

SZYBKI TEST IDENTYFIKACJI GATUNKOWEJ MĄCZNIKA MŁYNARKA NA PODSTAWIE mtDNA*

Małgorzata Natonek-Wiśniewska¹, Piotr Krzyścin¹, Mariusz Pietras²,
Monika Bugno-Poniewierska³

¹Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt,
32-083 Balice k. Krakowa

²Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Żywnienia Zwierząt i Paszoznawstwa,
32-083 Balice k. Krakowa

³Uniwersytet Rolniczy, Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt, al. Mickiewicza 24/28,
30-059 Kraków
e-mail: małgorzata.natonek@iz.edu.pl

Zainteresowanie owadami jako alternatywnym źródłem pożywienia tak dla ludzi, jak i zwierząt cieszy się rosnącym zainteresowaniem ze względu na dużą zawartość dobrze przyswajalnego białka, witamin, mineralów i tłuszczu. Również przepisy prawne coraz częściej akceptują komercyjne stosowanie insektów (np. EU 2017/893). Mając na uwadze bezpieczeństwo żywności oraz rosnącą świadomość społeczną w zakresie informacji o składnikach, procesie produkcji i pochodzeniu żywności, dostępność owadów jako pokarmu wymaga opracowania testów do niezawodnej identyfikacji ich DNA. Jednym z gatunków najczęściej stosowanym jako składnik pokarmu jest mącznik młynarek. Metoda prezentowana w pracy umożliwia określenie potencjalnej obecności materiału biologicznego pochodzącego od tego gatunku. Metoda oparta jest na analizie fragmentu mtDNA – podjednostki I oksydazy cytochromu C w reakcji PCR w czasie rzeczywistym i ma postać prostego testu umożliwiającego oznaczenie DNA mącznika. Metoda jest skuteczna dla bardzo szerokiego zakresu jego zawartości w produkcie – między 0,1 a 100%. Parametry krzywej standardowej wskazują na specyficzność gatunkową oraz liniowość w całym zakresie działania metody, co jest bardzo ważne ze względu na możliwość wykorzystania testu również ilościowo. Test jest skuteczny do analizy mącznika w postaci surowej oraz przetworzonych produktów z jego udziałem, niezależnie od stadium rozwoju owada (larwa, postać dorosła) i może być stosowany do monitorowania karm z udziałem owadów. Zastosowanie testu do komercyjnych produktów pozwoliło zaobserwować, że mączniki zostały wykryte we wszystkich produktach, w których producent deklarował ich obecność. W próbkach pozytywnych szybkość zachodzenia reakcji była uzależniona od zawartości mączników młynarków: im zawartość była większa, tym produkt reakcji pojawiał się wcześniej.

Słowa kluczowe: oznaczanie gatunkowe mącznika młynarka, COI, identyfikacja DNA owadów

Wykorzystywanie owadów jako źródła pożywienia jest równie wiekowe jak ludzkość, chociaż od kilkunastu wieków nieco zapomniane i zarezerwowane jedynie dla krajów rozwijających się. Dopiero w ostatnich latach zainteresowanie owadami jako składnikiem diety nabiera ponownie coraz większego znaczenia, zarówno w żywieniu zwierząt, jak i ludzi. Zgodnie z raportem Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Żywności i Rolnictwa (FAO) owady są obiecującym źródłem pożywienia z przyczyn biologicznych, środowiskowych i ekonomicznych (Tomotake i in., 2010; Van Huis i in., 2013). Z powodu dużej zawartości dobrze przyswajalnego białka, witamin, minerałów i tłuszczu (Makkar i in., 2014; Józefiak i in., 2016), a jednocześnie niskiej emisji amoniaku i kosztów hodowli, w wielu krajach prowadzi się badania nad możliwościami wykorzystaniem ich jako źródła pożywienia. Owoce tych prac jest dopuszczenie owadów do wykorzystania w przemyśle spożywczym oraz w żywieniu zwierząt. Przykładowo belgijska Federalna Agencja Bezpieczeństwa Łańcucha Żywnościowego (AFSCA) ogłosiła listę jadalnych owadów zawierającą 10 gatunków, natomiast Ministerstwo Bezpieczeństwa Żywności i Leków (MFDS) w Korei Południowej zaakceptowało siedem jadalnych owadów jako dopuszczalne składniki w żywności (Ghosh i in., 2017). Podobnie Komisja Europejska zatwierdziła w 2017 roku stosowanie owadów do karmienia ryb hodowlanych (UE, 2017). Ponadto KE w tym samym dokumencie potwierdziła, że owady gospodarskie mogłyby stanowić trwałą alternatywę dla konwencjonalnych źródeł białka zwierzęcego przeznaczonego na paszę dla zwierząt gospodarskich innych niż przeżuwacze. Rozpatrywany jest udział kilku gatunków robaków, między innymi mącznika młynarka. Jego zróżnicowanie od innych gatunków owadów może przysparzać problemów ze względu na podobny wygląd morfologiczny (np. larwa mącznika jest podobna do larwy drewnojada) lub zmianę wyglądu zewnętrznego na skutek przetworzenia termicznego.

