

Abstrakt

Hmyz nachází stále častěji využití v potravinářském průmyslu. Pro ověření vhodnosti ELLA metody byly srovnány LEL a WGA lektiny. Oba ověřované lektiny byly vyhodnoceny jako vhodné na stanovení přítomnosti chitosanu v potravinách. S ohledem na lepší reprodukovatelnost lze za vhodnější lektin pro ověřování přítomnosti hmyzu v potravinách považovat WGA. WGA lektin měl LOD 0,06, LOQ 0,09, reprodukovatelnost v rozmezí 0,25 % až 15,4 % a relativní chybu v rozmezí 0,3 až 48,8. Tento lektin lze použít pro nepřímou sendvičovou ELLA metodu. Pro využití metody k dozorové činnosti, je ještě nutné provést ověření na skutečných vzorcích potravin a získat tak úplnou charakteristiku metody.

Úvod

Využití hmyzu má v dnešní společnosti řadu zastánců, ale také odpůrců. Konzumace hmyzu nemá v Evropě tradici na rozdíl od afrických a asijských zemí. Spíše naopak je hmyz považován na „nečisté stvoření“ a je spojován s výskytem nemocí, nízkou úrovní hygieny a dalšími předsudky (Rumpold a Schlüter, 2013). Ať už bude konzumace hmyzu otázkou určité skupiny populace nebo celopopulačně přijatým konceptem v České republice, předpokládá se nárůst produkce hmyzu pro potravinářské a krmné využití (Skotnicka et al., 2021).

Průkaz hmyzu ale není jednoduchý, protože se jedná o širokou skupinu organismů s velkou variabilitou genomu, který vzniká odděleným vývojem v relativně velkých společenstvích. Přesto jsou popsány PCR metody (Tramuta et al., 2018), které umožňují průkaz některých druhů jedlého hmyzu, nebo metody proteomické, zaměřené na specifické proteiny či obsahové látky (Montowska et al., 2024).

Cílem práce bylo ověřit specifitu reaktivity dvou lektinů LEL a WGA na průkaz derivátů chitinu, chitosanu a ověřit tak možnost využití lektinových technik pro průkaz hmyzu v potravinách.

Materiál a metodika

Pro potřeby průkazu hmyzu lektinovými technikami je vyvíjena in-home nepřímá sendvičová ELLA metoda. Měření bylo prováděno na 96-ti jamkových mikrotitračních destičkách, spektrofotometrem Infinite 200 Pro (Tecan, Rakousko). Pro vizualizaci byl použit chromogen TMB, který se měřil při 650 nm. Pro ověření byl použit standard chitosanu v koncentracích 0,1 až 10,0 µg/mL.

Jako kritérium pro porovnání obou technik byl použit limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ) a reprodukovatelnost (CV%). Výsledky měření byly ověřovány na lektinech (*Lycopersicon esculentum* lectin) LEL a (Wheat germ agglutinin) WGA (Vector Laboratories, Newark, USA). Koncentrace lektinů byla 1:10 000.

Statistická analýza byla provedena ve statistickém software Xlstat (Adinsoft, USA). Normalita dat byla ověřena Saphiro-Wilcoxonovým testem, přičemž normalita dat nebyla potvrzena. Data byly testovány na hladině významnosti $p = 0,5$.

Závěr

Z výsledků vyplývá, že oba testované lektiny jsou vhodné pro průkaz přítomnosti chitosanu v potravinách. S ohledem na lepší reprodukovatelnost výsledků je vhodnější pro průkaz přítomnosti hmyzu v potravinách použít lektin WGA. WGA lektin dosáhl LOD 0,06, LOQ 0,09, reprodukovatelnost v rozmezí 0,25 % až 15,4 % a relativní chybu v rozmezí 0,3 až 48,8. Tento lektin lze použít pro nepřímou sendvičovou ELLA metodu. Pro ověření vhodnosti metody pro dozorovou činnost je ještě nezbytné provést ověření na skutečných vzorcích potravin a získat tak úplnou charakteristiku metody.

