycidae, la larva *Stenodontes spinibarbis* ("joti"), que tiene predilección por los árboles viejos, teniendo un estadio larvario que se desarrolla en el interior de la corteza de plantas leñosas como "molle", "palto", "lúcuma", "sauce" y otras, en donde forma un complejo sistema de cavernas a una velocidad relativamente rápida. Sin embargo, este insecto, que incluso forma parte de los hábitos entomofágicos de muchas

comunidades andinas y selváticas, no ha sido estudiado convenientemente, por lo menos desde el punto de vista de su importancia como fuente de celulasas de interés biotecnológico.

La investigación básica y aplicada sobre celulasas microbianas no solamente ha generado un conocimiento científico significativo sino que también a revelado su enorme potencial en biotecnología. Hasta ahora las celulasas son usadas en la industria de alimentos como cervecera y vinos, forraje animal, textil, lavandería, pulpa y papel, así como en agricultura y propuestas de investigación (5). Tal es así que la demanda de estas enzimas junto a las hemicelulasas y pectinasas está creciendo más rápidamente que antes y esta demanda ha sido la fuerza conductora para la investigación.

Por consiguiente, resulta interesante e importante el estudio de la capacidad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* ("joti"), un modelo animal que se encuentra disponible localmente.

Con base en estos fundamentos, se realizó el presente trabajo de investigación, teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

- Determinar la actividad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* ("joti").
- Determinar los valores óptimos de pH y temperatura para la actividad endoglucanasa y exoglucanasa.

## **II. MARCO TEORICO**

### **2.1. INSECTOS PLAGA DE PLANTAS LEÑOSAS**

#### **2.1.1. Plagas de árboles forestales**

Los insectos son la forma de vida animal más numerosa que habita en los bosques. Estos se han adaptado a todos los entornos, se pueden encontrar en todos aquellos lugares que sean capaces de aportar las mínimas condiciones de habitabilidad y alimentación que les permitan sobrevivir, por lo que ocupan una gran variedad de nichos ecológicos.

Los insectos tienen muchas funciones en la economía de los bosques y son al igual que los árboles una parte esencial de la compleja asociación de organismos que lo comprenden. Aunque la mayoría de las especies de insectos son beneficiosos o inocuos, muchas especies son sumamente dañinas.

Los insectos beneficiosos de los bosques están representados por una gran cantidad de especies. Estos organismos pueden ser útiles para el hombre si producen, directa o indirectamente, materiales de valor económico, como seda, miel, goma, laca, grana o cochinilla, cantaridina y agallas usadas en la fabricación

de ácido tánico, tintes y pigmentos permanentes, también ayudan a la producción de frutas, verduras y flores, polinizando las flores, muchos insectos destruyen otros insectos perjudiciales, mejoran las condiciones físicas del suelo y promueven su fertilidad, los insectos y sus productos tienen un uso limitado en la medicina, por ejemplo las picaduras de las abejas tienen valor como remedio para la artritis y reumatismo (16, 25).

Los insectos perjudiciales de los bosques son los responsables de las pérdidas económicas. Estos incluyen: (a) especies que dañan o destruyen las flores y semillas de los árboles y que son plagas particularmente importantes en áreas designadas para recoger o producir semillas, (b) especies que causan enanismo y deformaciones o matan los árboles jóvenes dañando o destruyendo las yemas laterales y terminales, o raíces de reproducción en las plantaciones, (c) especies que causan la pérdida de vitalidad, reducción en el crecimiento y usualmente la muerte de los árboles al alimentarse de su follaje, y (d) especies que se alimentan bajo la corteza o en el interior de la madera haciendo túneles y causando la muerte a los árboles. Todas estas especies son plagas importantes en los bosques, además existe un gran número de insectos barrenadores de la madera que causan pérdidas cuantiosas, dañando y destruyendo los troncos de los árboles (6, 16, 25).

Gran número de insectos se instalan en los tejidos leñosos de los vegetales. Son llamados xilófagos, que consumen la madera viva o muerta, también pueden consumir el floema o xilema, ya que atacan la madera para alimentarse y protegerse, (tales como troncos, ramas, corteza). La mayor parte de los xilófagos pertenecen al orden de los coleópteros, les siguen en importancia los himenópteros,

lepidópteros y por último los isópteros (15).

Los coleópteros poseen un gran número de familias xilófagas, tales como Scolytidae, Buprestidae, Cerambycidae, Bostrichidae, Platypodidae, y otras menos representantes, como los Curculionidae, Anobiidae, Ptinidae, Anthribidae y Lucanidae. Además existe un grupo de insectos xilófagos corticícolas (de la corteza), que incluye especies saprófagas, micófagas y predadoras, como Cucujidae, Carabidae, Staphylinidae, Rhizophagidae, Tenebrionidae, Mycetophagidae, etc.

Los primeros coleópteros xilófagos que atacan la madera separada del árbol (leño) pertenecen a las familias Scolytidae, Buprestidae y Cerambycidae.

Los Scolytidae, cuyas larvas y adultos viven en árboles y arbustos muertos, también se encuentran en los vivos. Atacan la raíz, troncos, ramas y piñas. En los troncos sanos atacan a la madera por debajo de la corteza. Las larvas de algunos buprestidos viven en las raíces o en las ramas secas de plantas herbáceas. Entre los Cerambícidos se encuentran especies con larvas subcortícolas (debajo de la corteza), que también atacan al leño. Algunas de sus especies son muy perjudiciales en los frutales.

Muchas familias de Himenópteros, como Pompilidae, Apidae, excavan los troncos y anidan en ellos. Otras familias, como Spheciidae, aprovechan galerías ya existentes y desde allí construyen nuevas, donde luego habitan.

Los Siricidae poseen hábitos xilófagos, es decir que sus larvas se nutren de tejido leñoso.

Muchos himenópteros que frecuentan el tejido leñoso son parásitos de ciertos xilófagos, como Ichneumonidae, Calcididae, Bethilidae y otros.

Entre los lepidópteros más representativos están las familias xilófagas, como los Cossidae, y Sesiidae, que son parásitos primarios y atacan árboles en buenas condiciones (12, 46).

Los homópteros poseen importantes familias, muchas de cuyas especies más representativas son: la familia Coccidae “queresas del molle”, *Ceroplastes sp.*; “coccido verde”, *Pulvinaria sp.*, cuya planta hospedera es el molle y la cabuya; otra familia es Psyllidae “psilido del molle“, *Calophya sp.* (41).

Entre los Isópteros se encuentran las termitas de hábitos sociales, que excavan y anidan en el leño.

Los insectos xilófagos resultan en general difíciles de atrapar en el campo, por este motivo la cría reviste en estos casos gran interés. Los árboles atacados por larvas de estos insectos se distinguen fácilmente por las perforaciones que se observan en los troncos y ramas y las deyecciones que se encuentran a la salida de aquellas (46).

Los insectos mencionados son hospedados por una gran variedad de árboles forestales, entre las cuales se puede mencionar al eucalipto (*Eucaliptus globulus*), nogal (*Juglans neotropica*), molle (*Schinus molle*), sauce (*Salix chilensis*), pino (*Pinus radiata*), etc.

### **2.1.2. Plagas de árboles frutales**

Las distintas especies de "barrenillos" o "taladros de la madera", son causa todos los años de graves pérdidas en las plantaciones de árboles frutales de nuestra región, a los que pueden llegar a secar totalmente si las condiciones les son favorables, les sirve de refugio y nido a estos insectos para su multiplicación.

Existe una diversidad de plagas frutales que pueden causar daños a las plantas o árboles través de la raíz, tallo, hojas, flor y fruto, sin embargo sólo algunas se destacan por su importancia económica (49).

Los insectos que causan daño al tronco de los árboles frutales en su mayoría son Coleópteros de las familias Cerambycidae, Bostrichidae y Curculionidae; especies de estas familias han sido halladas taladrando troncos de árboles enfermos, afectando al lúcumo, paca, palto, etc (12). Precisamente, la larva *Stenodontes spinibarbis*, conocido como "joti" en nuestro medio, es una especie de la familia Cerambycidae de importancia económica cuya población se concentra en el valle de Huanta especialmente en el distrito de Luricocha donde causa daños irreparables principalmente a los lúcumos y paltos. Las larvas de coleópteros pueden producir daños destacados en las partes subterráneas de plantas herbáceas y leñosas, como por ejemplo, gusanos blancos, gusanos de alambre, gusano

cabezudo, etc.

Algunas larvas de lepidópteros son plagas de interés, como los gusanos grises, taladros de frutales, barrenadores, polillas, etc. (49).

Los Homópteros de la familia Coccidae “queresas”, dañan una diversidad de plantas entre ellas cítricos, laurel, helecho, mora, etc. También se les encuentra en la tara, jacarandá, manzano, granada en poblaciones muy pequeñas (41).

Otros insectos plagas como los lepidópteros, dípteros “mosca de la fruta”, himenópteros, afectan a otras partes de la planta (13).

## **2.2. CARACTERÍSTICAS DEL “JOTI”**

### **2.2.1. Ubicación taxonómica (8)**

FILO : Artropoda  
CLASE : Insecta  
ORDEN : Coleoptera  
FAMILIA : Cerambycidae  
GENERO Y ESPECIE : Stenodontes spinibarbis  
N.común : “joti”, “taladro grande”

### **2.2.2. Morfología**

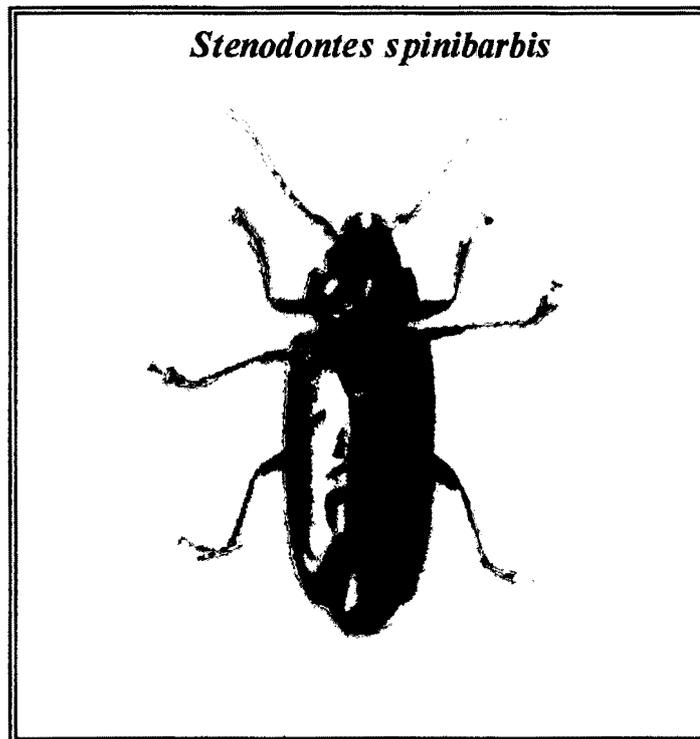
#### **2.2.2.1. Descripción general**

Los insectos adultos presentan un cuerpo alargado ligeramente aplanado de color café brillante, pequeño o grande; miden 5 cm de largo incluyendo las alas por 1.7 cm de ancho torácico (41); cabeza larga con mandíbula grande típicamente

masticador, con áreas dentadas, ojos de tamaño regular laterales, con antenas aserradas de 10-15 segmentos, de gran longitud típico de esta familia, los tarsos generalmente son bilobulados, su fórmula tarsal es 5-5-5, con élitros bien desarrollados (6, 47, 48) Fig. Nº 1.

Las larvas son blanquecinas o cremosas, cilíndricas, que llegan a medir hasta 9 cm de largo, son de tipo erusiforme con cabeza transversal pequeña de color castaño u oscuro con mandíbulas fuertes y con rugosidades tuberculiformes en el cuerpo y patas muy pequeñas o ausentes (41) Fig. Nº 4(A)( B).

La pupa, de tipo libre muy semejante al futuro adulto. En Ayacucho parece tener una generación por año (41).



**Fig. Nº 1: Estado adulto de *Stenodontes spinibarbis***

#### **2.2.2.2. Aparato bucal**

Los insectos obtienen su alimento en una gran variedad de formas. Un método primitivo y muy importante, consiste en arrancar las partes externas de la planta y, simultáneamente, triturar y tragar las partes sólidas. A dichos insectos se les llama insectos masticadores. Los coleópteros (cerambícidos), pertenecen a este tipo de insectos, poseen un aparato bucal masticador (25).

Está compuesto por el *labro*, en la parte superior; a los lados, por la *mandíbula*; detrás de éstas, por las *maxilas*; y debajo, por otra pieza impar, que es el *labio* que cierra la boca por la parte inferior. En los insectos masticadores, las mandíbulas son la parte más importante de las estructuras bucales, estas presentan varias proyecciones o dientes pequeños. Además de masticar o triturar los alimentos, ellos son las estructuras que cortan, rasgan las hojas u otro objeto del cual el insecto se está alimentando (18, 25).

#### **2.2.2.3. Sistema digestivo**

El Sistema digestivo de los coleópteros, familia Cerambycidae, es un tubo que atraviesa la parte central del cuerpo. Su abertura anterior, la boca, está situada en la base de la cavidad preoral (espacio limitado por las piezas bucales); su abertura posterior, el ano, se halla en el segmento posterior del cuerpo (6, 33).

Los cerambícidos que viven en la madera relativamente seca y pobre en sustancias nutritivas el tubo digestivo es largo y con un proctodeo desarrollado. Los que viven en la madera no descompuesta, más rica en agua y en sustancias asimilables, el tubo digestivo es corto y el proctodeo más pequeño (15).

El tubo digestivo es sorprendente por su largura porque puede alcanzar 3 veces la longitud del cuerpo; está dividido en tres partes distintas: una anterior o *estomodeo*, una media o *mesenterón* y una posterior o *proctodeo*. Ordinariamente entre el estomodeo y el mesenterón se encuentra la válvula estomodeica o cardíaca, y entre el mesenterón y el proctodeo la válvula proctodeica o pilórica, posee microorganismos simbiotes (como: bacterias, protozoarios, hongos) que le ayudan a digerir la celulosa de la madera (15, 18, 33, 36) Fig. Nº 5.

Degradan la celulosa y el almidón gracias a una enzima que presentan las glándulas salivales, que convierte los almidones en maltosa y a la presencia de microorganismo simbiotes en su aparato digestivo (6, 8, 51), los cerambícidos albergan en su mesenterón ectosimbiontes, la transmisión de estos simbiotes de una generación a la otra se hace según modalidades variadas (15).

### **2.2.3. Hábitat y ciclo biológico**

Los coleópteros poseen un gran número de familias, tales como la familia Cerambycidae que incluye una gran variedad de especies entre ellas *Stenodontes spinibarbis*, conocida como "taladro grande" (8, 51).

Los adultos, aparecen en los meses de diciembre – enero, por lo general son de hábitos nocturnos y durante el día se les puede encontrar en reposo sobre troncos caídos, la madera recién cortada les hace atrayente (50, 51).

Durante su fase larval son barrenadores de madera, las hembras para ovipositar prefieren tallos de árboles viejos agujereados o con rajaduras o ranuras

(41) y troncos talados y luego de 7 días nacen las larvas que posteriormente con la ayuda de sus mandíbulas hacen surcos profundos al interior de la corteza de árboles (51), su fase larval dura aproximadamente de 2 – 3 años, se alimentan de madera viva o muerta haciendo largas galerías en ella (8).

Las larvas de estos insectos conviven con las termitas, hormigas, cucarachas de la madera y otros escarabajos.

El molle parece ser el hospedero preferencial, también dañan el sauce, lúcumo, pacaé, etc.

El daño que ocasionan a los árboles viejos en pie muestra un amarillamiento gradual progresivo; cuando está bastante dañado, al cortar el tronco se nota infinidad de galerías o agujeros de diámetros algo mayor que el grosor de la larva, estos se comunican con el exterior a través de aberturas grandes, en la base del tronco se nota abundante material fibroso parecido al aserrín, los molles así dañados pueden caerse en épocas de fuertes vientos, los troncos en este estado no sirven para madera empleándose únicamente como leña (41).

#### **2.2.4. Importancia**

La mayoría de los cerambícidos son dañinos de árboles frutales y forestales (lúcumo, pacaé, molle, sauce, eucalipto, nogal), prefieren árboles debilitados y moribundos pero otros, son atraídos hacia árboles vivos (8, 13).

Algunas especies ocasionan daños considerables a las trozas y productos de madera. Sin embargo, como grupo, los cerambícidos son muy importantes en el proceso de circulación de los minerales hacia el suelo, ya que las galerías de muchos escarabajos barrenadores de la madera propician las condiciones para la invasión de hongos que descomponen la madera (13).

Los campesinos ayacuchanos, a pesar de sufrir con los daños ocasionados por la larva "joti", también lo utilizan en su alimentación, ya que tiene un alto contenido proteico, consumiéndola frita, combinada con cancha, mote, papa, yuca y otros productos.

## **2.3. CELULOSA**

### **2.3.1. Estructura Química**

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza y es el componente principal de la pared celular de las plantas (43). Se estima que más del 50% del carbono en la biósfera se encuentra en forma de celulosa; esto es, aproximadamente  $10^{15}$  Kg. de celulosa que se sintetizan y degradan anualmente (37, 43).

Se ha calculado que el peso molecular mínimo de la celulosa de diversas procedencias varía de 50 000 D a 2.500 000 D, equivalente a 300 – 15 000 eslabones de glucosa (22, 29).

Algunas especies ocasionan daños considerables a las trozas y productos de madera. Sin embargo, como grupo, los cerambícidos son muy importantes en el proceso de circulación de los minerales hacia el suelo, ya que las galerías de muchos escarabajos barrenadores de la madera propician las condiciones para la invasión de hongos que descomponen la madera (13).

Los campesinos ayacuchanos, a pesar de sufrir con los daños ocasionados por la larva "joti", también lo utilizan en su alimentación, ya que tiene un alto contenido proteico, consumiéndola frita, combinada con cancha, mote, papa, yuca y otros productos.

## **2.3. CELULOSA**

### **2.3.1. Estructura Química**

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza y es el componente principal de la pared celular de las plantas (43). Se estima que más del 50% del carbono en la biósfera se encuentra en forma de celulosa; esto es, aproximadamente  $10^{15}$  Kg. de celulosa que se sintetizan y degradan anualmente (37, 43).

Se ha calculado que el peso molecular mínimo de la celulosa de diversas procedencias varía de 50 000 D a 2.500 000 D, equivalente a 300 – 15 000 eslabones de glucosa (22, 29).

La celulosa es el polímero lineal no ramificado que posee enlaces  $\beta$ -1, 4 glucosídicos. La configuración  $\beta$ , permite a la celulosa formar cadenas muy largas y rectas. Cada residuo de glucosa, está girando con una rotación de  $180^\circ$  respecto al residuo siguiente, de modo que el oxígeno del anillo piranosido se une por un puente de hidrógeno al grupo hidroxilo en el C- 3 de la unidad siguiente, haciendo que la cadena recta formada por uniones  $\beta$  sea óptima para construir fibras con una elevada fuerza tensil (37) Fig. N° 2 (a), (b).

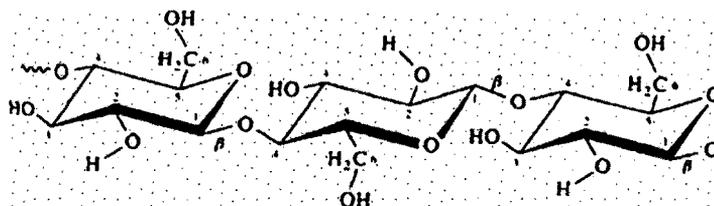
Estas cadenas lineales de celulosa interaccionan entre si por medio de enlaces de puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático y que se conocen como *regiones cristalinas*. Cuando a lo largo del haz de cadenas se rompen los puentes de hidrógeno se forman regiones más desordenadas denominadas *amorf*as, que permiten su hidratación y mejor accesibilidad al ataque enzimático (24, 40) Fig. N°2 (c), estas estructuras son demasiado pequeñas para ser observadas mediante el empleo de un microscopio óptico, pero su presencia se detecta por difracción de rayos X y otras medidas físicas (4, 22). Las microfibrillas tienen un espesor de 50 A° y entre 500 y 1 000 A° de largo. Las fibras consisten en manojos de fibrillas, paralelas entre sí, pero en ángulo respecto al eje de la fibra (4).