Od dwóch dekad głównym sposobem uwierzytelniania składu gatunkowego produktów spożywczych jest analiza molekularna, ponieważ DNA jest identyczne we wszystkich komórkach somatycznych danego organizmu oraz niezmiennie niezależnie od źródła pochodzenia (krew, mięśnie itp.). Ponadto w badaniach stosuje się fragmenty DNA odporne na degradację, dlatego analizy są skuteczne również dla wysoko przetworzonych produktów spożywczych, a także śladowych zanieczyszczeń. Czułość metod jest bardzo duża, ponieważ ilość wymaganego materiału może wynosić zaledwie kilka komórek (Sun i in., 2014). Do najczęściej stosowanych technik w badaniu żywności należą: PCR (konwencjonalny i w czasie rzeczywistym, polimorfizm konformacji pojedynczej nici (PCR-SSCP), losowo amplifikowany polimorficzny DNA (RAPD) (Sforza i in., 2011).

Przedstawiane w literaturze metody oznaczania mącznika młynarka opierają się na analizie podjednostki I oksydazy cytochromu C(COI) w reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Metoda powinna być czuła i specyficzna niezależnie od postaci biologicznej owada, jak również stopnia jego przetworzenia.

Celem prezentowanej pracy było:

- wyznaczenie uniwersalnego sposobu izolacji DNA odpowiedniego dla każdej postaci biologicznej mącznika młynarka oraz niezależnego od ich stopnia przetworzenia termiczno-barycznego;

- opracowanie testu oznaczania gatunkowego mącznika młynarka skutecznego dla próbek surowych i przetworzonych oraz w każdym stadium rozwoju biologicznego na podstawie wykrywania fragmentu oksydazy cytochromu I (mtDNA) specyficznego dla tego gatunku;
- walidacja testu, czyli określenie jego parametrów;
- sprawdzenie testu do analizy próbek komercyjnych dostępnych na polskim rynku.

Material i metody

Materiałem badawczym były:

- dorosłe osobniki (12 sztuk każdego gatunku) następujących owadów: świerszcz kubański, karaczan argentyński i madagaskarski, świerszcz bananowy, szarańcza wędrowna, mącznik młynarek, drewnojad;
- mucha domowa (2 sztuki), złotook (2 sztuki);
- larwy (ok. 100 sztuk każdego gatunku): mącznika młynarka i drewnojada;
- próbki karm dla gadów zawierające suszone larwy mącznika o różnej zawartości: suszone świerszcze, skorupiaki, muchówki;
- próbki roślinne: cytryna, banan, pomidor, ziarno pszenicy, owsa;
- próbki mięsa pochodzące od: bydła, świni, indyka, kury, ryby.

Owady zostały nabyte od hodowców owadów karmowych, których hodowla odbywała się pod nadzorem Inspektoratu Weterynarii, co zapewniało materiał zgodny z deklaracją. Ponadto gatunek materiału badawczego potwierdzano używając klucza do oznaczania owadów oraz przez porównanie ze zdjęciami (Gwinner i in., 1990, <http://www.medianauka.pl>). Próbki mięsa oraz karmy dla gadów zostały zakupione odpowiednio w sklepie spożywczym i zoologicznym. Z każdego gatunku owadów przygotowano po 3 próbki badawcze o masie 0,1 g.

Ekstrakcja DNA

Metoda izolacji była dostosowana do rodzaju materiału tkanki – do wyekstrahowania DNA owadów użyto zestawu Sherlock (A&A Biotechnology), natomiast DNA z mięsa i roślin otrzymano stosując AxFood (A&A Biotechnology). Izolacje owadów ulepszone poprzez zastosowanie dodatku DTT, wydłużonego czasu ogrzewania (4h) i intensywnego worteksowania. Zawartość otrzymanego DNA określono stosując Nanodrop 2000. Czystość izolatów DNA określono na podstawie stosunku absorbancji 260/280.