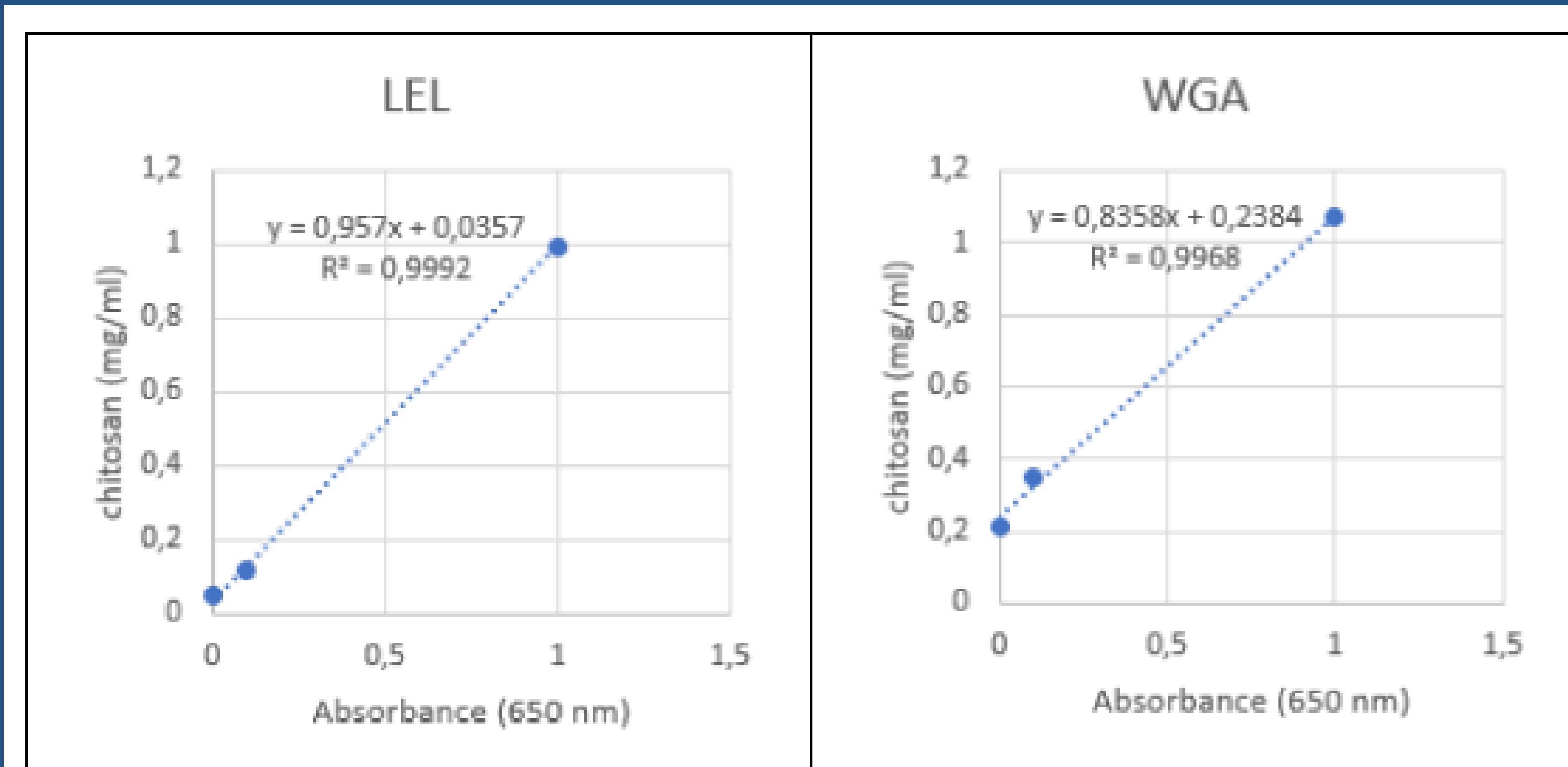
Výsledky a diskuse

Pro oba lektiny byly stanoveny kalibrační křivky vyjadřující závislost koncentrace chitosanového standardu k naměřené absorbanci TMB chromogenu. Lineární závislost je vyjádřena graficky a rovnicí v **grafu 1**.

Hodnocená verifikační kritéria jsou uvedena v **tabulkách 1 a 2**. Tato kritéria byla vybrána dle doporučení AOAC (Koerner et al., 2013). A jsou běžně využívána pro hodnocení ELISA metod, které jsou založeny na podobném principu, ale místo protilátek využívají specifické vazby lektinů se sacharidy (Brooks, 2017).

Verifikační kritéria potvrdila specifickou vazbu mezi lektinem a chitosanem, složkou chitinu, který tvoří základ exoskeletu všech druhů hmyzu. Tato vazba je specifická pro WGA, LEL a další lektiny jako je (Concanavalin A) ConA, kdy dochází k vazbě na molekulu N-acetyl-D-glukosaminu (Leriche et al., 2000). N-acetyl-D-glukosamin je strukturální monosacharid, který tvoří jak chitin, tak jeho nízkomolekulární deacetylovanou formu chitosanu (Zargar et al., 2015). Použité lektiny jsou specifické tedy k více formám chitinu. Ačkoliv se obsah chitinu u jednotlivých druhů může lišit (Garino et al., 2019) lze ho očekávat u všech druhů hmyzu a forem zpracování. Detekční limit LOD a LOQ je vyšší, než je detekční limit pro testy ELISA určené pro průkaz alergenů v potravinách (Zhu et al., 2024). Z pohledu využití hmyzu jako takového v potravinách neočekáváme křížovou kontaminaci, ale spíše cílené přidání, kdy množství zpracovaného hmyzu bude výrazně vyšší, a tedy dostatečně průkazné pro vzorky s nedeklarovaným přídavkem.

Další validační kritéria jsou srovnatelná s ELISA metodami (Zhu et al., 2024). Reprodukovatelnost (CV%) byla pro LEL v rozmezí 0,5 % až 99,9 %, pro WGA v rozmezí 0,25 % až 15,4 %. S ohledem na nižší reprodukovatelnost, nižší LOD a LOQ u WGA lektinu lze tento lektin doporučit pro stanovení přítomnosti chitinu v potravinách, a tedy i průkazu hmyzu.



Graf 1: Kalibrační křivky pro LEL a WGA lektiny

Tabulka 1: Verifikační kritéria pro stanovení chitosanu LEL lektinem

LEL (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	Průměr ± SD (mg/mL)	CV (%)	Relativní chyba (%)
0,1	0,11	0,18	0,07±0,07	99,91058	29,04
1			0,68±0,05	7,040058	32,38
10			8,7±0,05	0,518154	13,04

Tabulka 2: Verifikační kritéria pro stanovení chitosanu WGA lektinem

WGA (mg/mL)	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)	Průměr ± SD (mg/mL)	CV (%)	Relativní chyba (%)
0,1	0,06	0,09	0,15±0,02	15,41	48,79
1			1±0,06	5,66	0,34
10			11,51±0,03	0,25	15,10