La celulosa es hidrófila pero insoluble en agua (28), se disuelve en los ácidos concentrados y en las disoluciones de hidróxido cupramónico (9).

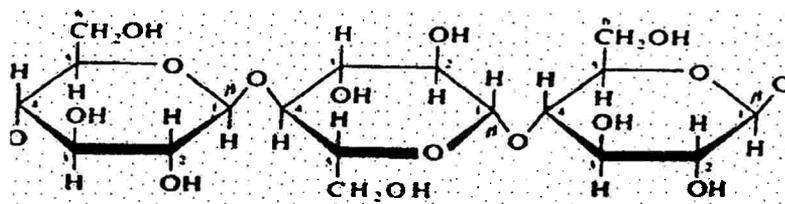
La estructura fina se ha estudiado en varios tipos de celulosa y muy particularmente en la fibra de algodón. Así, unos 60 a 70 cadenas moleculares paralelas de celulosa se reúnen para formar una *micela*; 20 micelas aproximadamente forman la llamada *microfibrilla*, que es visible sólo en el microscopio electrónico, unas 250 microfibrillas forman una *fibrilla* o *macrofibrilla*, que es visible al microscopio óptico y finalmente unas 1 500 fibrillas, es decir  $7.5 \times 10^8$  cadenas moleculares de celulosa forman la fibra de algodón (27, 52).

Dependiendo del origen y pre-tratamiento, el grado de cristalinidad de la celulosa puede variar desde 0% para la amorfa, celulosa hinchada con ácido fosfórico, hasta cerca de 100% para la celulosa aislada de *Valonia macrophysa*; la fibra de algodón tiene cerca de 70% de cristalinidad, en la mayoría de celulosas comerciales la cristalinidad varía entre 30 a 70% (2, 39). El pre-tratamiento puede ser enzimático (celulasas) o químico (por hidrólisis ácida).

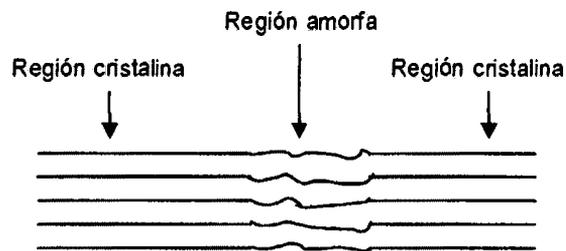
(a).



(b).



(c).



**Fig. N° 2.** Estructura de la celulosa.

(a). Conformación en silla de residuos de D-glucosa con enlaces  $\beta$ -1, 4 en la celulosa. (b). Proyección de Haworth modificada de residuos de D-glucosa con enlaces  $\beta$ -1, 4 en la celulosa. (c). Esquema de una fibrilla mostrando las regiones cristalinas y amorfas de celulosa.

### 2.2.3. Degradación Biológica

La degradación enzimática de la celulosa es un proceso muy complejo, en el que intervienen por lo menos tres grupos de enzimas:

- **ENDOGLUCANASAS.** Llamadas también endo- $\beta$ -glucanasa ó  $\beta$ -1, 4-glucanohidrolasa (EC.3.2.1.4) ó CMCase, que rompen los enlaces  $\beta$ -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa, produciendo nuevos sitios de ataques complementados por las exoglucanasas. Como resultado, hay una rápida disminución en el largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores, son activas sobre la celulosa amorfa. El mejor sustrato para la medición de la actividad de endoglucanasas es un derivado soluble tal como la carboximetilcelulosa (CMC).

- **EXOGLUCANASAS.** Llamadas también **exo- $\beta$ -glucanasas** ó  **$\beta$ -1, 4-glucan celobiohidrolasas (EC.3.2.1.91)** ó **avicelasa**, que atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los terminales no reductores liberando subunidades de celobiosa. degradan preferentemente celulosa cristalina de manera progresiva, exhiben acción sinérgica altamente cooperativa en presencia de endoglucanasas. Tienen muy limitada acción sobre sustitutos de celulosa como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HEC).
- **GLUCOSIDASAS.** Llamadas también  **$\beta$ - 1,4 – glucosidasas (EC. 3.2.1.21)** ó **celobiasas**, que hidrolizan celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa. (2, 27, 31, 42).

La degradación de la celulosa por microorganismos (bacterias y hongos) consiste en la conversión del sustrato celulolítico insoluble en azúcares solubles, primariamente celobiosa y glucosa, que luego son asimilados por la célula como fuente de carbono y energía (1) ANEXO N° 2.

Este proceso sumamente complejo es llevado a cabo por las enzimas descritas anteriormente: endoglucanasas, exoglucanasas y un tercer grupo de enzimas, las  $\beta$ -glucosidasas (1, 2), estos grupos de enzimas difieren en especificidad y modo de acción, actúan en sinérgismo para hidrolizar la celulosa.

El número y tipo de celulosa involucradas en cada paso de la degradación microbiana de la celulosa puede variar también de un organismo a otro.

Adicionalmente el patrón electroforético de la celulosa pueden variar con el tipo de sustrato, edad del cultivo y por las modificaciones post – tradicionales tales como glicosilación o proteólisis parcial que pueden darse. Esta multiplicación enzimática finalmente resulta importante por que provee a los microorganismos celulolíticos de un mecanismo eficiente para utilizar el sustrato (28).

#### **2.4. CELULASAS MICROBIANAS Y CELULOSOMAS**

Las celulasas son sintetizadas por una variedad de microorganismos entre bacterias y hongos, cuando crecen en sustratos celulósicos. Sin embargo, relativamente pocos microorganismos pueden producir el grupo de enzimas necesarias para la degradación de celulosa cristalina (2, 42). La celulosa, al igual que otros compuestos de alto peso molecular, no puede ser tomada directamente por la célula, sino que tiene que ser hidrolizada fuera de la célula por despolimerasas, que son segregadas en forma de exoenzimas. En muchos microorganismos celulolíticos puede comprobarse la existencia de celulasas que degradan la celulosa hasta glucosa o hasta el disacárido celobiosa (35).

Los hongos son los organismos más estudiados con respecto a la degradación de celulosa y producción de celulasas (2, 42). Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma*, en la especie *Trichoderma reesei*, se demostró que es el mejor productor de celulasa extracelular, los trabajos continuaron en *Trichoderma viride*. Sin embargo, otros géneros y especies de hongos tales como: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa* y algunos hongos comestibles también producen celulasas (42).

Se ha encontrado un gran número de especies bacterianas, cuyas enzimas poseen características similares y en muchos casos han demostrado superar las propiedades de las de origen fúngico (42).

Entre las bacterias celulolíticas aerobias, el género *Cellulomonas* (sp. *Cellulomonas flavigena*), capaz de hidrolizar celulosa cristalina, produce una amplia variedad de glucanasas y sintetiza varias celulasas y xilanasas extracelulares (28).

Las bacterias celulolíticas anaerobias como las bacterias del rumen, entre ellas se pueden nombrar a *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus albus* son los anaerobios celulolíticos más abundantes en el rumen (23) y especies de *Clostridium*, como *Clostridium thermocellum*, tienen un sistema de degradación eficaz de la celulosa cristalina (2, 21). En condiciones anaerobias probablemente la celulosa sólo es hidrolizada extracelularmente hasta celobiosa (35).

Las celulasas fueron clasificadas por Henrissat et al. 1989 en familias, incluyendo tanto celulasas como xilanasas, esta clasificación se ha ampliado para formar el grupo de enzimas las cuales hidrolizan enlaces glucosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un no carbohidrato, las familias de las glicosil hidrolasas u O-glicosil hidrolasas (39, 40).

El estudio comparativo de la secuencia deducida de aminoácidos de más de 50 genes de celulasas bacterianas y fúngicas, ha permitido establecer que las celulasas son enzimas modulares bifuncionales, es decir que están conformadas por unidades discretas independientes en plegamiento, estructura y función

llamadas dominios o módulos (1, 2).

Debido a la mejor conservación del plegamiento de las proteínas algunas familias se han agrupado en "clanes" los cuales entre sus características comunes comparten: el plegamiento conservado (similaridad en su estructura tridimensional), la maquinaria y el mecanismo catalítico y la estereoquímica por el sustrato. Hasta marzo de 2.000 se registraron 85 familias de glicosil hidrolasas numeradas del 1 al 85 y 8 clanes nombrados desde la A a la H (20, 40).

Desde el inicio del estudio de las celulasas es claro que ellas son realmente un complejo que trabaja sinérgicamente sobre celulosa nativa; según su acción combinada sobre el sustrato se clasifican en tres clases: Endoglucanasas, Exoglucanasas (ó Celobiohidrolasas) y los  $\beta$ - glucosidasas. (1, 2).

Estructuralmente la mayoría de las celulasas están compuestas de un *dominio catalítico* (CD), responsable de la reacción de hidrólisis y un *dominio de unión a celulosa* (CBD) que media la unión de la enzima al sustrato; ambos dominios están unidos por un péptido conector o secuencia "linker" (también llamadas cajas PTS, por su contenido de prolina, treonina o serina), sólo unas pocas celulasas microbianas y de plantas superiores tienen solo el dominio catalítico (21, 39).

Esta organización modular, formada también por otras enzimas hidrolíticas de carbohidratos poliméricos insolubles como amilasas y quitinasas, parece haber evolucionado por procesos de cambio de dominio. Los dominios en enzimas nuevas

pueden reconocerse por comparación de su estructura primaria con enzimas cuya organización estructural y funcional ya se ha definido; la función puede analizarse por expresión del fragmento del gen apropiado y análisis bioquímico. Los dominios auxiliares y módulos identificados incluyen: dominios de unión a la celulosa o modulo de unión a carbohidrato (CBDs o CBM), segmentos duplicados, módulos semejantes a la capa S (SLH) y módulos típicos de fibronectina tipo III (Fn3) (39, 40).

En cuanto a la estructura se han investigado ampliamente dos sistemas representativos que permiten la interpretación de otras celulasas menos caracterizadas, tales sistemas son las celulasas no asociadas o no agregativas, característico de bacterias aerobias, hongos, cuya especie representativa es *Trichoderma reesei* y los sistemas de celulasas asociadas o agregativas, característico de microorganismos anaerobios, incluyendo bacterias y hongos presentes en el rumen de los herbívoros, cuyo representante más investigado es el de *Clostridium thermocellum*, constituyendo el llamado celulosoma. (24, 39)

Las celulasas de *Trichoderma reesei* pertenecen a los tres grupos descritos (endoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glicosidasas), estos tres grupos de enzimas actúan en forma cooperativa en la degradación de celulosa. (24). Se ha planteado que las enzimas esenciales para la degradación de celulosa cristalina en los microorganismos aerobios funcionan sinérgicamente por la presencia del CBD en cada proteína, mientras que en los anaerobios están asociados al celulosoma.

El sistema agregativo más ampliamente descrito es el de *Clostridium thermocellum* por Lamed y colaboradores en 1983 como un factor de unión a la celulosa (CBF), antigénicamente activo, localizado en la superficie celular y en el medio de cultivo de esta bacteria celulolítica anaerobia, termófila, Gram positiva, con capacidad de hidrolizar celulosa cristalina a celobiosa y definido como un organelo extracelular especializado. Complejos celulolíticos semejantes se han descrito en hongos celulolíticos anaerobios, bacterias como *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides cellulosolvens*, sugiriendo que el celulosoma es una estructura ampliamente distribuida al menos entre microorganismos anaerobios (2, 40).

Se conoce que el número de polipéptidos en el celulosoma puede variar con la cepa y el tamaño del celulosoma, *Clostridium Thermocellum* comprende al menos 14 polipéptidos distintos, incluyendo varias celulasas, xilanasas y al menos una  $\beta$ -glucosidasa, acoplados a una proteína de andamiaje de 210 Kda sin actividad enzimática que participa en el reconocimiento de las fibras de celulosa a la superficie de la célula (24, 28, 39).

El complejo celulosomal consta principalmente de dos componentes, las subunidades enzimáticas que incluyen  $\beta$ -glucosidasas, xilanasas, endoglucanasas y celobiohidrolasas y la proteína de andamiaje que integra las subunidades enzimáticas. La estructura semeja partículas globulares (subunidades enzimáticas) unidas por hebras (proteína de andamiaje) en arreglos como cadenas ordenadas. Cada una de las subunidades enzimáticas presenta un dominio, secuencia

duplicada o reiterada, denominado dominio "dockerin", interactuando con la proteína de andamiaje o integrante del celulosoma a través de los dominios repetidos llamados dominios "cohesin" (1, 40).

## **2.5. CELULASAS ANIMALES**

### **2.5.1. Celulasas endógenas y exógenas**

Se han realizado experimentos en animales productores de celulasas, sin embargo no se ha reconocido en animales superiores la producción de celulasas endógenas.

Estos experimentos demuestran la presencia de organismos simbioses como bacterias, hongos y protozoarios que albergan los sistemas digestivos de los invertebrados y el ganado herbívoro. Esta teoría se propuso primero por Cleveland's en su trabajo con termitas de la especie *Reticulitermes flavipes*, concluyendo que la fauna protozoaria presente en su intestino era responsable de la digestión de la celulosa.

La primera celulasa endógena se demostró en la termita japonesa subterránea *Reticulitermes speratus*, una reducción drástica de protozoarios en el intestino por la exposición de calor de estas termitas, no afectó la actividad celulolítica, medida por la disminución en la viscosidad de la carboximetilcelulosa (CMC).

Se hicieron estudios comparativos con otra termita australiana *Nasutitermes walkeri* que posee una fauna intestinal relativamente pequeña, esto no afectó la

producción de celulasa, el 20% de la actividad celulolítica es producida por la fauna intestinal, por lo tanto la mayor cantidad de celulasa es producida de forma endógena.

Tanto las termitas como las cucarachas de la madera, tienen en su intestino una fauna protozoaria simbiote que facilita la digestión de la celulosa ingerida. Es probable que la vida social en este grupo se originase en forma de colonias familiares centrales en torno de la diseminación de los simbiotes, como las encontramos actualmente en las cucarachas de la madera del género *Cryptocercus punctulatus*, esta especie se alimenta de madera en descomposición, ha sido estudiada en los Estados Unidos por Cleveland (1934). Este blátido vive en los troncos de árboles muertos. Protozoarios y en particular flagelados de los géneros *Trichonympha*, *Barbulonympha* y *Polimastiginos* viven en simbiosis en su intestino posterior. Ellos segregan las celulasas y las celobiasas que faltan en el blátido, que no sobrevive si se le priva de sus flagelados (6, 15, 44). Por otro lado Slaytor y sus colegas demostraron que la distribución de celulasa en el intestino de la cucaracha australiana de la madera *Panesthia cribrata* es limitada y no se encontró fauna protozoaria en su intestino (44).

El alimento principal de las termitas es la celulosa que obtienen de la madera y otros tejidos vegetales, esto debido a la presencia de ciertos protozoarios flagelados y otros microorganismos en su aparato digestivo, las cuales poseen enzimas que convierten la celulosa en azúcares (16).

Aparte de los artrópodos varios estudios han demostrado que en los moluscos, los caracoles, babosas de mar y algunos bivalvos tienen una fuente de enzimas endógenas como el hepatopáncreas, los dientes gástricos; la posible producción de celulasas bacterianas también se informó en otras especies de bivalvos.

En los herbívoros, los que más destacan son los rumiantes, que poseen microorganismos simbiotes en su sistema digestivo (rumen), como bacterias (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, etc.), además de hongos y protozoarios (2, 23). Estos microorganismos segregan enzimas celulolíticas que liberan glucosa y obtienen energía de ella, fermentándola para dar ácidos grasos de cadenas cortas, como el ácido butílico, que puede ser absorbido y utilizado por el animal que los alberga (14, 23).

Algunos organismos como los insectos fitófagos, caracoles (44), también son capaces de hidrolizar la celulosa, en cambio la gran mayoría de mamíferos no producen celulasas ni digieren la celulosa de los alimentos (29).

En los seres humanos al ingerir la celulosa en los alimentos, dan cuerpo al bolo fecal y de esta manera estimulan la movilidad intestinal y favorecen el tránsito digestivo (9).

### **2.5.2. Los insectos que atacan la celulosa pura**

Los insectos capaces de degradar totalmente la celulosa son poco numerosos.

Muchos xilófagos que viven a expensas de la corteza, del floema o de la madera no digieren la celulosa. Son por ejemplo los coleópteros bostríquidos, curculiónidos, líctidos y numerosas especies de bupréstidos y de cerambícidos que poseen solamente la enzima endoglucanasa. La lista de los insectos que son conocidos por digerir totalmente la celulosa es pequeña, los que están repartidos en las siguientes órdenes:

Dictiópteros. Dos cucarachas digieren la celulosa: *Cryptocercus punctulatus*, especie xilófaga que vive en la madera muerta y *Periplaneta americana*, especie no xilófaga.

Isópteros. Entre las termitas algunas especies son capaces de digerir la celulosa, estas son: *Reticulitermes lucifugus*, *Reticulitermes speratus*, *Macrotermes natalensis*, *Nasutitermes ephrata*.

Himenópteros. Tres especies de sirícidos son conocidos por su aptitud para digerir la celulosa, estas son *Sirex cyaneus*, *Sirex gigas*, y *Sirex phantoma*.

Coleópteros. Es en este orden donde se encuentra el mayor número de especies capaces de digerir la celulosa. Pertenecen a 4 familias: anóbidos, bupréstidos, cerambícidos y escarabeidos.

Esta lista pudo ser establecida gracias a técnicas diferentes:

(a) La demostración de la digestión de la celulosa por la utilización de celulosa marcada con  $^{14}\text{C}$  y la búsqueda de  $^{14}\text{CO}_2$  en el metabolismo de los insectos. Esto se

ha realizado en particular en *Reticulitermes flavipes*.

(b) La demostración de la posibilidad por los fluidos del tubo digestivo de degradar el papel de filtro, el algodón o toda otra forma de celulosa pura. Esto ha sido hecho en *Macrotermes natalensis* y *Sirex cyaneus*.

(c) La demostración de la posibilidad por un insecto de sobrevivir sobre un medio formado de celulosa pura, esto ha sido establecido para la cucaracha *Cryptocercus punctulatus* y para *Reticulitermes flavipes*.

Nuevas investigaciones permitirán ciertamente alargar esta lista y extenderla a otros grupos sistemáticos tales como las larvas de Dípteros que son muy diversificadas en la madera muerta. En los insectos defoliadores que han sido investigados (lepidópteros, coleópteros, ortópteros, dípteros) la celulosa está ausente (15).

#### **2.5.3. Especies que poseen la enzima endoglucanasa sola**

Las especies que poseen la enzima endoglucanasa sola y que no son capaces de atacar más que la CMC son más numerosas que las que poseen las dos enzimas, endoglucanasas y exoglucanasas. Entre estas se encuentran especies de cucarachas, en los coleópteros todos los escolítidos que han sido estudiados, numerosos cerambícidos y algunos curculiónidos (15).

#### **2.5.4. Enzimas adquiridas.**

Numerosos invertebrados consumidores de restos vegetales ingieren con sus alimentos un conjunto complejo de bacterias, protozoarios y hongos. Estos microorganismos son la fuente de enzimas que, una vez liberadas, quedan en el

tubo digestivo de los animales que encuentran así un medio de aumentar sus capacidades digestivas respecto a sustratos tales como la celulosa, las hemicelulosas, la pectina, la lignina y otras moléculas difícilmente degradables.

Este papel de las enzimas adquiridas ha sido puesto en evidencia por primera vez en la termita *Macrotermes natalensis*. Esta termita no tiene protozoarios simbiotes, vive asociada con diversos hongos entre ellos los *Termitomyces*. Estos son asociados y suministran la enzima exoglucanasa mientras que la enzima endoglucanasa es aportada por otros hongos. Asimismo, *Sirex cyaneus* posee enzimas adquiridas capaces de hidrolizar los polisacáridos de la madera; estas enzimas provienen del hongo simbiótico *Amylostereum chailletii* que se desarrolla en las galerías larvarias.