Reakcja qPCR

Otrzymane DNA poddano reakcji Real-Time PCR przy użyciu oprogramowania StepOne Plus Thermal Cycler Software v2.3 (Applied Biosystems), używając starterów (stężenie w mieszaninie reakcyjnej 0,34mM) flankujących region specyficzny gatunkowo dla mącznika młynarka, sondy Tamra kompatybilnej z ich DNA (stężenie w mieszaninie reakcyjnej 0,54mM) oraz TaqMan Master Mix (Thermo Fisher). Startery i sonda zostały zaczerpnięte z publikacji Debode i in. (2017).

TM-WING-Forward	5'- CAGGGTTGAACGGGTTTCAGT
TM-WING-Reverse	5'- ATACTATTTTCGGGCAACAGCATC
TM-WING-Sonda	5'- AAGCCGTACTTGTGTTACGGCGGTTTAC

Program termiczny miał następującą postać:

denaturacja wstępna	15 minut	95°C	1 cykl
denaturacja	15 sekund	95°C	50 cykli
przyłączenie/wydłużanie	1 minuta	60°C	

Wszystkie analizy wykonano w trzykrotnych powtórzeniach. Dla wszystkich próbek określono cykl, w którym linia progowa amplifikacji (threshold) przecina wykres zależności fluorescencji od cyklu reakcji. Wartość ta zwana cyklem granicznym (C_T) jest skorelowana z obecnością i pierwotną ilością materiału biologicznego o DNA kompatybilnym z wykorzystywanymi w teście starterami i sondą. Dla cyklu granicznego wyznaczono również odchylenie standardowe bezwzględne (SD) oraz względne (RSD%) w celu sprawdzenia powtarzalności otrzymanego wyniku z niezależnych izolacji DNA.

Specyficzność molekularna metody

Specyfikę molekularną metody określono poprzez analizę *in silico* starterów przy zastosowaniu narzędzia Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Następnie specyficzność starterów sprawdzono doświadczalnie stosując DNA wyekstrahowane z owadów (w postaci dorosłej i larw), roślin oraz mięsa. Przeprowadzenie reakcji krzyżowych PCR z innymi gatunkami niż mącznik pozwala potwierdzić brak produktów PCR niespecyficznych gatunkowo. Obecność produktu PCR dla DNA mącznika i jednoczesny brak produktu dla DNA innych gatunków jest dowodem na specyficzność biologiczną stosowanego testu. Każdy izolat DNA analizowano przy stężeniu 25ng/ml. Jako kontrolę negatywną izolacji DNA (KN) oraz PCRu (NTC) zastosowano wodę.

Walidacja testu: liniowość oraz czułość: granica wykrywalności (LOD) oraz oznaczalności (LOQ)

W ramach walidacji testu wyznaczono takie parametry jak liniowość oraz czułość. Dla sprawdzenia czułości metody wyznaczono granicę wykrywalności oraz oznaczalności. W tym celu przeprowadzono analizę dla rozcieńczeń DNA mącznika w ilości 25, 10, 1, 0,1, 0,025 ng na reakcję qPCR.

Natomiast dla sprawdzenia liniowości testu skonstruowano krzywą standardową złożoną z analizowanych rozcieńczeń i wyznaczono jej współczynnik nachylenia oraz współczynnik korelacji (R^2) i wydajność PCR (%) wg wzoru : $E = [10 (-1 / \text{nachylenie}) - 1]$. Informacja o liniowości testu jest niezbędna do określenia potencjalnej możliwości zastosowania testu do oznaczeń ilościowych.

Zastosowanie metody do próbek komercyjnych

Dla pełniejszego zobrazowania metody analizowano próbki komercyjnych karm dla gadów mogące zawierać w swoim składzie mączniki oraz inne owady.

Wyniki

Ekstrakcja DNA

Stężenie i jakość DNA wahały się od 10,369 do 757,629 ng/μl przy absorbancji A_{260/280} między 1,27 a 1,88. Szczegółowe parametry izolacji DNA dla wszystkich badanych owadów przedstawia tabela 1.

