



Fakulta zemědělská
a technologická
Faculty of Agriculture
and Technology

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

Katedra genetiky a biotechnologií

Bakalářská práce

Vývoj metodiky pro identifikaci hmyzu určeného pro lidskou
spotřebu na základě molekulárních metod

Autor(ka) práce: Veronika Müllerová

Vedoucí práce: Ing. Dagmar Stehlíková, PhD.

České Budějovice
2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Hmyz bývá často označován jako potravina budoucnosti. Ačkoliv bylo na konzumaci hmyzu v oblasti Evropy většinou hleděno s odporem, v posledních letech jsou některé druhy hmyzu schvalovány pro uvedení na evropský trh s potravinami. Důležitým předpokladem pro využití hmyzu jako potraviny je konstrukce přesné a spolehlivé metody detekce hmyzu. Cílem bakalářské práce bylo vyvinout molekulární metodu, podle které by se v potravinách dala ověřit přítomnost potemníka moučného (*Tenebrio molitor*), jenž je od roku 2021 v EU schválen ke konzumaci. Experimentální část zahrnovala optimalizaci izolace DNA potemníka moučného. Pro ověření specifity metody bylo pracováno i s potemníkem brazilským (*Zophobas morio*), který ke konzumaci schválen není. DNA byla izolována ze sušených larev brouků, z běžného pečiva, perníku, čokolády a rýžové kaše. Pro izolaci DNA byly provedeny 3 různé postupy. Jako vhodná metoda s nejvyšší výtěžností a čistotou DNA byla stanovena metoda izolace DNA pomocí CTAB-PVP. Následně byla provedena optimalizace složení reakční směsi a reakčního cyklu PCR včetně optimalizace annealingu primerů. Výsledky byly vizualizovány pomocí gelové elektroforézy. Výsledná metoda je přesná, specifická a vhodná pro rutinní detekci potemníka moučného v potravinách.

Klíčová slova: izolace DNA, potemník moučný, potemník brazilský, *Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, PCR, CTAB-PVP, molekulární detekce

Abstract

Insect is often recognized as foodstuff of the future. Regardless of a long history of insect consumption being viewed upon with disgust in Europe, some insect species have been approved for the European food market in the recent years. An important requirement for insect use as a foodstuff is the development of an accurate and reliable method of insect detection. The goal of the bachelor thesis was to develop a molecular method that could be used for detecting the mealworm (*Tenebrio molitor*), an EU-approved species, in foodstuffs. The experimental part of the thesis included optimization of mealworm DNA extraction. Specificity test of the method was performed on the superworm (*Zophobas morio*), which is not approved for consumption in the EU. DNA was extracted using 3 different methods. The optimal method achieving highest DNA yield and purity was DNA extraction with CTAB-PVP. Following DNA extraction, optimization for PCR mix and cycle was performed, which included optimization of primer annealing. Results were visualised by gel electrophoresis. The optimized method is accurate, specific and appropriate for routine detection of the mealworm in foodstuffs.

Keywords: DNA extraction, mealworm, superworm, *Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, PCR, CTAB-PVP, molecular detection

Poděkování

Ráda bych velice poděkovala Ing. Dagmar Stehlíkové, PhD. za vstřícnost, trpělivost a odborné rady, bez nichž bych se při kompletaci této práce neobešla. Dále děkuji mé rodině za obrovskou podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