El mantenimiento de la actividad de las enzimas ingeridas es posible gracias al pH del tubo digestivo de los insectos que es próximo a la neutralidad (entre 6.8 y 7.2 en general). En esta gama de pH las enzimas son estables y activas. Por otro lado, la actividad de las enzimas proteolíticas de los insectos (que podrían destruir las enzimas adquiridas) parece débil en la parte anterior del mesenterón que es la región donde la actividad celulolítica es más intensa.

En la termita *Macrotermes mulleri* hay en su intestino una  $\beta$ -glucosidasa que es diferente de la del hongo *Termitomyces*. La degradación de la celulosa comenzaría en la cama del hongo; después se continuaría en el tubo digestivo de la termita, gracias a una exocelulasa y a una  $\beta$ -glucosidasa producida por las

glándulas salivales del propio insecto. La ingestión de enzimas que provienen de hongo simbiótico tendría solamente por consecuencia mejorar la hidrólisis de la celulosa y permitiría mantener el equilibrio nutricional de la termita (15).

Cuando los simbiositos están presentes, tales termites pueden vivir durante largos periodos de celulosa pura, pero mueren rápidamente si experimentalmente se les priva de estos microorganismos, pueden ser bacterias, como en las larvas de muchos *Scarabaeidae* o protozoos, como en la cucaracha xilófaga *Cryptocercus* y en los termites más primitivos; los protozoarios no se transmiten directamente a los hijos y se pierden en cada muda junto con los otros contenidos del intestino. Los termites recién mudados reciben los nuevos protozoos al alimentarse del material exudado por el ano de los otros miembros de la colonia (17).

## **2.6. ENZIMAS DIGESTIVAS DE INSECTOS**

En los insectos, considerados en conjunto, el mesenterón produce una extensa variedad de enzimas para la digestión de los hidratos de carbono, grasas y proteínas. La producción de enzimas está por lo general correlacionada con el régimen alimenticio (33).

Las enzimas secretadas por las glándulas salivales, usualmente están relacionadas con la digestión. En las cucarachas y en la abeja de la miel, la saliva contiene una amilasa que convierte al almidón en maltosa y una invertasa que reduce a la sacarosa a glucosa y fructosa. Sin embargo, la mayoría de las enzimas digestivas, son producidas por las células epiteliales del intestino medio y del intestino ciego. Los jugos digestivos son usualmente soluciones débiles ácidas o

alcalinas, el receptáculo de la cucaracha es generalmente ácido, debido a la presencia del ácido láctico formado de los azúcares. En los insectos omnívoros tales como *Periplaneta*, las secreciones digestivas contienen maltosa, hidrolizando la maltosa a glucosa; lactosa, hidrolizando la maltosa a glucosa y lactosa amilasa; invertasa; lipasa que hidroliza las grasas a glicerol y ácidos grasos; proteinasa, que reduce las proteínas naturales a polipéptidos y aminoácidos; y varias peptidasas, que reducen a varios polipéptidos a aminoácidos libres (25, 45).

La proteasa y la lipasa, predominan en las formas carnívoras, mientras que en algunos insectos que comen celulosa tales como los cerambícidos y otras larvas de coleópteros que barrenan madera, secretan celulasa, hemicelulasa, las cuales son capaces de romper a la celulosa a glucosa. Estas enzimas, sin embargo, no se encuentran en las termitas o cucarachas que se alimentan de madera, son simbiosis como bacterias, protozoarios y hongos que le ayudan a digerir la celulosa (16, 25, 33).

Los mayates de los tapetes, las larvas de la polilla de la ropa y las larvas de moscardón, que se alimenta de proteínas animales tales como la queratina y el colágeno, poseen enzimas apropiadas, la queratinasa y colagenasa, las cuales reducen estas proteínas a péptidos, los que pueden ser digeridos más adelante con proteinasas. Varios insectos predigieren su alimento, con la inyección de enzimas durante la alimentación. Esto sucede en los homópteros fitófagos, hemípteros predadores, dípteros, coleópteros más voraces y larvas de neurópteros. En algunos casos las enzimas parecen ser secretadas por las glándulas salivales, pero en las larvas de los coleópteros, estas están ausentes y las enzimas son producidas en el

intestino medio y forzadas hacia fuera a través de las mandíbulas (25).

## **2.7. APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS DE LAS CELULASAS**

La investigación básica y aplicada sobre celulasas microbianas no solamente ha generado un conocimiento científico significativo sino que también a revelado su enorme potencial en biotecnología. Hasta ahora las celulasas son usadas en la industria de alimentos como cervecería y vinos, forraje animal, textil, lavandería, pulpa y papel, así como en agricultura y propuestas de investigación.

Tal es así que la demanda de estas enzimas junto a las hemicelulasas y pectinasas está creciendo más rápidamente que antes y esta demanda ha sido la fuerza conductora para la investigación.

La biotecnología de la celulosa se inició en los años 1980s, primero en aplicaciones para forrajes de animales, seguido de aplicaciones en alimentos. Subsecuentemente, estas enzimas fueron usadas en la industria textil, en la industria de lavandería así como en la industria de la pulpa y el papel. Durante las dos décadas pasadas la aplicación de las celulasas se ha incrementado considerablemente especialmente en la industria textil, alimentos, cervecería y vino así como la industria de la pulpa y el papel (5, 24).

Hoy en día estas enzimas junto a las hemicelulasas y pectinasas representan aproximadamente el 20% de las enzimas vendidas actualmente en especial de *Trichoderma* y *Aspergillus*. Es de precisar que el 60% del abastecimiento mundial total de enzimas industriales es producido en Europa y el

40% restante por EE.UU y Japón, además aproximadamente el 75% de las enzimas industriales son hidrolasas.

Las celulasas tienen aplicaciones en el campo de la biotecnología de alimentos, para la extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales, así como en la producción de néctares de frutas y purés con alta viscosidad. En la biotecnología de la cerveza y vino, se usan para el mejoramiento de la fermentación primaria, filtración y calidad de la cerveza, así como en el mejoramiento de la extracción de color de la cáscara de las uvas; mejoramiento de la calidad, estabilidad y clarificación de vinos. En la biotecnología de forrajes para animales, se aplican para mejorar la calidad nutricional de los forrajes para rumiantes y monogástricos, en el mejoramiento de la digestión y absorción de forrajes. En la biotecnología de textiles y lavandería, se aplican para lograr la remoción de excesos de microfibrillas sobre la superficie de ropas de algodón, así como en la restauración del color en las fábricas de algodón y en la biotecnología de la pulpa y el papel, en el pulpeado bio-mecánico y modificaciones de las propiedades de las fibras de celulosa, así como en la biocaracterización de la pulpa (5).

Además como consecuencia del conocimiento sobre la genética y biología molecular de las celulasas, una de las recientes aplicaciones biotecnológicas de los *Dominios de Unión a Celulosa* (CBDs) consiste en su empleo como módulos de afinidad para la purificación, inmovilización y fusión de proteínas, enzimas y anticuerpos, así como la producción de moléculas híbridas para muchas aplicaciones, en matrices de celulosa o quitina; así, se ha planteado y patentado su uso en Kits de diagnóstico para detectar proteínas específicas (por ejemplo, en

parásitos de humanos y animales), otra aplicación del CBD es su empleo en sistemas de administración de medicamentos dirigidos a membranas o superficies quitinosas o celulósicas de algunos hongos patógenos (28, 39).

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. Población y Muestra:

Se consideró como población a las larvas existentes en los árboles de "lúcuma" *Pouteria obovata*, "molle" *Schinus molle*, "palto" *Persea americana* y "sauce" *Salix chilensis*, infestadas, tanto en el Distrito de Luricocha-Huanta, como del Centro Ecológico Recreacional y Experimental "La Totorilla" CERE-"LT".

El Distrito de Luricocha, se encuentra en la Provincia de Huanta, Departamento de Ayacucho, ubicado a 2580 m.s.n.m.; entre las coordenadas geográficas de 12°53'40" L.S y 74°16'17" L.W; ecológicamente corresponde a la Zona de Vida (bs-MBS) bosque seco Montano Bajo Subtropical. Las características climáticas corresponden a la biotemperatura media anual máxima de 18°C, y la media anual mínima de 11.7°C; el promedio máximo de precipitación total por año es de 1,124 mm; con una humedad relativa de 75% (30).

El Centro Ecológico Recreacional y Experimental “La Totorilla” CERE-“LT”, se encuentra en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, ubicado a 2685 m.s.n.m.; entre las coordenadas geográficas de 13°08'01" L.S y 74°12'28" L.W; ecológicamente corresponde a la Zona de Vida denominada (ee-MBS) estepa espinosa Montano Bajo Subtropical, cuya formación de vegetación es el Monte Ribereño. Las características climáticas corresponden a la biotemperatura media anual máxima de 17.7°C, y la media anual mínima de 12.8°C; el promedio máximo de precipitación pluvial total por año es de 590 mm., y el promedio mínimo de 216 mm.; con una humedad relativa de 70% (30).

En estas condiciones físicas, se trabajó en la recolección de 60 larvas de *Stenodontes spinibarbis* “joti”, extraídas en 20 visitas a dichos lugares.

### **3.1.2. Recolección de Larvas**

Para obtener las larvas del tronco del sauce, se hizo uso de una hacha a fin de cortar el árbol donde existían evidencias de la presencia de las mismas, las cuales se recolectaron en un recipiente adecuado, para luego ser trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y finalmente ser diseccionadas y estudiadas.

## **3.2. METODOS:**

### **3.2.1. Disección y Descripción Morfológica**

Con la finalidad de identificar los órganos de interés de la larva, se realizó primeramente la descripción morfológica con la ayuda de un Estereoscopio de

Cámara Lucida marca Carl-Zeiss, en la que se observó la parte externa (aparato bucal, cuerpo) y se procedió a dibujar. En segundo lugar se realizó la observación de la anatomía interna, para ello fue necesario hacer la disección de la larva, observándose glándulas salivales e intestino y finalmente se procedió a dibujar.

### **3.2.2. Obtención del Extracto Enzimático Total**

Previamente se procedió a desinfectar la larva con alcohol al 96%, luego de la disección se realizó la obtención del extracto enzimático total, poniendo en un recipiente con agua desionizada los trozos de intestino (1 volumen de intestino fue mezclado con 10 volúmenes de agua desionizada), este fue llevado a agitación a 5°C por 3 h. Pasado este tiempo, el extracto fue centrifugado a 4000 rpm por 10 min, utilizándose el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática.

ANEXO Nº 1.

### **3.2.3. Determinación de la Actividad Celulolítica**

#### **3.2.3.1. Determinación de la Actividad Endoglucanasa**

##### **Fundamento:**

Las  $\beta$ -1, 4-endoglucanasas, cortan al azar las uniones dentro de la celulosa amorfa, incrementando la disponibilidad de extremos no reductores y generando oligosacáridos más pequeños con cadenas terminales libres. La actividad endoglucanasa se realizó utilizando como sustrato Carboximetilcelulosa (CMC), que es un derivado soluble de celulosa y se determina indirectamente por la aparición del producto final principal que es la glucosa (7, 27, 31).

La actividad endoglucanasa del extracto enzimático total fue determinada siguiendo las pautas formuladas por Stutzenberger (38).

**Procedimiento:**

1. A un set de tubos de ensayo (7), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| CODIGO | BUFFER 1M<br>(ml) | SUSTRATO<br>(ml de CMC) | MUESTRA<br>(ml) | VOLUMEN<br>FINAL (ml) |
|--------|-------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| T      | 0.1               | 3.5                     | 0.4             | 4.0                   |
| M1     | 0.1               | 3.5                     | 0.4             | 4.0                   |
| M2     | 0.1               | 3.5                     | 0.4             | 4.0                   |
| M3     | 0.1               | 3.5                     | 0.4             | 4.0                   |
| BR     | 4.0               | ---                     | ---             | 4.0                   |
| BS     | 2.0               | 2.0                     | ---             | 4.0                   |
| BE     | 3.6               | ---                     | 0.4             | 4.0                   |

Donde:

T : Es el testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*)

M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.

BR : Es el blanco reactivo.

BS : Es el blanco sustrato.

BE : Es el blanco enzima.

Buffer 1M : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0

Sustrato (CMC): Carboximetilcelulosa al 1%.

Muestra : Extracto enzimático total.

2. Luego todos los tubos fueron incubados en baño María a diferentes temperaturas: 20°, 37°, 50°C por 30 minutos.
3. Seguidamente se realizó la determinación de azúcares reductores por el Método del Acido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

### **3.2.3.2. Determinación de la Actividad Exoglucanasa**

#### **Fundamento:**

Las  $\beta$ -1,4-exoglucanasas o celobiohidrolasas, cortan separando unidades del disacárido celobiosa desde los extremos no reductores de las cadenas de oligosacáridos. La actividad exoglucanasa se realizó utilizando como sustrato papel filtro (Whatman N° 1) previamente triturado y se determina indirectamente por la aparición del producto final principal que es la glucosa (7, 27, 31).

La actividad exoglucanasa del extracto enzimático total fue determinada siguiendo las recomendaciones de Stutzenberger (38) y Ceroni y Gutierrez – Correa (11).

#### **Procedimiento:**

1. A un set de tubos de ensayo (7), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| CODIGO | BUFFER 0.6M<br>(ml) | SUSTRATO<br>(g. de papel filtro) | MUESTRA<br>(ml) | VOLUMEN<br>FINAL (ml) |
|--------|---------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------|
| T      | 0.8                 | 0.05                             | 3.2             | 4.0                   |
| M1     | 0.8                 | 0.05                             | 3.2             | 4.0                   |
| M2     | 0.8                 | 0.05                             | 3.2             | 4.0                   |
| M3     | 0.8                 | 0.05                             | 3.2             | 4.0                   |
| BR     | 4.0                 | ----                             | ----            | 4.0                   |
| BS     | 4.0                 | 0.05                             | ----            | 4.0                   |
| BE     | 0.8                 | ----                             | 3.2             | 4.0                   |

Donde:

T : Es el testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*)

M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.

BR : Es el blanco reactivo.

BS : Es el blanco sustrato.

BE : Es el blanco enzima.

Buffer 0.6M : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0

Sustrato : Papel filtro Whatman N° 1

Muestra : Extracto enzimático total.

2. Este sistema se incubó en las mismas condiciones que en el caso anterior.
3. Luego se midió la liberación de azúcares reductores.

### 3.2.3.3. Determinación de la Actividad $\beta$ -Glucosidasa

**Fundamento:**

Las  $\beta$ -glucosidasas, son enzimas que, si bien hidrolizan preferentemente la celobiosa hasta glucosa, pueden también hidrolizar otras dextrinas hidrosolubles de 3 a 6 carbonos, como la salicina ( $C_3H_{18}O_7$ ), un trisacárido que se extrae de la

corteza del sauce, sustancia blanca, amarga, poco soluble en el agua. La actividad glucosidasa se realizó utilizando como sustrato salicina y se determina indirectamente por la aparición del producto final principal que es la glucosa (7, 27, 31).

La actividad glucosidasa se determinó siguiendo las recomendaciones de Saddler (34) citados por Ceroni (10).

**Procedimiento:**

1. Se utilizó 1 ml de muestra y 1 ml de salicina 10mM en buffer 1M, este último según Bernier y Stutzenberger (1989), que Ramírez, P (31) hace mención en su trabajo tesis.

A un set de tubos de ensayo (6), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| CODIGO | BUFFER 1M +<br>SUSTRATO<br>(Salicina) ml | BUFFER<br>(ml) | MUESTRA<br>(ml) | VOLUMEN<br>FINAL<br>(ml) |
|--------|--|----------------|-----------------|--------------------------|
| M1     | 1.0                                      | ----           | 1.0             | 2.0                      |
| M2     | 1.0                                      | ----           | 1.0             | 2.0                      |
| M3     | 1.0                                      | ----           | 1.0             | 2.0                      |
| BR     | ----                                     | 2.0            | ----            | 2.0                      |
| BS     | 2.0                                      | ----           | ----            | 2.0                      |
| BE     | ----                                     | 1.0            | 1.0             | 2.0                      |

Donde:

M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.

BR : Es el blanco reactivo.

BS : Es el blanco sustrato.

BE : Es el blanco enzima.

Buffer 1M : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0

Sustrato : Salicina

Muestra : Extracto enzimático total.

2. Este sistema se incubó en las mismas condiciones que en los casos anteriores.
3. Luego se midió la liberación de azúcares reductores.

#### **3.2.4. Determinación de Azúcares Reductores (Método del Acido 3,5-Dinitrosalicílico)**

##### **Fundamento:**

La reacción con Acido Dinitrosalicílico para la determinación de azúcares reductores está compuesta por ácido dinitrosalicílico, Sal de Rochelle, fenol y bisulfito de sodio.

La Sal de Rochelle es introducida para prevenir la reacción del oxígeno disuelto; el fenol para incrementar la cantidad de color producido y el bisulfito para estabilizar el color obtenido en presencia de fenol. El NaOH es requerido para la acción reductora de la glucosa presente en la muestra sobre el ácido dinitrosalicílico, el cual da una coloración pardo amarillento, cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente (26).

**Procedimiento:**

La curva estándar se elaboró con glucosa a valores de 2 y 20 mM.

1. Esta técnica consistió en tomar 0.5 ml de muestra.
2. Luego se le añadió 3 ml de la solución de DNS, se calentó en baño María hirviendo durante 5 minutos.
3. Se adicionó inmediatamente 1 ml de Sal Rochelle, se dejó enfriar y luego se enrasó cada tubo a 15 ml de agua destilada.
4. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 550 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D, Milton Roy.

**3.2.5. Determinación de la Actividad Amilolítica****Fundamento:**

La  $\alpha$ -amilasa hidroliza los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 de los polisacáridos que poseen tres o más unidades de D-glucosa en unión  $\alpha$ -1,4; siendo este ataque no selectivo sobre varios puntos de la cadena de almidón simultáneamente. Teóricamente por la acción de la  $\alpha$ -amilasa sobre la amilosa se obtiene 87% de maltosa, 13% de glucosa; sobre la amilopectina 73% de maltosa, 8% de isomaltosa y 19% de glucosa (7). La actividad amilolítica se realizó utilizando como sustrato almidón solubilizado y se determina indirectamente por la aparición de uno de los productos finales que es la glucosa.

**Procedimiento:**

1. Colocar en un tubo de ensayo 100  $\mu$ l de muestra con 900  $\mu$ l de una solución de almidón al 1.11% en buffer al 50 mM, conteniendo 2 mM de bicloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) según Bergmann et. al. (3).

A un set de tubos de ensayo (7), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| CODIGO | BUFFER 50 mM +<br>SUSTRATO<br>(Almidón) ul | BUFFER<br>(ul) | MUESTRA<br>(ul) | VOLUMEN<br>FINAL<br>(ml) |
|--------|--|----------------|-----------------|--------------------------|
| T      | 100  | ----           | 900             | 1.0                      |
| M1     | 100  | ----           | 900             | 1.0                      |
| M2     | 100  | ----           | 900             | 1.0                      |
| M3     | 100  | ----           | 900             | 1.0                      |
| BR     | ----                                       | 100            | ----            | 1.0                      |
| BS     | 100  | ----           | ----            | 1.0                      |
| BE     | ----                                       | 100            | 900             | 1.0                      |

Donde:

T : Es el testigo ( $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*)

M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.

BR : Es el blanco reactivo.

BS : Es el blanco sustrato.

BE : Es el blanco enzima.

Buffer 50mM : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0

Sustrato : almidón al 1.11 %

Muestra : Extracto enzimático total.

2. Este sistema se incubó en las mismas condiciones que en los casos anteriores.
3. Luego se midió la liberación de azúcares reductores.