Tabela. 1 Stężenie DNA owadów i jego jakość
Table 1. Insect DNA concentration and quality

Rodzaj próbki Type of sample	Skład próbki Sample composition	Stężenie (ng/ml) Concentration (ng/ml)	A _{260/280}
S	świerszcz kubański field cricket	590,77	1,87
S	drewnojad superworm	757,629	1,88
S	karaczan argentyński Dubia cockroach	559,754	1,88
S	karaczan madagaskarski Madagascar hissing cockroach	475,096	1,87
S	mącznik młynarek yellow mealworm	18,35	1,39
S	szarańcza wędrowną migratory locust	475,766	1,86
S	świerszcz bananowy banded cricket	700,614	1,90
S	larwy mącznika młynarka mealworm larvae	26,31	1,33
S	larwy drewnojada superworm larvae	19,834	1,36
P	suszone larwy mącznika młynarka dried mealworm larvae	687,304	1,86
P	larwy mącznika 20%, suszone świerszcze 10% mealworm larvae 20%, dried crickets 10%	217,946	1,78
P	mączniki 10% mealworm 10%	95,211	1,71
P	świerszcze 0,3%, mączniki 0,2% crickets 0.3%, mealworm 0.2%	94,788	1,71
P	larwy mącznika młynarka 4% mealworm larvae 4%	92,101	1,73
P	suszone larwy mącznika młynarka dried mealworm larvae	10,369	1,27
P	skorupiaki crustaceans	297,007	1,80
P	muchówki / skorupiaki dipterans/crustaceans	538,833	1,87

Ilość i jakość DNA owadów. S – próbka świeża, P – próbka przetworzona.
Insect DNA quantity and quality. S – fresh sample, P – processed sample.

Analiza jakościowa. Walidacja. Specyficzność i czułość metody, granica wykrywalności i oznaczalności

Analiza *in silico* wykazała, że proponowane startery są specyficzne gatunkowo tylko dla mączników. Specyficzność sprawdzona doświadczalnie wykazała reakcje pozytywne dla DNA mączników, a dla wszystkich pozostałych gatunków brak produktu reakcji (świerszcz kubański, karaczan argentyński, świerszcz bananowy, larwy drewnojada) lub produkt w bardzo późnych cyklach – po 44. cyklu (karaczan madagaskarski, szarańcza wędrowna). Wyniki przedstawiono jako średnią wartości C_t z trzech niezależnych izolacji próbek oraz odchylenie standardowe (SD) między nimi (tab. 2).

Tabela 2. Wynik specyficzności gatunkowej dla mącznika młynarka
Table 2. Results for species specificity of the yellow mealworm

Rodzaj próbki Type of sample	Skład próbki Sample composition	Średnie C_t Mean C_t	SD C_t	RSD %
1	2	3	4	5
S	świerszcz kubański field cricket	b.r		
S	drewnojad superworm	46,386	0,748	0,016
S	karaczan argentyński Dubia cockroach	b.r		
S	karaczan madagaskarski Madagascar hissing cockroach	44,855		0,026
S	mącznik młynarek yellow mealworm	30,940	1,533	0,040
S	szarańcza wędrowna migratory locust	45,315	0,323	0,008
S	świerszcz bananowy banded cricket	b.r		
S	larwy mącznika młynarka mealworm larvae	31,821	3,999	0,126
S	larwy drewnojada superworm larvae	b.r		
DNA	bydło/świnia cattle/pig	b.r		
DNA	cytryna/banan lemon/banana	b.r		
DNA	indyk/kura turkey/chicken	b.r		
DNA	mucha/złotook fly/lacewing	b.r		
DNA	pomidor tomato	b.r		
DNA	ryba fish	b.r		

cd. tab. 2 – Table 2 contd.

1	2	3	4	5
DNA	ziarno grain	b.r		
DNA	KN	b.r		

b.r – brak reakcji, C_T – cykl graniczny amplifikacji, SD C_T – odchylenie standardowe cyklu granicznego amplifikacji, RSD – względne odchylenie standardowe cyklu granicznego amplifikacji.

b.r – no reaction, C_T – amplification threshold, SD C_T – standard deviation of amplification threshold, RSD – relative standard deviation of amplification threshold.