Úvod.....	8
1 Hmyz určený pro lidskou spotřebu	9
1.1 Legislativa	9
1.2 <i>Tenebrio molitor</i>	10
1.2.1 Vývojová stadia.....	11
1.2.2 Využití.....	12
1.2.3 Nutriční hodnota.....	13
1.3 <i>Zophobas morio</i>	15
1.3.1 Vývojová stadia.....	15
1.3.2 Využití.....	16
1.3.3 Nutriční hodnota.....	17
2 Molekulárně biologické metody	18
2.1 Izolace DNA.....	18
2.1.1 Detekce a kvantifikace DNA	20
2.1.2 Magnetická izolace DNA.....	21
2.1.3 CTAB-PVP izolace DNA	22
2.2 Polymerázová řetězová reakce	23
2.2.1 Reakční směs pro PCR.....	23
2.2.2 Fáze PCR.....	24
2.3 Gelová elektroforéza	25
3 Cíl práce	28
4 Metody a materiály	29
4.1 Příprava vzorků	29
4.1.1 Pečivo s obsahem hmyzí moučky	29

4.1.2	Volně prodejné produkty s obsahem moučky z potměníka moučného	30
4.2	Izolace DNA.....	30
4.2.1	Magnetická izolace DNA.....	30
4.2.2	CTAB-PVP izolace DNA	32
4.3	Polymerázová řetězová reakce.....	33
4.3.1	Gradientová PCR	33
4.3.2	PCR se vzorky z pečiva a produktů	34
4.4	Gelová elektroforéza	35
5	Výsledky	36
5.1	Izolace DNA.....	36
5.1.1	Magnetická izolace DNA.....	36
5.1.2	CTAB-PVP izolace DNA	37
5.2	PCR a gelová elektroforéza.....	38
5.2.1	Gradientová PCR	38
5.2.2	Magnetická izolace DNA.....	40
5.2.3	CTAB-PVP izolace DNA	42
5.3	Shrnutí.....	44
6	Diskuse.....	45
	Závěr	50
	Seznam použité literatury.....	51
	Seznam obrázků	59
	Seznam tabulek	60
	Seznam použitých zkratk.....	61

Úvod

Entomofágie, nebo také konzumace hmyzu, je u mnoha živočichů často se vyskytujícím jevem. U člověka se entomofágie datuje více než 7000 let do minulosti (Ramos-Elorduy, 2009) a i dnes v mnohých kulturách zastává důležitou úlohu. Jako běžně konzumovaný hmyz bylo zaznamenáno více než 2300 druhů hmyzu spadajících do 18 řádů (Tang et al., 2009). Kvůli teplému a vlhkému klimatu je konzumace hmyzu populární zejména v tropických a subtropických regionech, kde má často kulturní a náboženský význam. V oblasti Evropy entomofágie nikdy nenabývala takových rozměrů a první zmínky o ní se objevují až ve 20. století (Siemianowska et al., 2013). V poslední dekádě ale zájem o konzumaci hmyzu celosvětově stoupá a Evropská Unie povoluje uvádění určitých druhů hmyzu na trh s potravinami.

Jedním z těchto druhů hmyzu je potěmník moučný, *Tenebrio molitor*. Jeho larvy lze konzumovat samotné jako zajímavý alternativní zdroj proteinu, nebo je přidat do potravin (tyčinky, kaše, čokolády, pečivo) za účelem zvýšení proteinové složky. Chov potěmníka pro lidskou spotřebu je nízkonákladový, nenáročný na prostor, vybavení a je méně pracný ve srovnání s jinými chovy zvířat pro získání živočišného proteinu. Potěmník moučný byl v EU schválen jako tzv. potravinu nového typu v roce 2021 (Traynor et al., 2024) a od té doby je možné na trh uvádět potraviny s jeho obsahem. Záměna by mohla nastat například s potěmníkem brazilským, *Zophobas morio*. Jeho larvy jsou větší a levnější. Hojně se využívají ve výživě zvířat, ale pro lidskou konzumaci v EU povoleny nejsou. Metoda detekce potěmníka moučného v potravinách by mohla přispět k ověření správnosti údajů na obalech produktů a ke kontrole podvodného jednání na trhu s hmyzími produkty.