### **3.2.6. Determinación de proteína total soluble (Método Cuantitativo de Biuret)**

#### **Fundamento:**

Fue determinado por el Método Cuantitativo de Biuret. Este método se fundamenta en que las proteínas y péptidos, en medio alcalino, forman con el ión  $\text{Cu}^{++}$  quelatos solubles, de coloración característica, desde el azul intenso al violeta o rosa. La intensidad de color obtenido es una medida del número de enlaces peptídicos presentes en la proteína. El nombre de "Biuret" se debe a que este compuesto es un derivado de la úrea que da una reacción típicamente positiva.

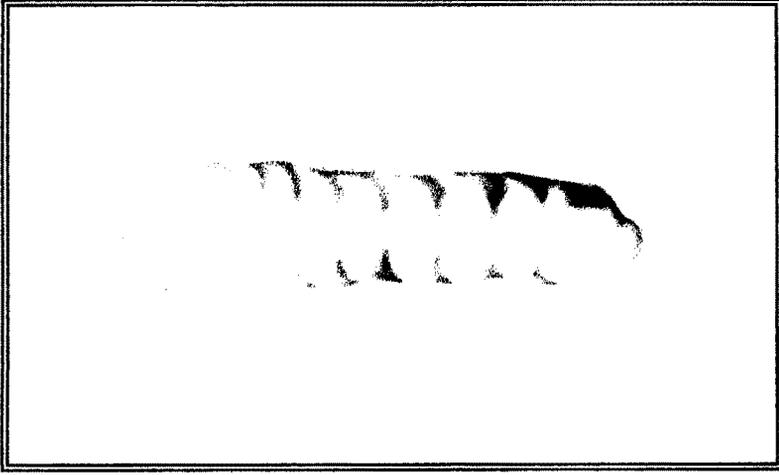
#### **Procedimiento:**

La curva patrón se elaboró preparando una solución estándar de proteínas de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml. de ovoalbúmina, las cuales fueron tratadas de la misma forma que la muestra problema y luego se procedió a hacer la lectura de absorbancia usando como blanco agua destilada. Se ajustó los datos mediante regresión lineal. Los resultados se expresaron en mg de proteínas/ml.

1. En un tubo de ensayo se colocó 1 ml del extracto enzimático total, al cual se le añadió 2 ml de  $\text{NaOH}$  3 N, se expuso a baño María hirviendo por 5 min.
2. Se dejó enfriar al medio ambiente y se añadió 2 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2.5%.
3. Luego se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.
4. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 554 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D, Milton Roy.
5. Paralelamente se preparó el blanco utilizando agua destilada en lugar del extracto enzimático total.
6. Los resultados se expresaron en mg de proteínas/ml extrapolando las lecturas en una curva patrón.

# IV. RESULTADOS

Larva



Pupa



Adulto

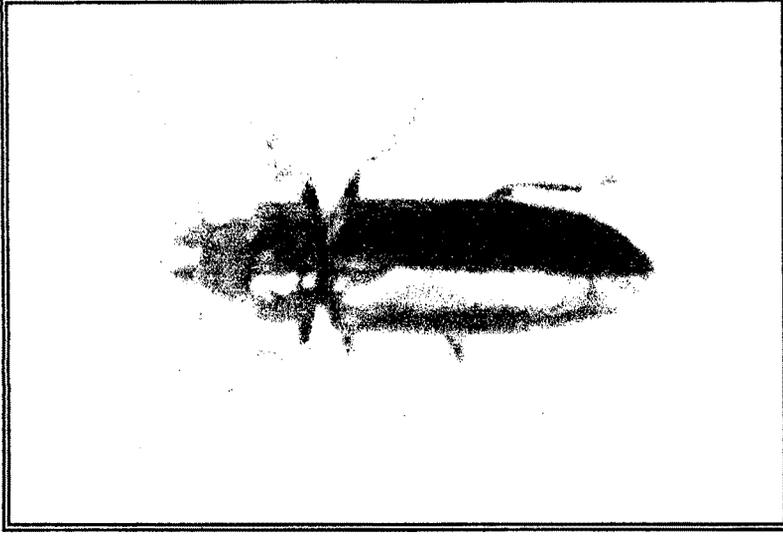
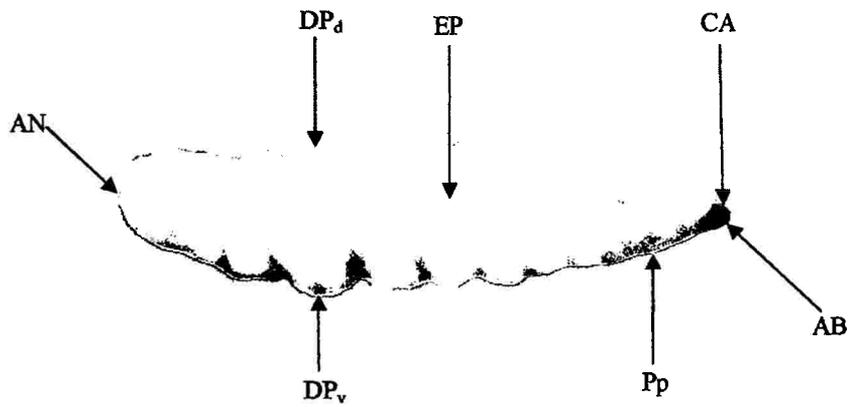


FIGURA N°3: FASES DE LA METAMORFOSIS DE "*Stenodontes spinibarbis*"



**FIGURANº 4: (A) PARTES DE ESTADO LARVAL "*Stenodontes spinibarbis*"**

**PARTES:**

CA : Cabeza.

AB : Aparato bucal.

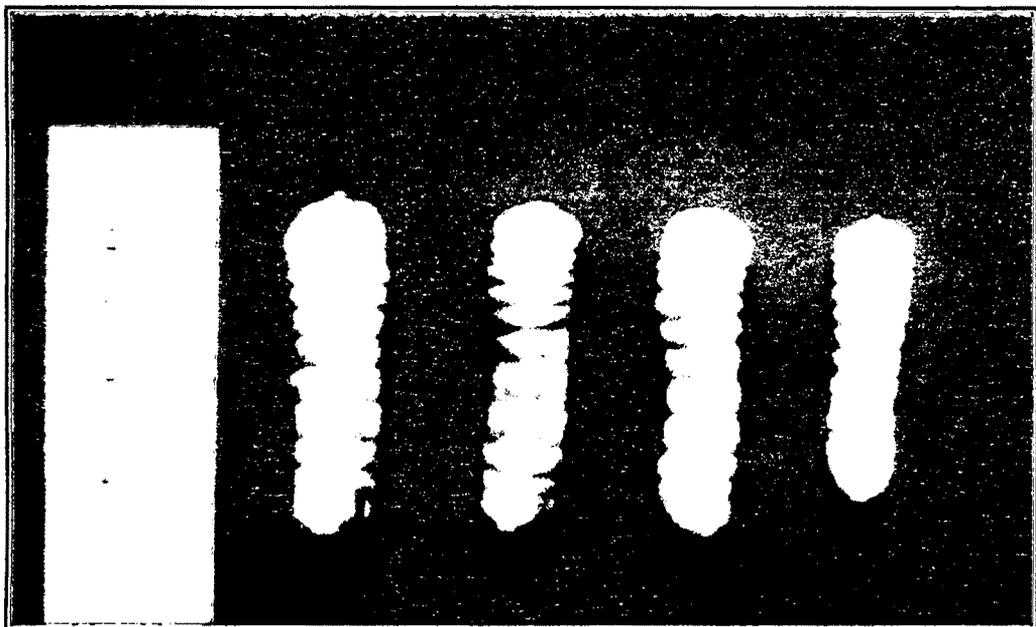
Pp : Pseudo patas.

EP : Espiráculos.

DP<sub>d</sub>: Discos pleurales dorsales.

DP<sub>v</sub>: Discos pleurales ventrales.

AN :Ano.



**FIGURANº 4: (B) TAMAÑOS DEL ESTADO LARVAL DE "*Stenodontes spinibarbis*"**

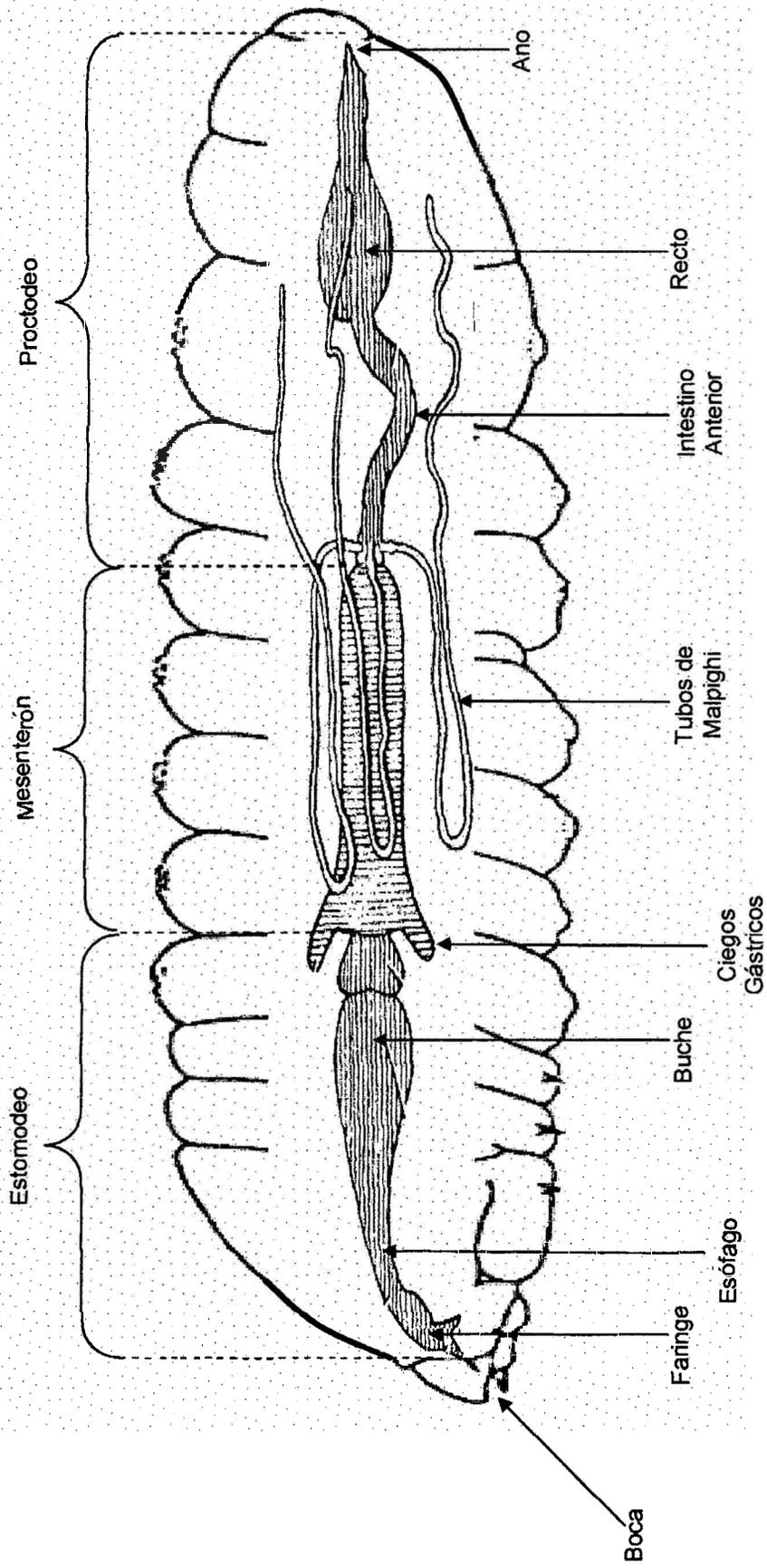


FIGURA N° 5: ESQUEMA GENERAL DEL TUBO DIGESTIVO DE LA LARVA *Stenodontes spinibarbis*

TABLA N° 1

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DEL EXTRACTO  
ENZIMATICO TOTAL DE MESENTERON DE LA LARVA

Stenodontes spinibarbis "Joti"

| TEMPERATURA | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|-------------|------------------------|---|--------|---------|
|             |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 3.79                                    | 2.25   | 0.52    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 4.89                                    | 1.15   | 0.00    |
| 37°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 3.39                                    | 1.86   | 0.17    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 5.23                                    | 0.85   | 0.04    |
| 50°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 1.36                                    | 0.54   | 0.23    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 4.44                                    | 0.26   | 0.08    |

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda:

(a) : Extracto enzimático total del mesenterón de la larva "joti" (promedio de tres determinaciones).

(b) : Celulasa de *Trichoderma reesei*.

(c) : Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**Figura N° 6: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DEL  
EXTRACTO ENZIMATICO TOTAL DE MESENTERON DE LA LARVA  
*Stenodontes spinibarbis* "joti"**

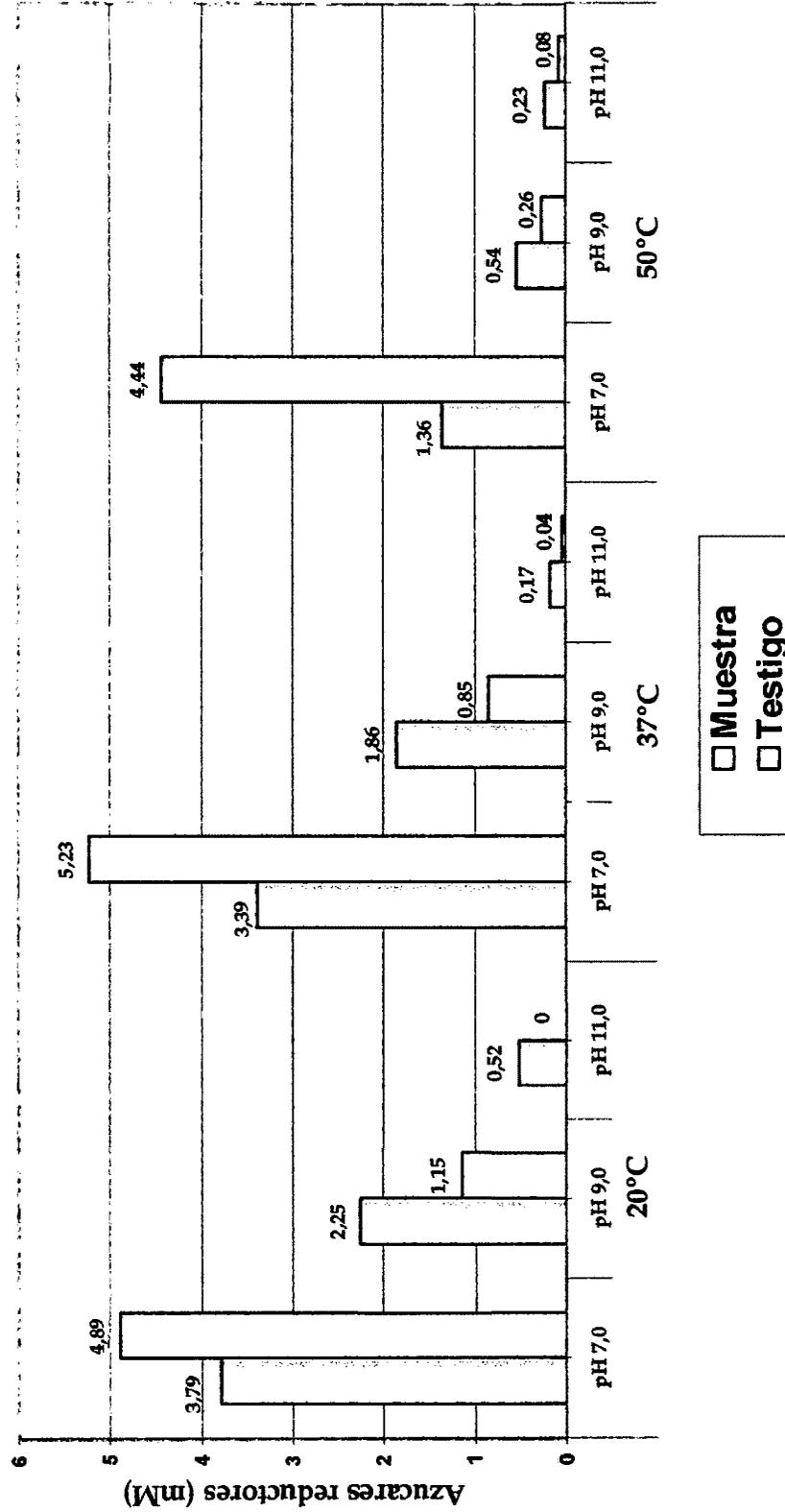


TABLA N° 2

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EXOGLUCANASA DEL EXTRACTO  
ENZIMATICO TOTAL DE MESENTERON DE LA LARVA

Stenodontes spinibarbis "joti"

| TEMPERATURA | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|-------------|------------------------|---|--------|---------|
|             |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.27                                    | 2.02   | 4.04    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 0.25                                    | 0.20   | 0.20    |
| 37°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 1.66                                    | 2.00   | 1.81    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 0.35                                    | 0.15   | 0.30    |
| 50°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.61                                    | 2.11   | 1.87    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 0.14                                    | 0.08   | 0.07    |

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda:

- (a) : Extracto enzimático total del mesenterón de la larva "joti" (promedio de tres determinaciones)
- (b) : Celulasa de *Trichoderma reesei*.
- (c) : Valores promedio en base a dsterminaciones por triplicado.