Tabela 3. Analiza czułości testu oznaczania gatunkowego mącznika młynarka
Table 3. Analysis of the sensitivity test for species determination of the yellow mealworm

Badany gatunek/ilość użytego DNA Tested species/Amount of DNA used	C _T	Średnie C _T Mean C _T	SD C _T	RSD %
mącznik młynarek 25 ng mealworm 25 ng	31,38	31,46	3,55	11,27%
mącznik młynarek 25 ng mealworm 25 ng	27,96	31,46	3,55	
mącznik młynarek 25 ng mealworm 25 ng	35,05	31,46	3,55	
mącznik młynarek 10 ng mealworm 10 ng	32,89	32,64	3,32	10,16%
mącznik młynarek 10 ng mealworm 10 ng	29,21	32,64	3,32	
mącznik młynarek 10 ng mealworm 10 ng	35,83	32,64	3,32	
mącznik młynarek 1 ng mealworm 1 ng	38,76	35,95	3,16	8,80%
mącznik młynarek 1 ng mealworm 1 ng	36,56	35,95	3,16	
mącznik młynarek 1 ng mealworm 1 ng	32,52	35,95	3,16	
mącznik młynarek 0,1 ng mealworm 0.1 ng	b.r	38,81	4,92	12,46%
mącznik młynarek 0,1 ng mealworm 0.1 ng	36,00	38,81	4,92	
mącznik młynarek 0,1 ng mealworm 0.1 ng	42,96	38,81	4,92	
mącznik młynarek 0,025 ng mealworm 0.025 ng	39,63	39,48	1,16	2,98%
mącznik młynarek 0,025 ng mealworm 0.025 ng	37,99	39,48	1,16	
mącznik młynarek 0,025 ng mealworm 0.025 ng	b.r	39,48	1,16	

b.r – brak reakcji, C_T – cykl graniczny amplifikacji, SD C_T – odchylenie standardowe cyklu granicznego amplifikacji, RSD – względne odchylenie standardowe cyklu granicznego amplifikacji.

b.r – no reaction, C_T – amplification threshold, SD C_T – standard deviation of amplification threshold, RSD – relative standard deviation of amplification threshold.

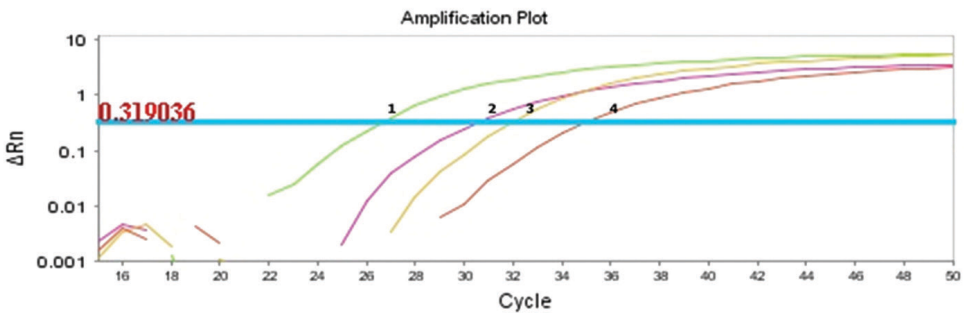
Analiza czułości wykazała reakcje pozytywne dla wszystkich rozcieńczeń DNA mącznika młynarka między 0,025–25 ng (tab. 3). Odchylenie standardowe wynosiło między 1,16–4,92%, co stanowiło względną niepewność pomiaru poniżej 12,46%.

Krzywa standardowa wygenerowana z otrzymanych wyników qPCR dla rozcieńczeń DNA mącznika miała wzór:

$$C_T = -3,374 \log c + 33,407$$

przy współczynniku korelacji $R^2=1$ i efektywności $E=97,888$,

co wskazywało, że zastosowany test jest liniowy w całym zakresie badania. Granicę oznaczalności (najmniejszą ilość produktu możliwą do oznaczenia ilościowego) ustalono na poziomie 0,025 ng, co odpowiada stężeniu 0,1%. Granice wykrywalności ustalono na tym samym poziomie, ponieważ nie wykonywano badań dla niższych stężeń. Graficzne przedstawienie wyniku dla przykładowych próbek przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Wykres amplifikacji dla wybranych próbek

Fig. 1. Amplification plot for selected samples

- 1 – suszone larwy mącznika (P)
- 2 – mącznik młynarek (S)
- 3 – larwy mącznika 4% (P)
- 4 – mącznik młynarek 1 ng (S)
- KN – brak produktu reakcji
- 1 – dried mealworm larvae (P)
- 2 – mealworm (S)
- 3 – mealworm larvae 4% (P)
- 4 – mealworm larvae 1 ng (S)
- KN – no reaction product