Pro detekci jednotlivých složek v potravinách se v dnešní době nabízí využití molekulárních metod. U hmyzu se často jako referenční technika pro detekci využívá metoda PCR, která je spolehlivá, přesná a citlivá. Správnost metody může ovšem ve velkém rozsahu ovlivnit složení vstupního materiálu, které je u potravin různé. Některé složky potravin mohou PCR inhibovat a způsobovat nepřesné výsledky. Optimalizace metody PCR pro detekci potěmníka moučného v potravinách je hlavním tématem této bakalářské práce a její specifita je testována oproti potravinám s obsahem potěmníka brazilského.

1 Hmyz určený pro lidskou spotřebu

1.1 Legislativa

Zavedení hmyzích produktů na trh na národní úrovni zcela podléhá legislativě Evropské Unie. Konkrétně se jim věnuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 o nových potravinách platné od 1.1. 2018. Toto nařízení klasifikuje hmyz a výrobky z něj jako tzv. potraviny nového typu.

Potraviny nového typu zahrnují produkty, u kterých není doložena historie spotřeby před 15. květnem 1997. Všechny potraviny zařazené na tento seznam musí podléhat autorizaci Evropské komise, která schválené potraviny zapisuje na Seznam Unie. Hlavní kritérium zápisu potraviny na Seznam Unie je absence bezpečnostních rizik pro zdraví konzumenta. Kromě některých druhů hmyzu seznam čítá potraviny jako jsou semena chia, cascara (sušená dužnina kávovníku) nebo oleoresin (olej s koncentrátem astaxanthinu z mořských řas *Haematococcus pluvialis*). (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 2283, 2015)

Uvedení nových hmyzích produktů na trh neznamena jen úspěšné projití schvalovacím procesem Evropské komise. V České republice je kompetentním úřadem pro potraviny nového typu Odbor bezpečnosti potravin v rámci Ministerstva zemědělství. Jelikož je hmyz určený k lidské spotřebě řazen mezi potraviny živočišného původu, je nutné, aby byl produkt registrován také u Státní veterinární správy (SVS) dle § 22 odst. 1 písm. a) zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči. Jako jeden z dozorových orgánů může fungovat Krajská veterinární stanice, která kontroluje hygienu výroby, výrobních prostor a podmínky chovu hmyzu.

Tabulka 1: Druhy hmyzu povoleného ke konzumaci v EU a jejich využitelné formy

Druh	Český název	Řád	Forma
<i>Alphitobius diaperinus</i>	Potemník stájový	<i>Coleoptera</i>	Larva – zmražená, kašovitá, sušená, prášková
<i>Acheta domestica</i>	Cvrček domácí	<i>Orthoptera</i>	Zmražená, sušená, prášková
<i>Gryllodes sigillatus</i>	Cvrček krátkokřídlý	<i>Orthoptera</i>	Sušená, prášková
<i>Locusta migratoria</i>	Saranče stěhovavé	<i>Orthoptera</i>	Zmražená, sušená, prášková
<i>Tenebrio molitor</i>	Potemník moučný	<i>Coleoptera</i>	Larva – zmražená, sušená, prášková

Nařízení (EU) č. 1169/2011, o poskytování informací o potravinách spotřebitelům hovoří o povinnosti náležitého označování produktů. Označení potravin nesmí uvádět konečného spotřebitele v omyl a nesmí být zavádějící. Pro produkty z hmyzu je nutné na etiketě uvádět daný hmyz jako složku výrobku. Některé druhy hmyzu mohou kvůli obsahu chitinu způsobit alergické reakce u lidí s alergií na měkkýše. Na obalu je nutné tím pádem uvést také varování na daný alergen.

1.2 *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor (Linnaeus, 1758), nebo také potemník moučný, je brouk z čeledi *Tenebrionidae*. Jeho larvární stadium se lidově nazývá „moučný červ“. Toto pojmenování je odvozeno od skutečnosti, že se jedná o skladištního škůdce, který nejčastěji napadá sklady s moukou a obdobnými surovinami. Jako škůdce se živí skladovanými potravinami a také je kontaminuje svými svleky, exkrementy a mrtvými těly (Siemianowska et al., 2013). Jelikož jsou populace potemníka moučného spíše menší, nelze o něm v měřítku produkce mouky hovořit jako o významném škůdci (Ramos-Elorduy et al., 2002).