**Figura N° 7: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD EXOGLUCANASA  
DEL EXTRACTO ENZIMATICO TOTAL DE MESETERON DE LA LARVA  
*Stenodontes spinibarbis* "joti"**

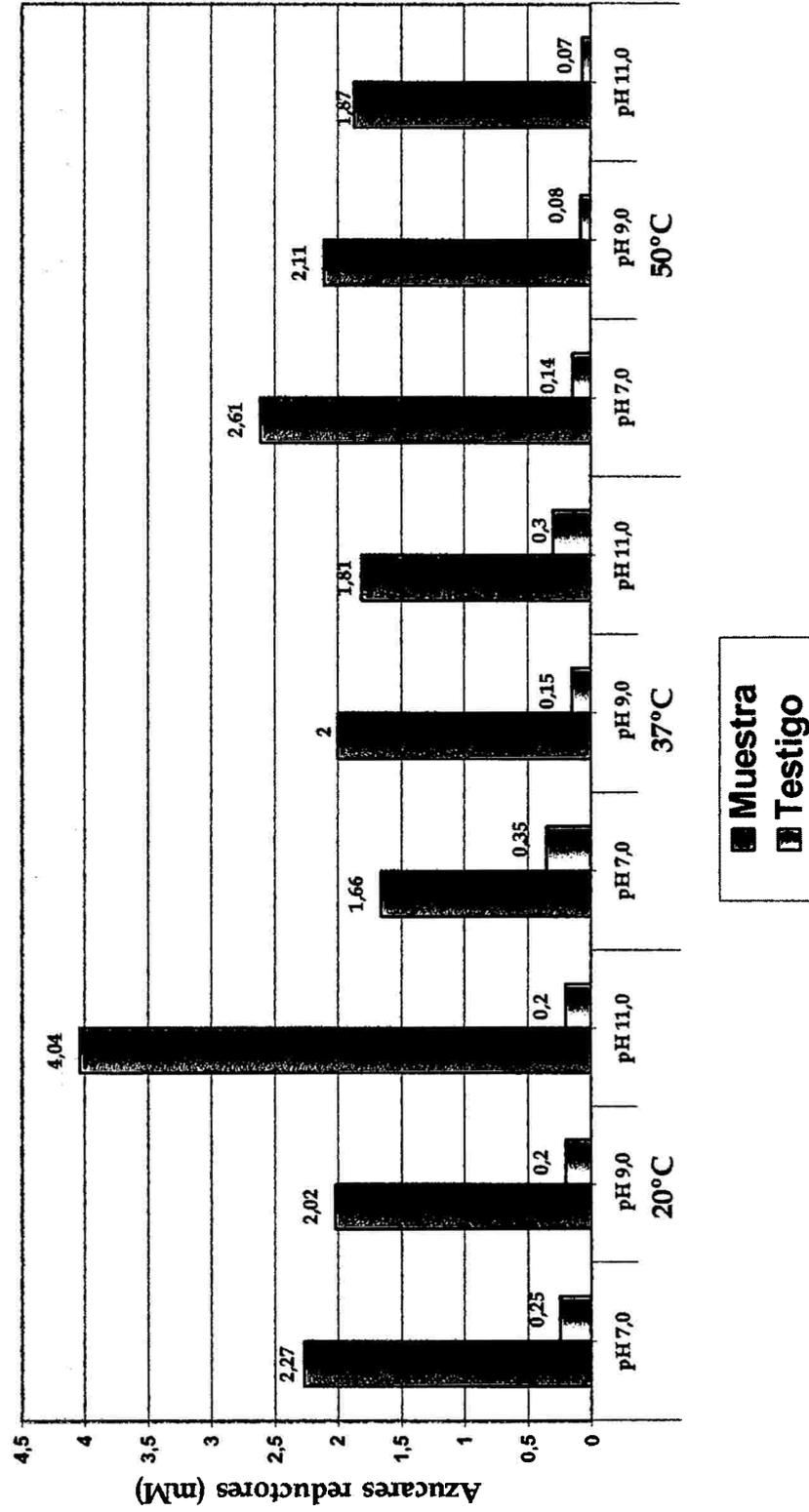
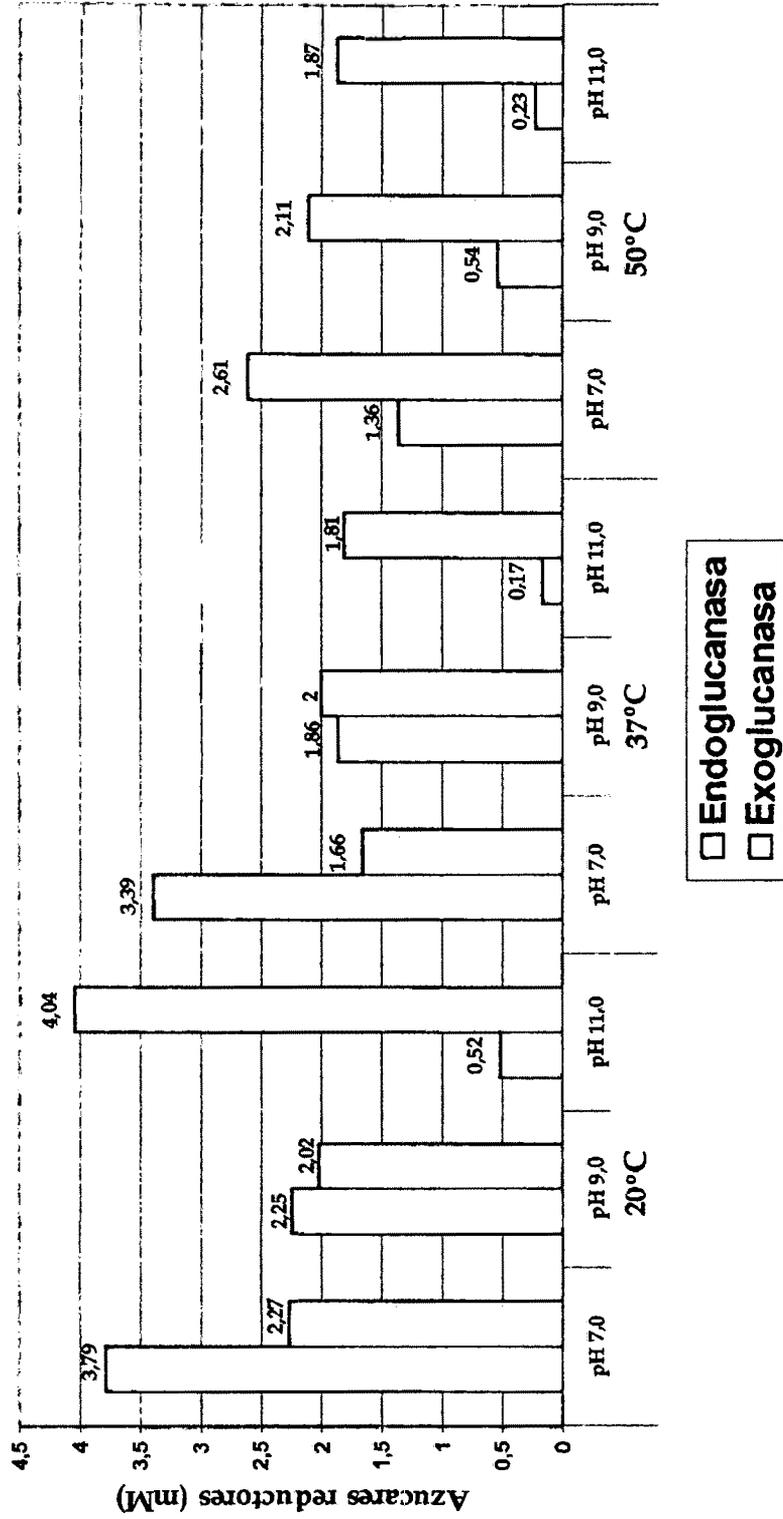


Figura N° 8: COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA Y EXOGLUCANASA DEL EXTRACTO ENZIMATICO TOTAL DE MESENTERON DE LA LARVA *Stenodontes spinibarbis* "joti"



**TABLA N° 3**  
**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD  $\beta$ -GLUCOSIDASA DEL EXTRACTO**  
**ENZIMATICO TOTAL DE MESENTERON DE LA LARVA**

**Stenodontes spinibarbis "joti"**

| TEMPERATURA | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|-------------|------------------------|---|--------|---------|
|             |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 0.45                                    | 0.42   | 0.66    |
| 37°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.34                                    | 1.94   | 1.84    |
| 50°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.22                                    | 2.82   | 2.25    |

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda:

" (a) : Extracto enzimático total del mesenterón de la larva "joti" (promedio de tres determinaciones).

(c) : Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**Figura N° 9: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD GLUCOSIDASA  
DEL EXTRACTO ENZIMATICO TOTAL DE MESETERON DE LA LARVA  
*Stenodontes spinibarbis* "joti"**

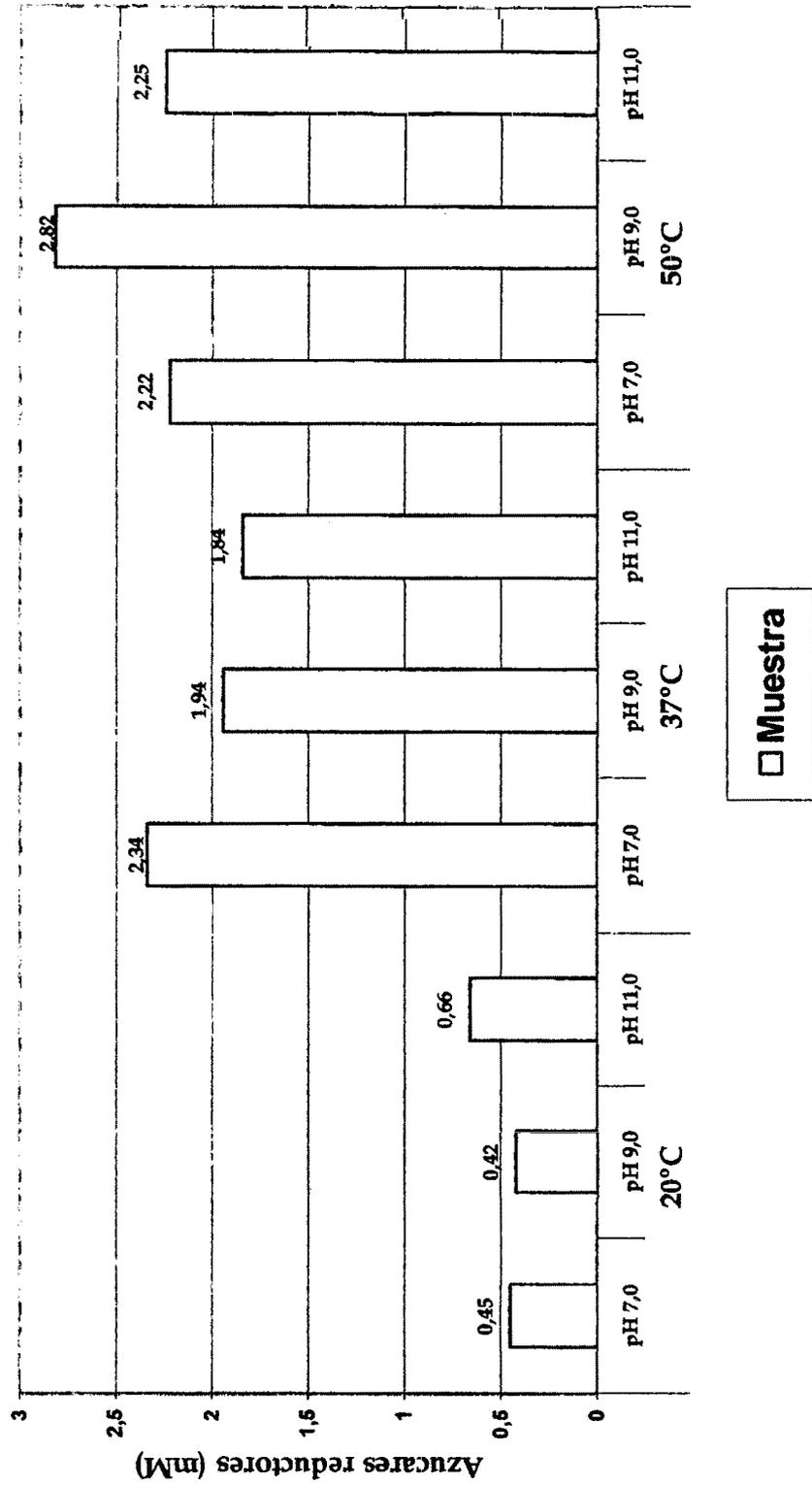


TABLA Nº 4

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA DEL EXTRACTO  
ENZIMATICO TOTAL DE MESENTERON DE LA LARVA

Stenodontes spinibarbis "joti"

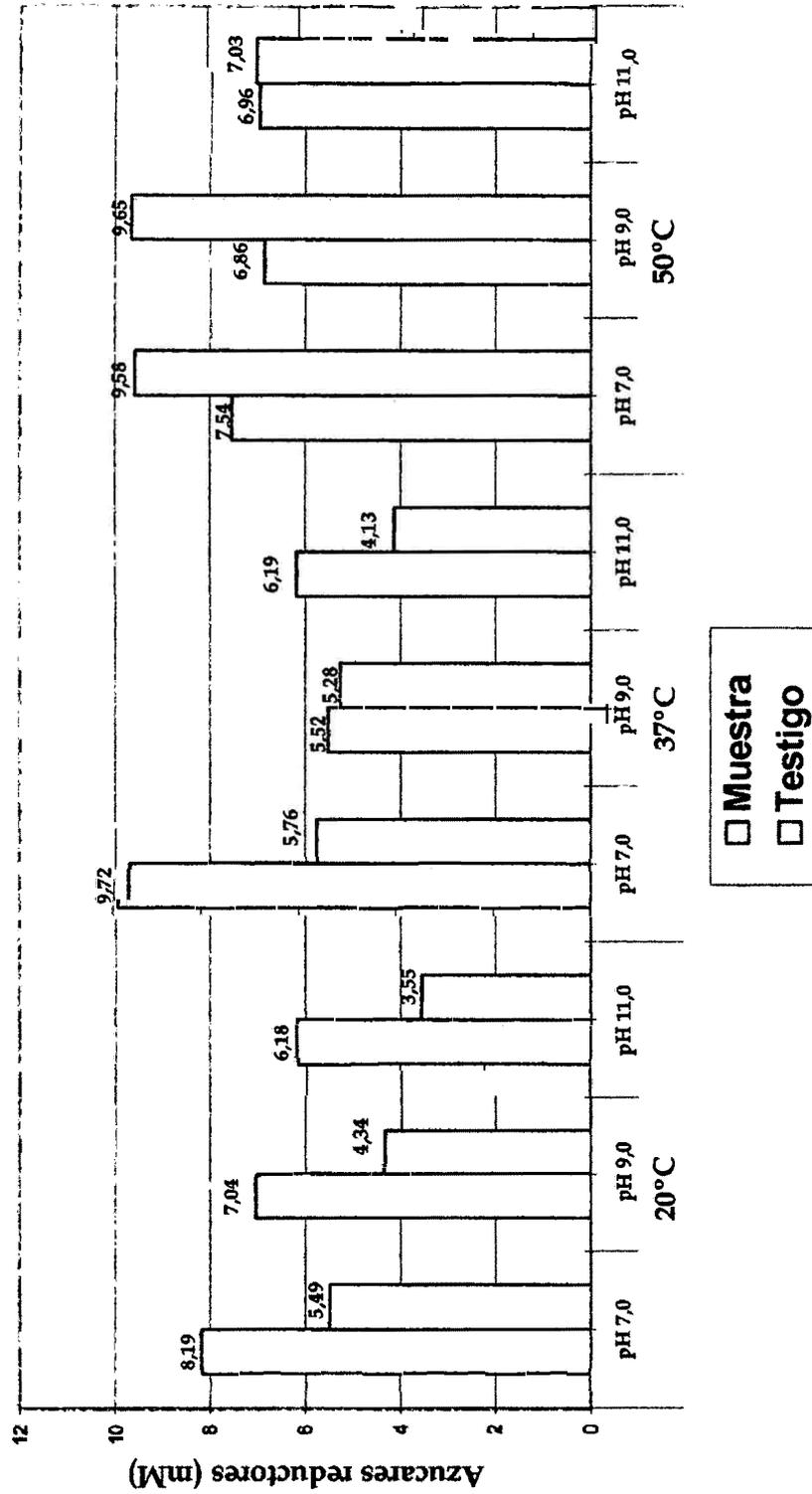
| TEMPERATURA | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|-------------|------------------------|---|--------|---------|
|             |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 8.19                                    | 7.04   | 6.18    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 5.49                                    | 4.34   | 3.55    |
| 37°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 9.72                                    | 5.52   | 6.19    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 5.76                                    | 5.28   | 4.13    |
| 50°C        | Muestra <sup>(a)</sup> | 7.54                                    | 6.86   | 6.96    |
|             | Testigo <sup>(b)</sup> | 9.58                                    | 9.65   | 7.03    |

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda:

- (a) : Extracto enzimático total del mesenterón de la larva "joti" (promedio de tres determinaciones)
- (b) :  $\alpha$ -Amilasa de *Bacillus subtilis*.
- (c) : Valores promedio en base a dsterminaciones por triplicado.

**Figura N° 10: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD AMILOLITICA DEL  
EXTRACTO EMZIMATICO TOTAL DE MESETERON DE LA LARVA  
Stenodontes spinibarbis "joti"**



## V. DISCUSIONES

No hay antecedentes de estudios sobre "joti", por lo que la discusión se hizo sólo con los datos obtenidos.

Los resultados presentados en la sección anterior corresponden a un total de 60 larvas de *Stenodontes spinibarbis* "joti", las cuales fueron recolectadas principalmente en el CERE "La Totorilla" y el Distrito de Luricocha-Huanta. Estas larvas fueron encontradas dentro de sus propias galerías, que son profundas y ubicadas generalmente entre el xilema y el floema de los tallos de árboles viejos de lúcumá, molle y sauce, entre otros, lo que evidencia a primera vista el carácter xilófago de las larvas de este coleóptero, es decir, que aparentemente se alimentan casi exclusivamente de celulosa. Con base en la información de la literatura, si bien el estadio larvario de *Stenodontes spinibarbis* toma un tiempo de 2 a 3 años (8), no fue posible identificar cada una de las etapas de la metamorfosis, sin embargo, se encontraron algunas fases representativas que se muestran en la FIGURA N° 3.

En lo referente a la morfología externa de la larva, ésta es de tegumento blando y rugoso, sin pigmentación, su cuerpo es turgente, con patas reducidas. La cabeza es transversa y de color pardo oscuro, con un aparato bucal tipo masticador que le ayuda a triturar sus alimentos. Su longitud varía con el estado de la metamorfosis, sin embargo, una larva promedio alcanza una longitud de 7 a 9 cm. y tiene las siguientes partes, conforme se detalla en la FIGURAN° 4 (A) (B).

Tras la disección del material biológico, se encontró que el tubo digestivo de la larva tiene una longitud aproximadamente equivalente a tres veces su tamaño. Este tubo digestivo mostró estar dividido en tres regiones: el intestino anterior o estomodeo, el intestino medio o mesenterón y el intestino posterior o proctodeo. Las glándulas salivales son pequeñas y difíciles de ubicar, sirven para humedecer y disolver el alimento y en muchos casos la secreción salival contiene algunas enzimas digestivas tales como celulasas y amilasas (17). El esquema general del tubo digestivo de la larva de *Stenodontes spinibarbis* se muestra en la FIGURAN° 5.

En la TABLA N° 1, se observa que el extracto enzimático total del mesenterón de la larva de *Stenodontes spinibarbis* tiene mayor actividad de endoglucanasas a un valor de pH 7.0, tanto a 20, 37 y 50°C en comparación con la actividad de endoglucanasas a valores de pH 9.0 y 11.0. Dentro de este valor de pH 7.0 se encontró que la máxima actividad de endoglucanasas fue a 20°C con un valor de 3.79 mM, seguido de 37°C con un valor de 3.39 mM y por último a 50°C con un valor de 1.36 mM. En ninguno de los tratamientos la actividad de endoglucanasas del extracto enzimático total fue mayor que la del testigo (celulasa

de *Trichoderma reesei*, 5 mg/ml). Estos resultados se pueden visualizar mejor en la FIGURAN° 6.

Al respecto, cabe manifestar que son pocas las especies de insectos xilófagos que se alimentan de celulosa como única fuente de carbono y energía, siendo las larvas de cerambícidos, entre otras, las que se encuentran reportadas por su capacidad de degradar la celulosa. Esta capacidad, sin embargo, puede tener hasta tres orígenes: (a) uno de naturaleza endógena, es decir que las células del epitelio columnar del intestino de la larva son las responsables de la secreción de las celulasas necesarias; (b) otro de naturaleza endosimbionte, que consiste en una rica fauna bacteriana o protozoaria adquirida e instalada en el intestino, la misma que produce las celulasas implicadas en la degradación de la celulosa; y (c) otro de naturaleza ectosimbionte, que consiste en la presencia de hongos celulolíticos que invaden las galerías larvarias de modo tal que la larva utiliza como fuente de carbono y energía los productos de la hidrólisis de la celulosa (15, 17, 32, 45).

Volviendo al punto de los valores óptimos de pH y temperatura, para la actividad de endoglucanasas que fue a pH 7.0 y 20°C, esto concuerda con lo señalado en la bibliografía en el sentido de que el mantenimiento de la actividad enzimática es posible gracias a que el pH del tubo digestivo de los insectos xilófagos es próximo a la neutralidad (entre 6.8 y 7.2 en general) (15), siendo muy distinto con el caso de las larvas de insectos fitófagos como por ejemplo lepidópteros cuyo intestino tiene un pH fuertemente alcalino, entre 9.0 y 10.0 en general.

En la TABLA N° 2, se reportan los resultados de la actividad de exoglucanasas del extracto enzimático total de mesenterón de *Stenodontes spinibarbis* "joti". Al respecto, se encontró mayor actividad de exoglucanasas a un pH de 11.0 y a una temperatura de 20°C, con un valor de 4.04 mM; seguido de 2.61 mM a pH 7.0 y 50°C y por último 2.27 mM a pH 7.0 y 20°C. En todos los tratamientos la actividad de exoglucanasas superó a la del testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*, 5 mg/ml). Esto significa que la larva de *Stenodontes spinibarbis* tiene principalmente actividad exoglucanasa. Estos resultados se pueden visualizar mejor en la FIGURA N° 7.