Zastosowanie metody do próbek komercyjnych

Dla próbek zawierających mączniki otrzymano pozytywne wyniki reakcji między 26. a 37. cyklem, natomiast dla próbek niezawierających mączników nie otrzymano produktu reakcji. W próbkach pozytywnych szybkość zachodzenia reakcji była uza-

leżniona od zawartości mączników młynarków: im zawartość była większa, tym produkt reakcji pojawiał się wcześniej. Szczegółowe wyniki dla oznaczania DNA mączników w próbkach komercyjnych wraz z interpretacją wyniku przedstawia tabela 4. Graficzne przedstawienie wyniku dla przykładowych próbek przedstawia rysunek 1.

Tabela 4. Szczegółowe wyniki dla oznaczania DNA mączników w próbkach komercyjnych
Table 4. Detailed results for determination of mealworm DNA in commercial samples

Rodzaj próbki Type of sample	Skład próbki Sample compositionn	Średnie C _T Mean C _T	SD C _T	RSD %	Wyniki Results
P	suszone larwy mącznika dried mealworm larvae	26,316	0,428	0,016	+
P	larwy mącznika 20%, suszone świerszcze 10% mealworm larvae 20%, dried crickets 10%	28,362	0,638	0,022	+
P	mączniki 10% mealworm 10%	32,116		0,031	+
P	świerszcze 0,3%, mączniki 0,2% crickets 0.3%, mealworm 0.2%	37,120	0,758	0,020	+
P	larwy mącznika 4% mealworm larvae 4%	32,922	0,038	0,001	+
P	suszone larwy mącznika dried mealworm larvae	25,778	1,299	0,050	+
P	skorupiaki crustaceans	b.r			-
P	muchówki/skorupiaki dipterans/crustaceans	b.r			-

b.r – brak reakcji, C_T – cykl graniczny amplifikacji, SD C_T – odchylenie standardowe cyklu granicznego amplifikacji, RSD – względne odchylenie standardowe cyklu granicznego amplifikacji.

b.r. – no reaction, C_T – amplification threshold, SD C_T – standard deviation of amplification threshold, RSD – relative standard deviation of amplification threshold.

Omówienie wyników

Zainteresowanie owadami jako alternatywnym źródłem pożywienia zarówno dla ludzi, jak i zwierząt cieszy się niesłabnącym powodzeniem. Komercyjna dostępność owadów jako pożywienia wymaga niezawodnej identyfikacji produktu, co jest kluczowe w dbałości o bezpieczeństwo żywności i budowanie zaufania konsumentów. Konieczne jest zatem opracowanie metod pozwalających na ustalenie przynależności gatunkowej owadów. Tym bardziej, że w procesie produkcji produktów spożywczych poszczególne składniki, w tym przypadku owady, mogą być poddane obróbce termicznej, mechanicznej czy barycznej, co bardzo często może utrudnić lub uniemożliwić oznaczenie na podstawie cech morfologicznych. W takim przypadku oznaczenie gatunkowe na podstawie DNA może być jedynym sposobem weryfikacji składu gatunkowego niezależnym od sposobu przetworzenia próbki.

W ostatnich latach identyfikacja gatunkowa owadów w paszach i produktach spożywczych wyłania się jako rozwijająca się dziedzina badań pozwalająca jak do-

tań na wykrycie owadów zaledwie kilkoma metodykami (Zagon i in., 2018; Marien i in., 2018; Debode i in., 2017). Większość z nich opiera się na analizie oksydazy cytochromu I na podstawie sekwencjonowania Sangera (Tembe i in., 2014; Siozios i in., 2020; Park i in., 2011). W takim przypadku duże zasługi mają Kim i in. (2019), którzy opracowali metody weryfikacji oparte na porównaniu otrzymanej sekwencji owada z danymi znajdującymi się w bazie NCBI, pozwalając na rozróżnienie sześciu gatunków owadów. Takie metody chociaż interesujące z punktu naukowego są mniej praktyczne w przypadku poszukiwania konkretnie jednego gatunku, w tym przypadku mącznika młynarka.