Původně se jedná o evropský druh, ale dnes je rozšířen v mírném pásmu celého světa. Ve volné přírodě lze potemníka moučného najít pod tlející kůrou listnatých stromů. V takovém případě požírají rozmanitý odpad potravy larev podkorního hmyzu. Jelikož je ale potemník moučný částečně synantropní druh, nejčastěji ho lze nalézt v blízkosti lidských obydlí, kde se živí moukou a moučnými výrobky. (Zahradník, 2008).

V molekulární biologii se potměšník moučný uplatňuje jako modelový organismus. Je proto nutné jeho genetickým vlastnostem věnovat speciální pozornost. Genom potměšníka moučného byl nezávisle na sobě sekvenován a skládán v několika publikacích. Eletheriou et al. (2022) se podařilo pomocí long read, short read a Hi-C dat složit genom potměšníka moučného o velikosti 287,9 Mbp. Počet genů potměšníka v publikaci autoři odhadují na 21435. Kaur et al. (2023) nezávisle na předchozí studii složili genom potměšníka o velikosti 258 Mbp. Až 50 % genomu potměšníka je tvořeno jedním typem satelitní DNA, která je na chromozomech rovnoměrně uložena v oblasti centromery (Hoy et al., 2013). V historii molekulární biologie proběhl u potměšníků zásadní objev, a to v roce 1905, kdy byly objeveny pohlavní chromozomy (Charlesworth et al., 2021). Stalo se tak nálezem malého chromozomu Y, který byl typický pro samčí pohlaví. Determinace pohlaví u potměšníků je stejná jako u člověka. Genotyp XX znamená samčí pohlaví, genotyp XY znamená samčí pohlaví.

1.2.1 Vývojová stadia

Potměšník moučný patří mezi hmyz s proměnou dokonalou. Za svůj život projde celkem čtyřmi vývojovými stadii: vajíčko, larva, kukla, dospělec. Délka životního cyklu potměšníka moučného se pohybuje od 280 do 630 dnů (Lima et al., 2021). Dobu trvání jednotlivých stadií z velké části ovlivňují environmentální faktory jako teplota, vlhkost, živiny a přístup k vodě.

Dospělá samička za život může snést až 250-500 vajíček. Vajíčka potměšníka moučného jsou bílé barvy a protáhlého oválného tvaru. Jsou drobná, jejich délka je přibližně 1,5 mm. Na povrchu mají lepkavý materiál, který vajíčka pojí do shluků a zároveň je připevní k substrátu. Larvy se z vajíček líhnou za 1-2 týdny při teplotním optimu 18-20 °C. Jejich líhnivost závisí na substrátu. Jako substráty s nejvyšší líhnivostí a optimálními podmínkami pro následný vývoj larev se jeví pšeničné otruby, pohanková a žitná mouka a substráty s přídavkem mléka či vajec. (Ooninckx et al., 2022)

Stadium larvy může u potměšníka moučného trvat až 18 měsíců (Lima et al., 2021). Toto stadium je při komerčním chovu potměšníka moučného žádoucí, protože se larvy používají jako výsledný produkt ať už pro lidskou spotřebu, tak jako přídavek do krmiv pro zvířata. Larva se vyznačuje podlouhlým cylindrickým tělem o délce 26-30 mm (Rosentrater, 2022). Je hnědě zabarvená a má tvrdý exoskelet. Vlivem růstu larva tento exoskelet až šestnáctkrát svléká (Zahradník, 2008). Těsně po svleku má larva bílý

a měkký povrch, který rychle tvrdne a opět se mění na tvrdou tmavou schránku. Larvy se zahrabávají hluboko do substrátu a vyhýbají se slunečnímu záření.