El mejor modelo que actualmente permite explicar el proceso de degradación biológica de la celulosa admite la existencia efectivamente de dos grupos de enzimas distintas que intervienen en la transformación de la celulosa en celobiosa (endoglucanasas y exoglucanasas); y esta última después es transformada en glucosa por un tercer grupo de enzimas (glucosidasas). Este modelo se ha extendido tanto para microorganismos e insectos (15, 27, 39, 44).

En cuanto al pH y la temperatura, lo lógico sería esperar que la actividad de exoglucanasas sea óptima a pH 7.0 y 20°C, por cuanto estas son las condiciones que tiene la larva de *Stenodontes spinibarbis*. Sin embargo, los resultados nos indican que probablemente en el extracto enzimático total de mesenterón están presenten varios tipos de exoglucanasas, unas que trabajan bien al valor del pH intestinal (7.0) y otras que trabajan también a pH alcalino, demostrando en todos los casos tener termoestabilidad, pues a 50°C se obtuvo buena actividad de exoglucanasas tanto a pH 7.0, 9.0 y 11.0.

La comparación entre ambas actividades, tanto de endoglucanasas y de exoglucanasas, se representa en la FIGURA N° 8. Como se observa, la actividad de exoglucanasas fue marcadamente superior para la gran mayoría de tratamientos a diferentes pHs y temperaturas, excepto para pH 7.0 y pH 9.0 (a 20°C) y pH 7.0 (a 37°C). El hecho de encontrar sobre todo actividad exoglucanasa en el extracto enzimático total de mesenterón de *Stenodontes spinibarbis*, es muy importante por cuanto las enzimas exoglucanasas son las que atacan precisamente el componente mayoritario y más recalcitrante de la celulosa de la madera, es decir, las regiones cristalinas, produciendo oligosacáridos o celobiosa y al mismo tiempo creando nuevos sitios de ataque para las endoglucanasas, lo que se traduce naturalmente en una mayor eficiencia en la degradación enzimática de la celulosa. Esta capacidad manifiesta, junto con la existencia de un poderoso aparato masticador, permiten explicar claramente la relativa velocidad y facilidad con la que las larvas construyen sus galerías alimentándose paralelamente de celulosa.

Un estudio de perfiles electroforéticos del extracto enzimático total de mesenterón, que bajo el método empleado contenía 0.66 mg/ml de proteína total soluble, sería posible si se pudiera disponer de un equipo de cromatografía líquida estándar y un equipo de electroforesis vertical para proteínas, permitiendo corroborar el número de enzimas y sus pesos moleculares aproximados tanto de las endoglucanasas como de las exoglucanasas presentes en el extracto enzimático.

Adicionalmente, el hecho de obtener la actividad exoglucanasa más alta a un pH de 11.0, podría significar la presencia de una exoglucanasa de interés para la industria de los detergentes y por tanto de la lavandería, toda vez que podría

resultar interesante para la formulación de detergentes biológicos que se usan ampliamente en la actualidad, los cuales tienen la propiedad de eliminar las “peluzas” de los jeans u otras telas a base de algodón (fibras de celulosa), a condiciones de pH alcalino, entre 8.5 – 9.0, permitiendo mantener el aspecto “nuevo” de las prendas de vestir (5).

La TABLA Nº 3, contiene los valores de actividad de  $\beta$ -glucosidasas. Este grupo de enzimas permite una acción complementaria consistente en la transformación, poco a poco conforme va apareciendo, de la celobiosa en glucosa. En este caso los resultados se encuentran un tanto dispersos en cuanto al pH siendo los valores de actividad de 2.82 a pH 9.0; 2.34 a pH 7.0; y 2.25 a pH 11.0, al parecer también podría tratarse de varios tipos de  $\beta$ -glucosidasas las cuales tendrían mayor actividad a temperaturas de 37 y 50°C, es decir, que al igual que las exoglucanasas serían también termoresistentes. Estos resultados se pueden visualizar fácilmente en la FIGURANº 9.

En la TABLA Nº 4, se tienen los resultados de la determinación de actividad amilolítica del extracto enzimático total de mesenterón. Aparentemente no tendría sentido la determinación de esta actividad por cuanto se sabe que la madera se compone principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina; sin embargo, el almidón también forma parte de la composición química de la madera, siendo variable la proporción en la que se encuentra. Prácticamente es inexistente en la madera de corazón, se encuentra entre el 1-5% en la albura, 3-37% en el cambium y 4-23% en el floema (15). Esto supone que la larva de *Stenodontes spinibarbis* en

algún momento de su ciclo biológico hace uso del almidón como fuente de carbono y energía. Los resultados nos indican que hay una considerable actividad amilolítica a los valores de pH y temperatura ensayados, conforme se observa en la FIGURA N° 10. En todos los casos y bajo las condiciones establecidas, los valores de actividad amilolítica fueron superiores al testigo ( $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*, 2 mg/ml); excepto a valores de pH 7.0, 9.0 y 11.0 a 50°C donde la actividad amilolítica del testigo fue superior.

Finalmente, los resultados presentados concuerdan con la bibliografía referente a la capacidad enzimática de las diferentes especies de coleópteros xilófagos por cuanto para cerambícidos tales como *Cerambix cerdo* y *Ergates faber* se ha reportado tanto actividad de celulasas, amilasas y proteasas (15).

## VI. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- 1.- El extracto enzimático total de larvas de *Stenodontes spinibarbis* "joti", mostró tener actividad enzimática tanto de endoglucanasas y exoglucanasas; sin embargo, la actividad de exoglucanasas fue mucho mayor, lo que explica su carácter xilófago y su alta capacidad para degradar sobre todo las regiones cristalinas de la celulosa de la madera, así como su gran habilidad para construir profusas galerías larvarias cuyas consecuencias se traducen en la muerte de la planta hospedera.
- 2.- La actividad de endoglucanasas del extracto enzimático total de mesenterón de "joti", fue inferior a la actividad celulolítica de la enzima de *Trichoderma reesei*, utilizada como testigo; mientras que, la actividad de exoglucanasas del extracto enzimático fue marcadamente superior en todos los tratamientos frente al testigo, especialmente a pH alcalino, lo que permite deducir que se

trataría de una exoglucanasa mucho más potente que el testigo, la misma que podría tener aplicación en la formulación de detergentes biológicos.

- 3.- A la temperatura de 50°C, la actividad de exoglucanasas fue mayor que la actividad de endoglucanasas, lo que permite establecer que se trata de enzimas termoestables, siendo ésta una característica deseable para evaluar su potencial biotecnológico. Este mismo carácter se observó en la actividad de  $\beta$ -glucosidasa.
  
- 4.- La actividad amilolítica del extracto enzimático total de mesenterón de larvas de *Stenodontes spinibarbis* "joti", fue en promedio mayor que la del testigo ( $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*) a temperaturas de 20 y 37°C y en todos los pHs (7.0, 9.0 y 11.0). En cambio, fue menor a 50°C en los tres valores de pHs. Esto significa que aparentemente no se trata de una amilasa termorresistente.

## VII. RECOMENDACIONES

Se plantean las siguientes recomendaciones:

- 1.- Realizar el análisis del perfil electroforético del extracto enzimático total de mesenterón de las larvas de "joti", con la finalidad de establecer el número de celulasas presentes; así como del perfil cromatográfico para estimar el peso molecular de cada una de ellas, con lo que se podrá diseñar su purificación a fin de caracterizar cada una de las enzimas.
- 2.- Determinar el grado de infestación según árboles frutales, forestales y según zonas de importancia en nuestra Región.
- 3.- Iniciar paralelamente los estudios enfocados al control biológico de este insecto, especialmente mediante el uso de microorganismos entomopatógenos.
- 4.- Realizar otros trabajos de investigación con la finalidad de establecer el carácter endógeno o simbiote de las celulasas del "joti".

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Bayer, E; Chanzy, H; Lamed, R; Shoham, Y.** (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. Current opinion in structural biology. Vol: 8. pag. 548 – 558.
2. **Béguin, P.** (1990). Molecular Biology of Cellulose degradation. Annu. Rev. microbiol. France. Vol: 44. pag. 219 – 248.
3. **Bergmann, F; Abe, J; Hizukuri, S.** (1988). Selection of microorganisms which produce raw-starch degrading enzymes. Appl. Microbiol. Vol: 27. pag. 443-446.
4. **Berk.** (1980). Introducción a la Bioquímica de los Alimentos. Edit. El Manual Moderno. España.
5. **Bhat, M.** (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances. Vol: 18. pag. 355– 383.
6. **Britton, E.** (1970). The Insect of Australia. Melbourne University Press.
7. **Bruchman, E.** (1980). Bioquímica Técnica: química alimentaria, de las fermentaciones y agrícola. Edit. Acribia. Zaragoza (España).
8. **Brugnoni.** (1980). Plagas Forestales. Edit. Hemisferio Sur. México. URL:[http://www.glacoxan.com/fichas\\_tecnicas/fichas\\_tecnicas\\_015.htm](http://www.glacoxan.com/fichas_tecnicas/fichas_tecnicas_015.htm)
9. **Calvet, F.** (1961) Bioquímica para Médicos y Químicos Farmacéuticos. 2da edición. Edit. Alambra S.A. México – Madrid.
10. **Ceroni, A.** (1988). Detección y evaluación de germoplasma celulolítico en 1326 cepas de hongos de suelos. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.

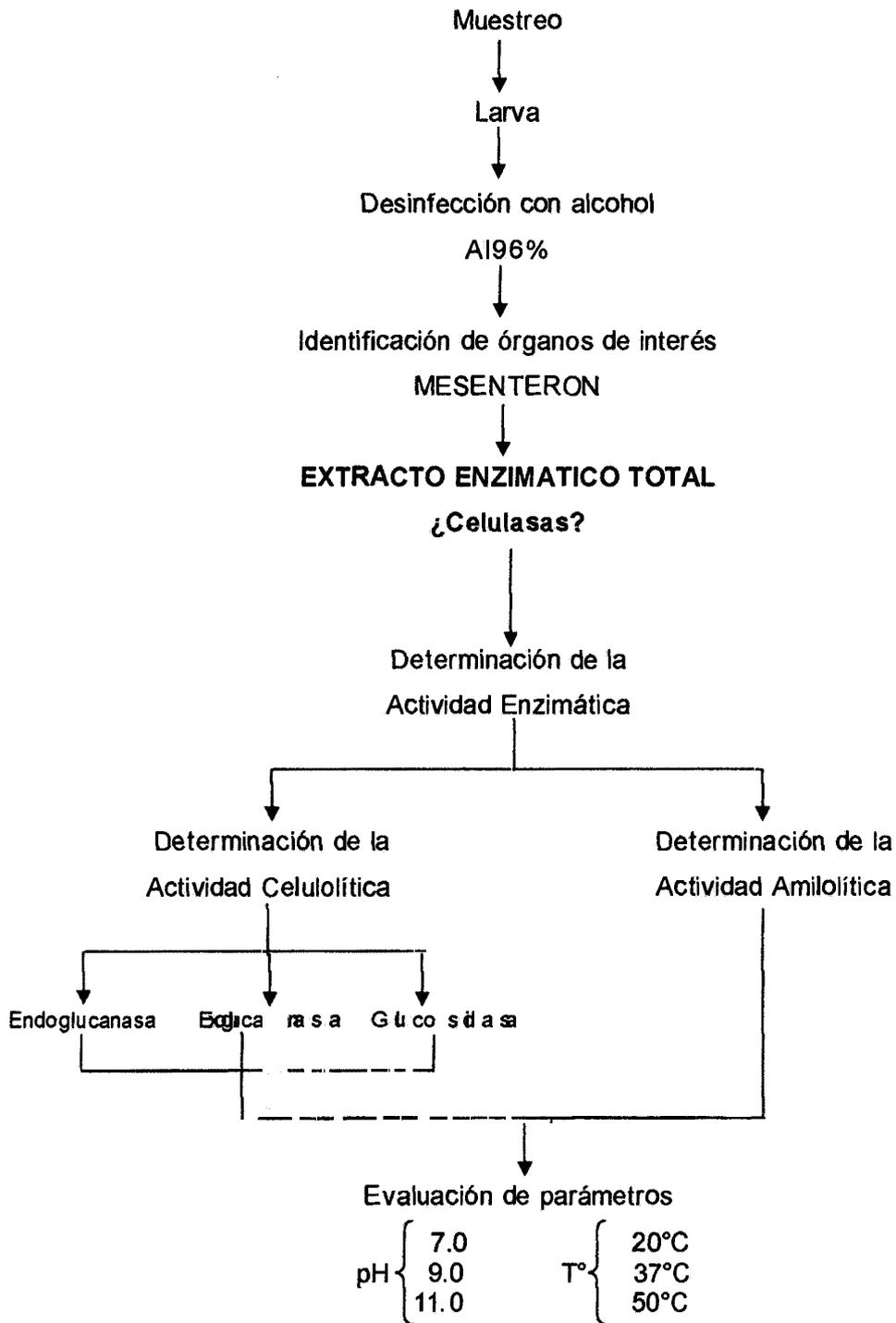
11. **Ceroni, A; Gutierrez – Correa, M.** (1988). Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. Boletín de Lima. Vol: 55. pag. 13-20.
12. **Cisneros, F.** (1980). Control de las Plagas Agrícolas. La Molina. Lima – Perú.
13. **Coulson, R.** (1990). Entomología Forestal: Ecología y Control. Edit. Limusa S.A. México.
14. **Coultate, T.** (1998). Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos. 2<sup>da</sup> Edición. Edit. Acribia. S. A. España.
15. **Bajos, R.** (2001). Entomología Forestal: Los Insectos y el Bosque. Edit. Mundi – Prensa. México.
16. **Davidson, R.** (1992). Plagas de Insectos. Edit. Limusa S.A. México.
17. **Davies, R.** (1991). Introducción a la entomología. Edit. Mundi-Prensa. Madrid.
18. **Domínguez, F.** (1993). Plagas y Enfermedades de las Plantas Cultivadas. 9<sup>na</sup> Edición. Edit. Mundi– Prensa. Madrid– España.
19. **Gutiérrez, A.** (1997). Identificación de las glucanasas producidas por *Cellulomonas flavigena* en diferentes fuentes de carbono. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México.
20. **Henrissat, B; Coutinho, P.** (2001). Carbohydrate – Active Enzyme Server (CAZY). URL:<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>
21. **Henriksson, G; Nutt, A; Henriksson, H; Pettersson, B; Stahlberg, J; Pettersson, G.** (1999). Endoglucanase 28 (Cel 12 A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulase. Eur. J. Biochem. Vol: 259. pag. 88 – 95.
22. **Lehninger, A.** (1992). Bioquímica. 2da Edición. Edit. Omega. S. A España (Barcelona).
23. **Madigan, M; Martinko, J; Parker, J.** (1999). Biología de los Microorganismos. 8va edición. Edit. Prentice – Hall. Madrid.
24. **Mejía, T; Mujica, F; Gonzáles, A; Ortega, J.** (2002). Proteínas con Afinidad a Celulosa: Una Herramienta en Biotecnología. Vol: 21. pag. 267 – 271.
25. **Metcalf, C; Flint, W.** (1962). Insectos destructores e Insectos útiles: Sus Costumbres y su Control. Edit. Continental. S.A. México.
26. **Miller, G.** (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. Vol: 31. pag. 426-428.
27. **Moat, A; Foster, J.** (1995). Microbial physiology. 3<sup>th</sup>. Edit. Wiley – Liss. New

- York, pag. 352 – 355.
28. **Mujica, F.** (2001). Clonación y Expresión de un Dominio de Unión de Celulosa (CBD) de *Cellulomonas flavigena*. Tesis para obtener el Grado de Maestría en Ciencias, Especialidad de Biotecnología. CINVESTAV-IPN. México.
  29. **Primo, E y Yúfera.** (1995). Química Orgánica Básica y Aplicada de la Molécula a la Industria. Tomo II. Edit. Reverté. S. A España (Barcelona).
  30. **Ramírez, A.** (1985). Ecología de las Zonas de Vida de la Provincia de Huamanga. Rev. Invest. Biol. UNSCH. Ayacucho– Perú. Vol I. N°1: 94-123.
  31. **Ramírez, P.** (1993). Degradación Enzimática de Celulosa por *Actinomicetos Termófilos*: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. Tesis para optar el Título de Biólogo. UNMSM. Lima.
  32. **Richards, O; Davies, R.** (1983). Tratados de entomología Imms. Edit. Omega, S.A. Barcelona. Vol I.
  33. **Ross, H.** (1964). Introducción a la Entomología General y Aplicada. Edit. Omega. S.A. Barcelona.
  34. **Saddler, J.** (1982). Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme system. *Enzyme Microb. Technol.* Vol: 4. pag. 414-418.
  35. **Shelegel, H.** (1975). Microbiología General. Edit. Omega. Barcelona.
  36. **Snogross, R.** (1935). Principles of Insect Morphology. Edit. MacGraw – Hill. NewYork.
  37. **Stryer, L.** (1995). Bioquímica. 4<sup>ta</sup> Edición. Edit. Reverté. S. A. Tomo II. España (Barcelona).
  38. **Stutzenberger, F.** (1972). Cellulolytic activity of *Thermomospora curvata*: Nutritional requeriments for cellulase production. *Appl. Microbiol.* Vol: 24. pag. 77-82.
  39. **Tomme, P; Warren, R; Gilkes, N.** (1995). Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi. *Advances in Microbial Physiology.* Canada. Vol: 37. pag. 1 – 81.
  40. **Vargas, L.** (2000) Celulasas: Celulasas Clostridiales, Estado actual e Importancia Biotecnológica. Universidad de Pamplona. URL:[http://www.unipamplona.edu.co/upw\\_pdf/clon\\_1\\_art\\_5.pdf](http://www.unipamplona.edu.co/upw_pdf/clon_1_art_5.pdf)
  41. **Vilca, J.** (1990). Plagas del Molle (*Schinus molle*) en Ayacucho. UNSCH – CIID. Ayacucho – Perú.
  42. **Vilches, L.** (2002). Determinación de la Actividad de Exoglucanasas de Cepas

- Fúngicas Nativas de las Provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis para optar el Título de Biólogo. UNMSM. Lima.
43. **Villavicencio, N.** (1993). Bioquímica, CONCYTEC. Lima – Perú.
  44. **Watanabe, H; Tokuda, G.** (2001). Animal Cellulases. CMLS, Cell. Mol. Life. Sci. Vol: 58. pag. 1167 – 1178.
  45. **Wigglesworth, V.** (1978). Fisiología de los insectos. Edit. Acribia. Zaragoza (España).
  46. URL:<http://www.axxon.com.ar/mus/info/art-DondeHallarInsectos.htm>  
(Artículo creado por Eduardo Carletti. Insectos de la Argentina y el Mundo – 2004).
  47. URL:<http://www.colegioalmenar.ie2000.cv.cl/proyectoexplora/cerambycid.htm>
  48. URL:<http://www.eny3005.ifas.ufl.edu/lab1/coleoptera/cerambycidae.htm>
  49. URL:<http://www.f.polar.org.ve/entomofaunaven.pdf> (Entomofauna Agrícola Venezolana, Maracay. 2003).
  50. URL:<http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/texto147.htm>
  51. URL:<http://www.monografias.com/trabajos10/plagfor/plagfor.shtml>
  52. URL:<http://www.um.es/molecula/celulosa.htm> (Libro de Biología 2 - Santillana)