Test opracowany w ramach prezentowanej pracy nie posiada takich ograniczeń i umożliwia specyficzną identyfikację tego gatunku. W sytuacjach poszukiwania szybkiej weryfikacji potencjalnej zawartości materiału biologicznego mącznika młynarka specyficzny gatunkowo, czuły i prosty w wykonaniu test ma przewagę nad bardziej rozbudowanymi metodami.

Do izolacji DNA użyto zestawu Sherlock z własnymi modyfikacjami, co było nowością w pozyskiwaniu DNA z owadów. W dostępnej literaturze używano innych zestawów (Siozios i in., 2020). Izolacja DNA z owadów jest zazwyczaj kłopotliwa ze względu na obecność pancerzyków chitynowych. Użycie przez autorów pracy DTT i długiego ogrzewanie połączonego z wydłużonym worteksowaniem poprawiło jakość izolatów DNA na tyle, by reakcja PCR była możliwa. Jak zaprezentowano w publikacji, próbki przetworzone miały korzystniejsze parametry, natomiast ich surowe odpowiedniki, głównie larwy mącznika, miały dużą zawartość białka. Jednak pomimo tych niedogodności otrzymane izolaty DNA pozwoliły dla wszystkich próbek otrzymać produkt reakcji PCR. Ponadto dla powtórzeń izolacji otrzymano produkty PCR w przybliżonym cyklu, co sugeruje, że zastosowana metoda izolacji DNA jest powtarzalna.

Prezentowana metoda identyfikacji DNA owadów jest skuteczna w bardzo szerokim zakresie zawartości DNA, zarówno dla 0,025 ng, jak i 25 ng, czyli dla próbki od 0,1 do 100%. Parametry krzywej standardowej dodatkowo wskazują na specyficzność gatunkową oraz liniowość w całym zakresie działania metody, co jest bardzo ważne, bo daje szansę na oznaczanie nie tylko jakościowe, ale również ilościowe. Zważywszy, że reakcje fałszywie pozytywne pojawiają się sporadycznie po 42. cyklu reakcji, granica wykrywalności może być obniżona do 0,01%, co jest atrakcyjnym wynikiem, ponieważ dotychczas dostępne metody radzą sobie z zafałszowaniami na poziomie 1% (Veys i Baeten, 2018).

Prezentowany test jest skuteczny do produktów przetworzonych i może być stosowany do monitorowania karmy. Zastosowanie go do produktów komercyjnych pozwala zauważyć, że mączniki zostały wykryte we wszystkich produktach, w których producent deklarował ich obecność, zatem skład jakościowy badanych karm był zgodny z deklaracją.

Opracowanie metod identyfikacji DNA mącznika młynarka ma kluczowe znaczenie dla monitorowania karm z ich udziałem oraz wykrywania potencjalnych zanieczyszczeń produktów spożywczych przedstawicielami tego gatunku. Doświadczenie pokazało, że zastosowana metoda może być z powodzeniem stosowana do identyfikacji owadów niezależnie od formy biologicznej i stopnia przetworzenia. Parametry

metody, jej wysoka czułość oraz specyficzność pozwalają na wykrycie bardzo małej zawartości tego gatunku, natomiast liniowość rokuje duże szanse na wyznaczenie ilościowe produktu reakcji. Wyniki są powtarzalne, względne odchylenie standardowe jest we wszystkich próbkach mniejsze od 13%.

Wnioski

- Metoda ekstrakcji DNA zestawem Sherlock z DTT oraz wydłużonym czasem ogrzewania/ worteksowania ma zastosowanie do szerokiego spektrum próbek zawierających w swoim składzie owady, niezależnie od ich biologicznej postaci i sposobu przetworzenia.
- Prezentowany test pozwala na szybkie i skuteczne oznaczanie gatunkowe mącznika młynarka na podstawie mtDNA.
- Parametry metody wskazują na wysoką czułość testu, zakres działania dla zawartości mącznika 0,01–100%, specyficzność biologiczną oraz liniowość.
- Liniowość testu daje nadzieje na zastosowanie go do oznaczeń ilościowych.
- Test jest skuteczny do produktów przetworzonych i może być stosowany do monitorowania karmy.