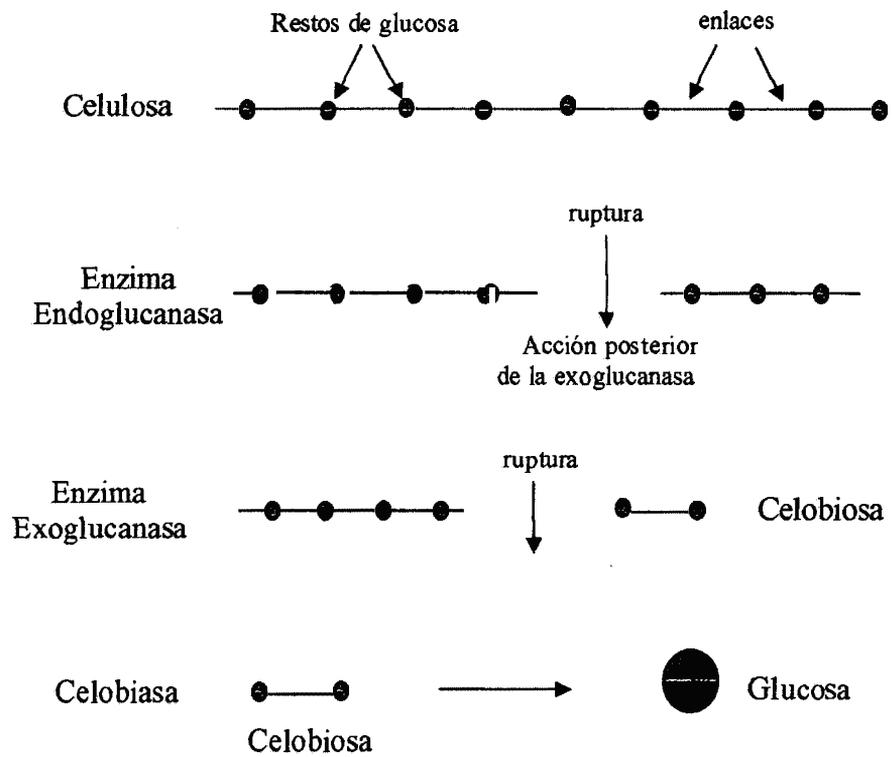
# IX. ANEXOS

**ANEXO N° 1**  
**ESQUEMA GENERAL**

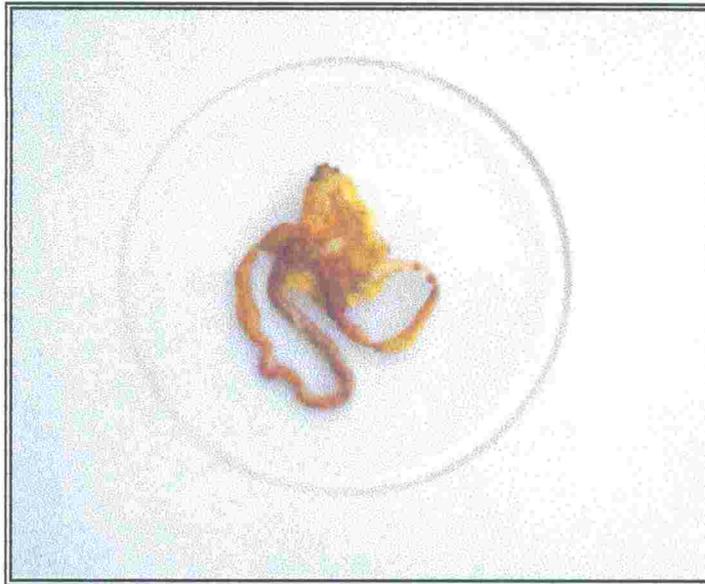


## ANEXO Nº 2

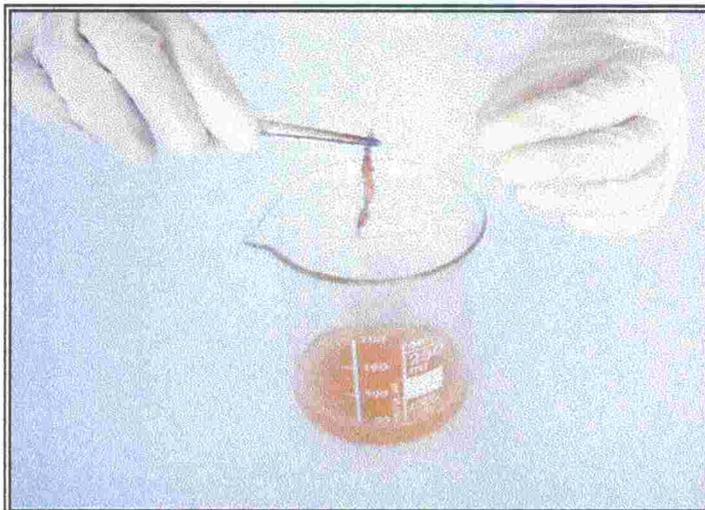
### REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA DEGRADACION DE LA CELULOSA



**ANEXO Nº 3 (FOTO Nº 01)**  
**DISECCION DE LA LARVA DE *Stenodontes spinibarbis***



**(FOTO Nº 02)**  
**OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO TOTAL**  
**DE MESETERON DE *Stenodontes spinibarbis***



**(FOTO N° 03)**  
**DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES**  
**(método del DNS)**



**ANEXO N° 4 (FOTO N° 04)**  
**HABITAT DE LA LARVA DE *Stenodontes spinibarbis***



**(FOTO N° 05)**  
**DAÑOS QUE OCASIONA LA LARVA BARRENADORA DE *Stenodontes spinibarbis***



## MATRIZ DE CONSISTENCIA

Autor: Lizbett M. RAMIREZ VARGAS

| TITULO   | PROBLEMA   | OBJETIVOS   | MARCO TEORICO   | HIPOTESIS   | VARIABLES E INDEPENDIENTES  | METODOLOGIA  |
|--|--|---|---|---|---|--|
| Determinación de la actividad celulolítica de la larva <i>Stenodontes spinibarbis</i> "joti" | ¿Cuál será la naturaleza de la actividad celulolítica de la larva <i>Stenodontes spinibarbis</i> "joti"? | -Determinar la actividad celulolítica de la larva <i>Stenodontes spinibarbis</i> "joti".<br><br>-Determinar los valores óptimos de pH y T° para la actividad endoglucanasa y exoglucanasa | Las celulasas son enzimas responsables de la hidrólisis del enlace glucosídico $\beta$ -1,4 de la celulosa, son miembros de la familia glucósido hidrolasa que hidrolizan oligosacáridos y finalmente celobiosa y glucosa, esto gracias a tres grupos de enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y $\beta$ -glucosidasas. Tales enzimas difieren en especificidad y modo de acción, actúan en sinergismo para degradar la celulosa<br><br><b>Referencia del organismo en estudio</b><br><br>Ubicación taxonómica<br>FILO : Artrópoda<br>CLASE : Insecta<br>ORDEN : Coleoptera<br>FAMILIA : Cerambycidae<br>GENERO : Stenodontes<br>ESPECIE : spinibarbis<br>N.Científico: <u>Stenodontes spinibarbis</u><br>N.Común : "joti" | El extracto total presentará una actividad celulolítica alta. | INDEPENDIENTES:<br>- Origen del extracto enzimático.<br>- T° óptima.<br>- PH óptimo.<br><br>DEPENDIENTE:<br>- Actividad celulolítica de la larva <i>Stenodontes spinibarbis</i> "joti". | POBLACION: Se considerará como las larvas existentes en los lúcumos, molles, eucaliptos, del distrito de Luricocha-Huanta y CERE "La Totorilla".<br>MUESTRA: Se considerará 60 larvas de <i>Stenodontes spinibarbis</i> ("joti").<br>DESCRIPCION MORFOLOGICA: Se realizará una descripción morfológica tanto externa como interna.<br>OBTENCION DEL EXTRACTO ENZIMATICO TOTAL:<br>Para obtener el extracto enzimático total de celulasas, un volumen del órgano de interés previamente triturado será mezclado con 10 volúmenes de agua desionizada en agitación a 5°C x 3h; se centrifugará y se utilizará el sobrenadante para la determinación de la actividad celulolítica<br>DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA:<br>A diferentes valores de pHs y temperaturas. |

## Determinación de la actividad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti"

Lizbett RAMIREZ V<sup>1</sup>, Fidel MUJICA L<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Formación Profesional de Biología. UNSCH.

<sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Microbiana. UNSCH.

### RESUMEN

El presente trabajo de investigación tubo como objetivo determinar la actividad celulolítica en larvas de *Stenodontes spinibarbis*, insecto conocido como "joti" y a partir de los resultados explorar su potencial biotecnológico como fuente de celulasas. Se trabajó con un total de 60 larvas, las cuales fueron recolectadas de árboles infestados como lúcuma, palto, molle y sauce de dos lugares, el Distrito de Luricocha, Provincia de Huanta y el Centro Ecológico Recreacional y Experimental "Las Totorilla" perteneciente a la UNSCH. Las muestras de larvas fueron transportadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas, donde se realizó el estudio correspondiente.

Primeramente se realizó la descripción morfológica de la larva, tanto externa como interna. A continuación se procedió a obtener el extracto enzimático total de mesenterón, para lo cual se mezcló un volumen del triturado con nueve volúmenes de agua desionizada, que luego fue dejado en agitación a 5°C por 3 h. Se centrifugó a 4000 rpm y el sobrenadante fue utilizado para realizar las siguientes determinaciones: actividad endoglucanasa, actividad exoglucanasa, actividad  $\beta$ -glucosidasa, actividad amilolítica y proteína total soluble. Las actividades enzimáticas fueron evaluadas a diferentes pH (7.0, 9.0 y 11.0) y a diferentes temperaturas (20, 37 y 50°C), por medio de la determinación de azúcares reductores (Método del DNS).

El extracto enzimático total de mesenterón de larvas de *Stenodontes spinibarbis*, mostró tener actividad enzimática tanto de endoglucanasas y exoglucanasas; sin embargo, la actividad de exoglucanasas fue marcadamente mucho mayor, lo que explica el carácter xilófago de las larvas y consecuentemente su alta capacidad para degradar sobre todo las regiones cristalinas de la celulosa de la madera, así como su gran habilidad para construir profusas galerías larvarias cuyas consecuencias se traducen en la muerte de la planta hospedera. Adicionalmente, la actividad de exoglucanasas, fue superior en todos los tratamientos frente al testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*), especialmente en los tratamiento a pH alcalino, lo que permite deducir de manera preliminar que se trata de exoglucanasas que podrían tener aplicación en la formulación de detergentes biológicos para la industria de la lavandería. De otro lado, el hecho de tener mayor actividad de exoglucanasas a la temperatura de 50°C, permite revelar el carácter termoestable de estas enzimas, lo cual es deseable si se trata de buscar su aplicación industrial.

Todos estos resultados ameritan continuar estudiando este sistema celulolítico eucariota con miras a establecer su potencial biotecnológico.

Palabras Claves: *Stenodontes spinibarbis*, Celulasas, endoglucanasas, exoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas.

### ABSTRACT

The present work of investigation tube like objective to determine the activity celulolytic in larvae of *Stenodontes spinibarbis*, known insect as "joti" and starting from the results to explore their biotechnical potential as cellulases source. One worked with a total of 60 larvae, which were gathered of trees infested as lúcuma, palto, molle and sauce of two places, the District of Luricocha, County of Huanta and the Ecological Center Recreacional and Experimental "The Totorilla" belonging to the UNSCH. The samples of larvae were transported to the Laboratory of Microbial Biotechnology of the Ability of Biological Sciences, where he/she was carried out the corresponding study.

Firstly was carried out the morphological description of the larva, so much external as internal. Next you proceeded to obtain the extract enzymatic mesenteron total, for that which mixed a volume of the one crushed with nine volumes of water desionizada that then was left in agitation at 5°C for 3 h. it was centrifuged to 4000 rpm and the sobrenadante it was used to carry out the following determinations: activity endoglucanase, activity exoglucanase, activity  $\beta$ -glucosidase, activity amilolitic and soluble total protein. The enzymatic activities were evaluated to different pH (7.0, 9.0 and 11.0) and to different temperatures (20, 37 and 50°C), by means of the determination of sugars reducers (Method of the DNS).

The extract enzymatic total of mesenteron of larvae of *Stenodontes spinibarbis*, showed to have activity enzymatic endoglucanases point and exoglucanases; however, the exoglucanases activity was markedly much bigger, what explains the character xylophagous of the larvae and consequently its high capacity to degrade the crystalline regions of the cellulose of the wood mainly, as well as its great ability to build profuse galleries larvaries whose consequences are translated in the death of the plant hospedera. Additionally, the exoglucanases activity, was superior in all the treatments in front of the witness (cellulase of *Trichoderma reesei*), especially in the treatment to alkaline pH, what allows to deduce in preliminary way that is exoglucanases that could have application in the formulation of biological detergents for the industry of the laundry. Of another side, the fact of having bigger exoglucanases activity to the temperature of 50°C, allows to reveal the character termoestable of these enzymes, that which is desirable if it is to look for its industrial application.

All these results, to continue studying this system celulolytic eucariota with an eye toward establishing their biotechnical potential.

Key words: *Stenodontes spinibarbis*, Cellulases, endoglucanases, exoglucanases,  $\beta$ -glucosidasas

### INTRODUCCION

El descubrimiento de que algunos organismos incapaces de desarrollarse sobre la celulosa pura (como el algodón) podrían crecer sobre una forma modificada de celulosa hidrosoluble como la carboximetilcelulosa (CMC) ha conducido al concepto actual que

admite la existencia de dos grupos de enzimas distintas que intervienen en la transformación de la celulosa en celobiosa, esta última después es transformada en glucosa por un tercer grupo de enzima (2, 5). El ataque de la celulosa se hace entre los microorganismos como entre los insectos, gracias a un complejo de tres hidrolasas (1).

### Correspondencia:

Lizbett Ramirez V. (LMRV80@hotmail.com)

Fac. Cs. Biológicas. UNSCH. Ciudad Universitaria. Av. Independencia s/n.

Tel.: (066) 81-2510 anexo 145

biounsch\_decano@latinmail.com

Las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas (EC.3.2.1.4), las cuales se unen en las regiones amorfas de la celulosa y rompen los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos incrementando la disponibilidad de los extremos no reductores y generando oligosacáridos más pequeños con cadenas terminales libres; las  $\beta$ -1,4-exoglucanasas (EC.3.2.1.91), liberan unidades de celobiosa a partir de los extremos no reductores de la celulosa; las  $\beta$ -glucosidasas (EC.3.2.1.21), que hidrolizan las unidades de celobiosa en monómeros de glucosa (2, 3).

Estos tres grupos de enzimas actúan en forma cooperativa en la degradación de la celulosa (2).

A pesar de los avances logrados en el conocimiento de la hidrólisis enzimática de la celulosa, los procesos desarrollados hasta la fecha para aprovechar este polisacárido natural, aún no tienen la rentabilidad necesaria para explotarlo comercialmente. Sin embargo, se han realizado investigaciones sobre las enzimas (celulasas), que utilizan los microorganismos (hongos, bacterias y protozoarios), que viven en simbiosis con los animales rumiantes, existen también insectos que se alimentan de celulosa, tales como las termitas. Dentro de este último grupo, se encuentra el coleóptero de la familia Cerambycidae, la larva *Stenodontes spinibarbis* ("joti"), que tiene predilección por los árboles viejos, teniendo un estadio larvario que se desarrolla en el interior de la corteza de plantas leñosas como "molle", "palto", "lúcuma", "sauce" y otras, en donde forma un complejo sistema de cavernas a una velocidad relativamente rápida. Sin embargo, este insecto, que incluso forma parte de los hábitos entomofágicos de muchas comunidades andinas y selváticas, no ha sido estudiado convenientemente, por lo menos desde el punto de vista de su importancia como fuente de celulasas de interés biotecnológico.

La investigación básica y aplicada sobre celulasas microbianas no solamente ha generado un conocimiento científico significativo sino que también ha revelado su enorme potencial en biotecnología. Hasta ahora las celulasas son usadas en la industria de alimentos como cervecera y vinos, forraje animal, textil, lavandería, pulpa y papel, así como en agricultura y propuestas de investigación (2).

Por consiguiente, resulta interesante e importante el estudio de la capacidad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* ("joti"), un modelo animal que se encuentra disponible localmente.

Con base en estos fundamentos, se realizó el presente trabajo de investigación, teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

- Determinar la actividad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* ("joti").
- Determinar los valores óptimos de pH y temperatura para la actividad endoglucanasa y exoglucanasa.

## MATERIALES Y METODOS

### Población y Muestra:

Se consideró como población a las larvas existentes en los árboles de "lúcuma" *Pouteria obovata*, "molle" *Schinus molle*, "palto" *Persea americana* y "sauce" *Salix chilensis*, infestadas, tanto en el distrito de Luricocha-Huanta como del Centro Ecológico Recreacional y Experimental "La Totorilla" CERE-"LT". Se trabajó en la recolección de 60 larvas de *Stenodontes spinibarbis* "joti", extraídas en 20 visitas a dichos lugares.

### Recolección de Larvas

Para obtener las larvas del tronco del sauce, se hizo uso de una hacha a fin de cortar el árbol donde existían

evidencias de la presencia de las mismas, las cuales se recolectaron en un recipiente adecuado, para luego ser trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Microbiana, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y finalmente ser diseccionadas y estudiadas.

### Disección y Descripción Morfológica

Con la finalidad de identificar los órganos de interés de la larva, se realizó primeramente la descripción morfológica con la ayuda de un Estereoscopio de Cámara Lucida marca Carl-Zeiss, en la que se observó la parte externa (aparato bucal, cuerpo) y se procedió a dibujar. En segundo lugar se realizó la observación de la anatomía interna, para ello fue necesario hacer la disección de la larva, observándose glándulas salivales e intestino y finalmente se procedió a dibujar.

### Obtención del Extracto Enzimático Total

Previamente se procedió a desinfectar la larva con alcohol al 96%, luego de la disección se realizó la obtención del extracto enzimático total, poniendo en un recipiente con agua desionizada los trozos de intestino (1 volumen de intestino fue mezclado con 10 volúmenes de agua desionizada), seguido de agitación a 5°C por 3 h. Pasado este tiempo, el extracto fue centrifugado a 4000 rpm por 10 min, utilizándose el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática.

### Determinación de la Actividad Celulolítica

#### Determinación de la Actividad Endoglucanasa

1. A un set de tubos de ensayo (7), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| COD. | BUFFER 1M (ml) | SUSTRATO (ml de CMC) | MUESTRA (ml) | VOLUMEN FINAL (ml) |
|------|----------------|----------------------|--------------|--------------------|
| T    | 0.1            | 3.5                  | 0.4          | 4.0                |
| M1   | 0.1            | 3.5                  | 0.4          | 4.0                |
| M2   | 0.1            | 3.5                  | 0.4          | 4.0                |
| M3   | 0.1            | 3.5                  | 0.4          | 4.0                |
| BR   | 4.0            | —                    | —            | 4.0                |
| BS   | 2.0            | 2.0                  | —            | 4.0                |
| BE   | 3.6            | —                    | 0.4          | 4.0                |

Donde:

- T : Es el testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*)
- M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.
- BR : Es el blanco reactivo.
- BS : Es el blanco sustrato.
- BE : Es el blanco enzima.
- Buffer 0.6M : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0
- Sustrato : Carboximetilcelulosa (CMC) al 1%
- Muestra : Extracto enzimático total

2. Luego todos los tubos fueron incubados en baño María a diferentes temperaturas: 20°, 37°, 50°C por 30 minutos.

3. Seguidamente se realizó la determinación de azúcares reductores por el Método del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

**Determinación de la Actividad Exoglucanasa**

1. A un set de tubos de ensayo (7), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| COD. | BUFFER<br>0.6 M (ml) | SUSTRATO<br>(g de papel filtro) | MUESTRA<br>(ml) | VOLUMEN<br>FINAL (ml) |
|------|----------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------------|
| T    | 0.8                  | 0.05                            | 3.2             | 4.0                   |
| M1   | 0.8                  | 0.05                            | 3.2             | 4.0                   |
| M2   | 0.8                  | 0.05                            | 3.2             | 4.0                   |
| M3   | 0.8                  | 0.05                            | 3.2             | 4.0                   |
| BR   | 4.0                  | ---                             | ---             | 4.0                   |
| BS   | 4.0                  | 0.05                            | ---             | 4.0                   |
| BE   | 0.8                  | ---                             | 3.2             | 4.0                   |

Donde:

- T : Es el testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*)
- M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.
- BR : Es el blanco reactivo.
- BS : Es el blanco sustrato.
- BE : Es el blanco enzima.
- Buffer 0.6M : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0
- Sustrato : Papel filtro Whatman N° 1
- Muestra : Extracto enzimático total

2. Este sistema se incubó en las mismas condiciones que en el caso anterior.

3. Luego se midió la liberación de azúcares reductores.

**Determinación de la Actividad β-Glucosidasa**

1. Se utilizó 1 ml de muestra y 1 ml de salicina 10mM en buffer 1M.  
A un set de tubos de ensayo (6), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| COD. | BUFFER 1M<br>SUSTRATO<br>(Salicina) ml | BUFFER<br>(ml) | MUESTRA<br>(ml) | VOLUMEN<br>FINAL<br>(ml) |
|------|--|----------------|-----------------|--------------------------|
| M1   | 1.0                                    | ---            | 1.0             | 2.0                      |
| M2   | 1.0                                    | ---            | 1.0             | 2.0                      |
| M3   | 1.0                                    | ---            | 1.0             | 2.0                      |
| BR   | ---                                    | 2.0            | ---             | 2.0                      |
| BS   | 2.0                                    | ---            | ---             | 2.0                      |
| BE   | ---                                    | 1.0            | 1.0             | 2.0                      |

Donde:

- M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.
- BR : Es el blanco reactivo.
- BS : Es el blanco sustrato.
- BE : Es el blanco enzima.
- Buffer 1M : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0
- Sustrato : Salicina
- Muestra : Extracto enzimático total.

2. Este sistema se incubó en las mismas condiciones que en los casos anteriores.

3. Luego se midió la liberación de azúcares reductores.

**Determinación de Azúcares Reductores (Método del Acido 3,5 Dinitrosalicílico)**

La curva estándar se elaboró con glucosa a valores de 2 y 20mM.

1. Esta técnica consistió en tomar 0.5 ml de muestra.
2. Luego se le añadió 3 ml de la solución de DNS, se calentó en baño María hirviendo durante 5 minutos.
3. Se adicionó inmediatamente 1 ml de Sal Rochelle, se dejó enfriar y luego se enrazó cada tubo a 15 ml de agua destilada.
4. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 550 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D, Milton Roy.

**Determinación de la Actividad Amilolítica**

1. Colocar en un tubo de ensayo 100 ul de muestra con 900 ul de una solución de almidón al 1.11% en buffer al 50 mM, conteniendo 2 mM de bicloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>).

A un set de tubos de ensayo (7), previamente rotulados con los códigos mencionados en la tabla, las cuales fueron evaluadas a diferentes pHs y T°; se les añadió las siguientes soluciones:

| COD. | BUFFER 50mM<br>SUSTRATO<br>(Almidón)ul | BUFFER<br>(ul) | MUESTRA<br>(ul) | VOLUMEN<br>FINAL<br>(ml) |
|------|--|----------------|-----------------|--------------------------|
| T    | 100                                    | ---            | 900             | 1.0                      |
| M1   | 100                                    | ---            | 900             | 1.0                      |
| M2   | 100                                    | ---            | 900             | 1.0                      |
| M3   | 100                                    | ---            | 900             | 1.0                      |
| BR   | ---                                    | 100            | ---             | 1.0                      |
| BS   | 100                                    | ---            | ---             | 1.0                      |
| BE   | ---                                    | 100            | 900             | 1.0                      |

Donde:

- T : Es el testigo (α- amilasa de *Bacillus subtilis*)
- M1, M2, M3 : Es la muestra por triplicado.
- BR : Es el blanco reactivo.
- BS : Es el blanco sustrato.
- BE : Es el blanco enzima.
- Buffer 50mM : Fosfato pH 7.0, Tris-Cl pH 9.0, Carbonato pH 11.0
- Sustrato : Almidón al 1.11 %
- Muestra : Extracto enzimático total.

2. Este sistema se incubó en las mismas condiciones que en los casos anteriores.

3. Luego se midió la liberación de azúcares reductores.

**Determinación de proteína total soluble (Método Cuantitativo de Bluret)**

La curva patrón se elaboró preparando una solución estándar de proteínas de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/ml. de ovoalbúmina, las cuales fueron tratadas de la misma forma que la muestra problema y luego se procedió a hacer la lectura de absorbancia usando como blanco agua destilada. Se ajustó los datos mediante regresión lineal.

1. En un tubo de ensayo se colocó 1 ml del extracto enzimático crudo, al cual se le añadió 2 ml de NaOH 3 N, se expuso a baño María hirviendo por 5 min.

- Se dejó enfriar al medio ambiente y se añadió 2 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 2.5%.
- Luego se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos.
- Las lecturas de absorbancia se realizaron a 554 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 D, Milton Roy.
- Paralelamente se preparó el blanco utilizando agua destilada en lugar del extracto enzimático total. Los resultados se expresaron en mg de proteínas/ml.

**RESULTADOS**

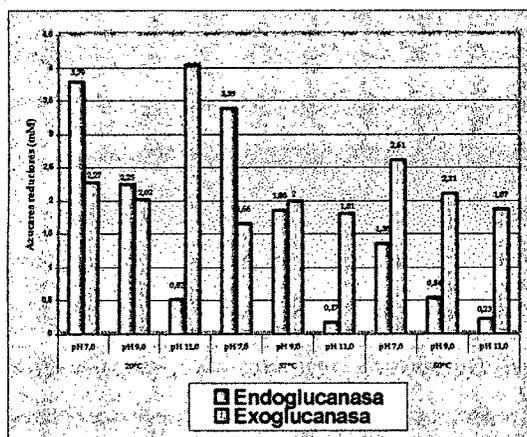
**TABLA Nº 1:** Determinación de la actividad endoglucanasa del extracto enzimático total de mesenterón de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti"

| T°   | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|------|------------------------|---|--------|---------|
|      |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 3.79                                    | 2.25   | 0.52    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 4.89                                    | 1.15   | 0.00    |
| 37°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 3.39                                    | 1.86   | 0.17    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 5.23                                    | 0.85   | 0.04    |
| 50°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 1.36                                    | 0.54   | 0.23    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 4.44                                    | 0.26   | 0.08    |

**TABLA Nº 2:** Determinación de la actividad exoglucanasa del extracto enzimático total de mesenterón de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti"

| T°   | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|------|------------------------|---|--------|---------|
|      |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.27                                    | 2.02   | 4.04    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 0.25                                    | 0.20   | 0.20    |
| 37°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 1.66                                    | 2.00   | 1.81    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 0.35                                    | 0.15   | 0.30    |
| 50°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.61                                    | 2.11   | 1.87    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 0.14                                    | 0.08   | 0.07    |

**GRAFICO Nº 1:** Comparación de la actividad endoglucanasa y exoglucanasa del extracto enzimático total de mesenterón de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti"



**TABLA Nº 3:** Determinación de la actividad β-glucosidasa del extracto enzimático total de mesenterón de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti"

| T°   | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|------|------------------------|---|--------|---------|
|      |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 0.45                                    | 0.42   | 0.66    |
| 37°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.34                                    | 1.94   | 1.84    |
| 50°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 2.22                                    | 2.82   | 2.25    |

- (a) : Extracto enzimático total de mesenterón de la larva "joti" (promedio de tres determinaciones)
- (b) : Celulasa de *Trichoderma reesei*
- (c) : Valores promedios en base a determinaciones por triplicado

**TABLA Nº 4:** Determinación de la actividad amilolítica del extracto enzimático total de mesenterón de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti"

| T°   | PROCEDENCIA            | AZUCARES REDUCTORES (mM) <sup>(c)</sup> |        |         |
|------|------------------------|---|--------|---------|
|      |                        | pH 7.0                                  | pH 9.0 | pH 11.0 |
| 20°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 8.19                                    | 7.04   | 6.18    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 5.49                                    | 4.34   | 3.55    |
| 37°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 9.72                                    | 5.52   | 6.19    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 5.76                                    | 5.28   | 4.13    |
| 50°C | Muestra <sup>(a)</sup> | 7.54                                    | 6.86   | 6.96    |
|      | Testigo <sup>(b)</sup> | 9.58                                    | 9.65   | 7.03    |

- (a) : Extracto enzimático total de mesenterón de la larva "joti" (promedio de tres determinaciones).
- (b) : α-Amilasa de *Bacillus subtilis*
- (c) : Valores promedio en base a determinaciones por triplicado.

**DISCUSIONES**

En la TABLA Nº 1, se observa que el extracto enzimático total del mesenterón de la larva de *Stenodontes spinibarbis* tiene mayor actividad de endoglucanasas a un valor de pH 7.0, tanto a 20, 37 y 50°C en comparación con la actividad de endoglucanasas a valores de pH 9.0 y 11.0. Dentro de este valor de pH 7.0 se encontró que la máxima actividad de endoglucanasas fue a 20°C con un valor de 3.79 mM, seguido de 37°C con un valor de 3.39 mM y por último a 50°C con un valor de 1.36 mM. En ninguno de los tratamientos la actividad de endoglucanasas del extracto enzimático total fue mayor que la del testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*, 5 mg/ml).

Al respecto, cabe manifestar que son pocas las especies de insectos xilófagos que se alimentan de celulosa como única fuente de carbono y energía, siendo las larvas de cerambricidos, entre otras, las que se encuentran reportadas por su capacidad de degradar la celulosa. Esta capacidad, sin embargo, puede tener hasta tres orígenes: (a) uno de naturaleza endógena, es decir que las células del epitelio columnar del intestino de la larva son las responsables de la secreción de las celulasas

necesarias; (b) otro de naturaleza endosimbionte, que consiste en una rica fauna bacteriana o protozoaria adquirida e instalada en el intestino, la misma que produce las celulasas implicadas en la degradación de la celulosa; y (c) otro de naturaleza ectosimbionte, que consiste en la presencia de hongos celulolíticos que invaden las galerías larvarias de modo tal que la larva utiliza como fuente de carbono y energía los productos de la hidrólisis de la celulosa (1, 4, 6).

Volviendo al punto de los valores óptimos de pH y temperatura, para la actividad de endoglucanasas que fue a pH 7.0 y 20°C, esto concuerda con lo señalado en la bibliografía en el sentido de que el mantenimiento de la actividad enzimática es posible gracias a que el pH del tubo digestivo de los insectos xilófagos es próximo a la neutralidad (entre 6.8 y 7.2 en general) (1), siendo muy distinto con el caso de las larvas de insectos fitófagos como por ejemplo lepidópteros cuyo intestino tiene un pH fuertemente alcalino, entre 9.0 y 10.0 en general.

En la TABLA Nº 2, se reportan los resultados de la actividad de exoglucanasas del extracto enzimático total de mesenterón de *Stenodontes spinibarbis* "joti". Al respecto, se encontró mayor actividad de exoglucanasas a un pH de 11.0 y a una temperatura de 20°C, con un valor de 4.04 mM; seguido de 2.61 mM a pH 7.0 y 50°C y por último 2.27 mM a pH 7.0 y 20°C. En todos los tratamientos la actividad de exoglucanasas superó a la del testigo (celulasa de *Trichoderma reesei*, 5 mg/ml). Esto significa que la larva de *Stenodontes spinibarbis* tiene principalmente actividad exoglucanasa.

En cuanto al pH y la temperatura, lo lógico sería esperar que la actividad de exoglucanasas sea óptima a pH 7.0 y 20°C, por cuanto estas son las condiciones que tiene la larva de *Stenodontes spinibarbis*. Sin embargo, los resultados nos indican que probablemente en el extracto enzimático total de mesenterón están presentes varios tipos de exoglucanasas, unas que trabajan bien al valor del pH intestinal (7.0) y otras que trabajan también a pH alcalino, demostrando en todos los casos tener termoestabilidad, pues a 50°C se obtuvo buena actividad de exoglucanasas tanto a pH 7.0, 9.0 y 11.0.

La comparación entre ambas actividades, tanto de endoglucanasas y de exoglucanasas, se representa en la GRAFICO Nº 1. Como se observa, la actividad de exoglucanasas fue marcadamente superior para la gran mayoría de tratamientos a diferentes pHs y temperaturas, excepto para pH 7.0 y pH 9.0 (a 20°C) y pH 7.0 (a 37°C). El hecho de encontrar sobre todo actividad exoglucanasa en el extracto enzimático total de mesenterón de *Stenodontes spinibarbis*, es muy importante por cuanto las enzimas exoglucanasas son las que atacan precisamente el componente mayoritario y más recalcitrante de la celulosa de la madera, es decir, las regiones cristalinas, produciendo oligosacáridos o celobiosa y al mismo tiempo creando nuevos sitios de ataque para las endoglucanasas, lo que se traduce naturalmente en una mayor eficiencia en la degradación enzimática de la celulosa. Esta capacidad manifiesta, junto con la existencia de un poderoso aparato masticador, permiten explicar claramente la relativa velocidad y facilidad con la que las larvas construyen sus galerías alimentándose paralelamente de celulosa.

Un estudio de perfiles electroforéticos del extracto enzimático total de mesenterón, que bajo el método empleado contenía 0.66 mg/ml de proteína total soluble, sería posible si se pudiera disponer de un equipo de

cromatografía líquida estándar y un equipo de electroforesis vertical para proteínas, permitiendo corroborar el número de enzimas y sus pesos moleculares aproximados tanto de las endoglucanasas como de las exoglucanasas presentes en el extracto enzimático.

Adicionalmente, el hecho de obtener la actividad exoglucanasa más alta a un pH de 11.0, podría significar la presencia de una exoglucanasa de interés para la industria de los detergentes y por tanto de la lavandería, toda vez que podría resultar interesante para la formulación de detergentes biológicos que se usan ampliamente en la actualidad, los cuales tienen la propiedad de eliminar las "peluzas" de los jeans u otras telas a base de algodón (fibras de celulosa), a condiciones de pH alcalino, entre 8.5 – 9.0, permitiendo mantener el aspecto "nuevo" de las prendas de vestir.

La TABLA Nº 3, contiene los valores de actividad de  $\beta$ -glucosidasas. Este grupo de enzimas permite una acción complementaria consistente en la transformación, poco a poco conforme va apareciendo, de la celobiosa en glucosa. En este caso los resultados se encuentran tanto dispersos en cuanto al pH siendo los valores de actividad de 2.82 a pH 9.0; 2.34 a pH 7.0; y 2.25 a pH 11.0, al parecer también podría tratarse de varios tipos de  $\beta$ -glucosidasas las cuales tendrían mayor actividad a temperaturas de 37 y 50°C, es decir, que al igual que las exoglucanasas serían también termoresistentes.

En la TABLA Nº 4, se tienen los resultados de la determinación de actividad amilolítica del extracto enzimático total de mesenterón. Aparentemente no tendría sentido la determinación de esta actividad por cuanto se sabe que la madera se compone principalmente de celulosa, hemicelulosas y lignina; sin embargo, el almidón también forma parte de la composición química de la madera, siendo variable la proporción en la que se encuentra. Prácticamente es inexistente en la madera de corazón, se encuentra entre el 1-5% en la albura, 3-37% en el cambium y 4-23% en el floema (1). Esto supone que la larva de *Stenodontes spinibarbis* en algún momento de su ciclo biológico hace uso del almidón como fuente de carbono y energía. Los resultados nos indican que hay una considerable actividad amilolítica a los valores de pH y temperatura ensayados. En todos los casos y bajo las condiciones establecidas, los valores de actividad amilolítica fueron superiores al testigo ( $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*, 2 mg/ml); excepto a valores de pH 7.0, 9.0 y 11.0 a 50°C donde la actividad amilolítica del testigo fue superior.

Finalmente, los resultados presentados concuerdan con la bibliografía referente a la capacidad enzimática de las diferentes especies de coleópteros xilófagos por cuanto para cerambícidos tales como *Cerambyx cerdo* y *Ergates faber* se ha reportado tanto actividad de celulasas, amilasas y proteasas (1).

## REFERENCIAS

1. Dajoz, R. (2001). Entomología Forestal: Los Insectos y el Bosque. Edit. Mundi – Prensa. México.
2. Mejía, T; Mujica, F; Gonzáles, A; Ortega, J. (2002). Proteínas con Afinidad a Celulosa: Una Herramienta en Biotecnología. Vol 21. pp. 267 – 271.
3. Moat, A; Foster, J. (1995). Microbial physiology. 3<sup>th</sup>. Edit. Wiley – Liss. New York, pp. 352 – 355.
4. Richards, O; Davies, R. (1983). Tratados de

- entomología Imms. Edit. Omega, S.A. Barcelona. Vol I.
5. **Vilches, L.** (2002). Determinación de la Actividad de Exoglucanasas de Cepas Fúngicas Nativas de las Provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis para optar el Título de Biólogo. UNMSM. Lima.
  6. **Wigglesworth, V.** (1978). Fisiología de los insectos. Edit. Acribia. Zaragoza (España).

## ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

BACHILLER: Lizbett Maribel Ramírez Vargas  
R.D. N° 318-04-FCB-D

En la Ciudad de Ayacucho, a los Veintiocho días del mes de diciembre del año dos mil cuatro, siendo las cuatro y cinco minutos de la tarde, se reunieron los miembros del Jurado en el Auditorio de la Facultad de Ciencias de la Educación de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, presidida por el MSc. Elmer Avalos Pérez encargado con Memorando N° 89904-UNSCHE-FCB y actuando como Secretaria Docente encargada a la Mg. Paula García Godos Alcázar y a los miembros del Jurado Calificador a los srges docentes: Blgo Tomás Yuret Miranda Tomasevish, Mg. José Alejandro Yarlequé Mujica, Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, con la finalidad de recepcionar en Acto Público la sustentación de la Tesis titulada: Determinación de la actividad celulolítica de la larva *Stenodontes spinibarbis* "joti". Presentada por la Bachiller Lizbett Maribel Ramírez Vargas, con el cual pretende obtener el Título de Bióloga con especialidad en Microbiología.

Acto seguido el Presidente del Jurado solicitó a la Secretaria Docente (e) dar lectura a la R.D. N° 318-04-FCB-D, luego el Sr. Presidente invita a la señorita sustentante exponer su trabajo de investigación en el tiempo de cuarenta y cinco minutos contemplados en el Reglamento.

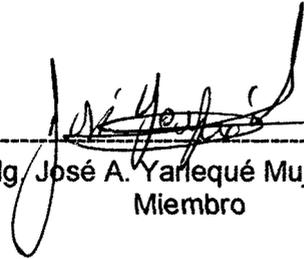
Concluida la exposición el Presidente invitó a los miembros del Jurado Calificador a realizar las observaciones, aclaraciones y preguntas pertinentes. Finalizado el acto de sustentación, el Presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar el Auditorium por unos minutos, con la finalidad de que el Jurado Calificador realice las deliberaciones correspondientes y califiquen en privado, cuyos resultados son los siguientes:

| MIEMBRO JURADO                   | EXPOSICION | RPTA. PREGUNTAS | PROMEDIO |
|----------------------------------|------------|-----------------|----------|
| Mg. José A. Yarlequé Mujica      | 17         | 16              | 17       |
| Bigo Tomás Y. Miranda Tomasevish | 17         | 17              | 17       |
| Mg. Fidel R. Mujica Lengua       | 16         | 15              | 16       |
| Mg. Paula García Godos Alcázar   | 18         | 18              | 18       |

Como resultado la sustentante, ha obtenido la nota promedio aprobatoria de DIECISIETE (17), de lo cual dan fe los Miembros del Jurado Calificador, estampando sus firmas al pie del presente Acta, finalizando la sustentación a las 6:30 pm.



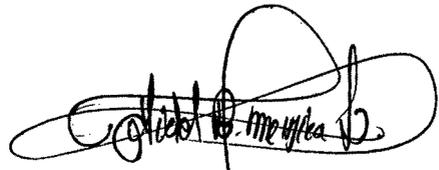
MSc. Elmer Avalos Pérez  
Presidente



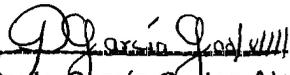
Mg. José A. Yañequé Mujica  
Miembro



Blgo. Tomás Y. Miranda Tomasevich  
Miembro



Mg. Fidel R. Mujica Lengua  
Miembro-Asesor



Mg. Paula García Gedos Alcázar  
Miembro