Piśmiennictwo

- Debode F, Marien A., Gérard A., Francis F., Fumière O., Berben G. (2017). Development of real-time PCR tests for the detection of *Tenebrio molitor* in food and feed. *Food Addit. Contam.: Part A*, 34 (8): 1421–1426.
- European Union (EU). (2017). Commission Regulation (EU) 2017/893 of 24 May 2017.
- Ghosh S., Lee S.M., Jung C., Meyer-Rochow V. B. (2017). Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *J. Asia Pac. Entomol.*, 20 (2): 686–694.
- Gwinner J., Rüdiger H., Mück O. (1990). Manual on the prevention of post-harvest grain losses. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, pp. 294.
- Józefiak D., Józefiak A., Kierończyk B., Rawski M., Świątkiewicz S., Długosz J., Engberg R. M. (2016). 1. Insects – a natural nutrient source for poultry – a review. *Ann. Anim. Sci.*, 16 (2): 297–313.
- Makkar H.P., Tran G., Heuzé V., Ankers P. (2014). State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 197: 1–33.
- Marien A., Debode F., Aerts C., Ancion C., Francis F., Berben G. (2018). Detection of *Hermetia illucens* by real-time PCR. *J. Insects Food Feed*, 4 (2): 115–122.
- Park D.S., Footitt R., Maw E., Hebert P.D. (2011). Barcoding bugs: DNA-based identification of the true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). *Plos One*, 6 (4):18749.
- Sforza S., Corradini R., Tedeschi T., Marchelli R. (2011). Food analysis and food authentication by peptide nucleic acid (PNA)-based technologies *Chem. Soc. Rev*, 40 (1): 221–232.
- Siozios S., Massa A., Parr C.L., Verspoor R.L., Hurst G.D.D. (2020). DNA barcoding reveals incorrect labelling of insects sold as food in the UK. *Peer J.*, 8: 8496
- Sun J., Zhang G.L., Li S., Ivanov A.R., Fenyó D., Lisacek F., Murthy S.K., Karger B.L., Brusica V. (2014). Pathway analysis and transcriptomics improve protein identification by shotgun proteomics from samples comprising small number of cells – a benchmarking study. *BMC Genomics*, 15 (Suppl. 9): S1
- Tembe S., Shouche Y., Ghate H.V. (2014). DNA barcoding of Pentatomomorpha bugs (Hemiptera: Heteroptera) from Western Ghats of India. *Meta Gene*, 2: 737–745.
- Tomotake H., Katagiri M., Yamato M. (2010). Silkworm pupae (*Bombyx mori*) are new sources of high quality protein and lipid. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56 (6): 446–448.

- Van Huis A., Van Itterbeeck J., Klunder H., Mertens E., Halloran A., Muir G., Vantomme P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security (No. 171). Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Veys P., Baeten V. (2018). Protocol for the isolation of processed animal proteins from insects in feed and their identification by microscopy. *Food Control*, 92: 496–504.
- Zagon J., di Rienzo V., Potkura J., Lampen A., Braeuning A. (2018). A real-time PCR method for the detection of black soldier fly (*Hermetia illucens*) in feedstuff. *Food Control*, 91: 440–448.

Zatwierdzono do druku: 27 IV 2021

MALGORZATA NATONEK-WIŚNIEWSKA, PIOTR KRZYŚCIN, MARIUSZ PIETRAS, MONIKA BUGNO-PONIEWIERSKA

A rapid test for species identification of yellow mealworm based on mtDNA

ABSTRACT

The increasing interest in insects as an alternative source of food for humans and animals derives from their high content of easily available protein, vitamins, minerals and fat. Regulations increasingly allow for the commercial use of insects (e.g. EU 2017/893). Considering food safety and the increasing public awareness of the ingredients, production process and origin of foods, the availability of insects as food requires the development of tests for reliable identification of their DNA. Yellow mealworm is one of the species most frequently used as a food ingredient. The method proposed in this paper enables determining the potential presence of biological material from this species.

The method is based on real-time PCR analysis of an mtDNA fragment (cytochrome c oxidase subunit I) and involves a simple test for determination of mealworm DNA. The method is effective for a very wide range (0.1% to 100%) of its content in a product. The standard curve parameters show species specificity and linearity across the entire range of the method, which is essential due to a possible quantitative use of the test. The test is effective for analysis of mealworm in raw form and in processed products that contain it, regardless of the stage of insect development (larva, adult form), and can be used to monitor foods containing insects.

The application of the test in commercial products detected mealworm in all the products in which mealworm presence was declared by the manufacturer. In positive samples, the rate of the reaction depended on mealworm content – the higher the content, the more quickly the reaction product was formed.

Key words: species identification of yellow mealworm, COI, identification of insect DNA