Až na konci larvárního stadia se larvy dostávají na povrch substrátu a mění se v kukly. Při optimální teplotě (25 °C) trvá stadium kukly přibližně 5-6 dní (Siemianowska et al., 2013). V tomto období se v kukle odehrávají rozsáhlé fyziologické změny nutné pro přeměnu v dospělého jedince. Zpočátku má kukla světlou barvu a vývojem postupně tmavne. Kukla je nepohyblivá a její délka se pohybuje v rozmezí 12-18 mm (Novák, 2014).

Dospělí jedinci dosahují délky až 18 mm. Jejich masně lesklé protáhlé tělo má černohnědou barvu a vyznačuje se příčným štítem, rovnoběžně rýhovanými krovkami a zřetelně zakřivenými holeněmi u předních nohou (Hůrka, 2017). Hlava je málo pohyblivá, s kousacím ústrojím tvořeným kusadly a čelistmi. Kusadla jsou silně sklerotizovaná a pohybují se horizontálně proti sobě (Zahradník, 2008). Jako nápadná se jeví také tykadla, která mají 11 článků a zastávají čichovou a hmatovou funkci (Novák, 2014). Křídla jsou tvořena dvěma páry. Krovky představují svrchní pár křídel. Jsou hladké, silné, pevné a zakrývají spodní blanitý pár křídel (Zahradník, 2008).

1.2.2 Využití

Larvy potměníka moučného jsou už dlouhá léta velice populárním krmivem pro různé druhy chovaných zvířat, a to ať se jedná o savce, plazy, ptáky či obojživelníky. Zajímavé jsou nejen kvůli jednoduchému způsobu získávání larev a cenové dostupnosti, ale také kvůli atraktivním nutričním hodnotám. Larvy totiž mají vysoký obsah proteinů, mononenasycených a polynenasycených mastných kyselin a vlákniny (Siemianowska et al., 2013). Od roku 2017 jsou larvy potměníka moučného na seznamu zdravotně nezávadných krmiv v akvakultuře. V roce 2021 navíc proběhlo schválení využití larev jako alternativní zdroj proteinů v krmení hospodářských zvířat a v lidských potravinách (Adamaki-Sotiraki et al., 2024).

Ve výživě domácích zvířat je uplatnění moučného červa velké. Larvy lze zkrmovat vcelku živé, sušené nebo rozemleté na moučku. Pro některé drobné savce, plazy či ptáky mohou mouční červi tvořit velkou část krmné dávky. U jiných chovatelé využívají moučné červy jako pochoutku, kterou krmí jen jednou za čas. Moučné červy zužitkují například i psi, kteří trpí alergiemi na většinu druhů masa. Pro takové psy jsou granule s hmyzím proteinem vhodnou hypoalergenní alternativou (Kierończyk et al., 2018).

Uplatnění najdou mouční červi i ve výživě hospodářských zvířat. Například Ramos-Elorduy et al. (2002) experimentálně využili larvy potemníka moučného ve výkrmu brojlerových kuřat. Kuřatům byla zkrmována směs čiroku, sóji a larev, kde larvy zastávaly téměř 20 % krmné dávky. Výsledky byly srovnatelné s klasickým výkrmem brojlerových kuřat. Kromě drůbeže mohou být podobná krmiva aplikována například v krmení prasat nebo skotu (Hong et al., 2022).

Larvy potemníka určené pro lidskou spotřebu jsou sice novinkou, ale u některých se těší velké oblibě. Nejčastěji jsou larvy ke konzumaci upravovány sušením a kořením. Tvrdý exoskelet sušené larvy při konzumaci příjemně křupe, a tak se mouční červi doporučují například jako náhrada smažených bramborových lupínků. Larvy ve formě namleté moučky se přidávají do různých produktů, většinou za účelem zvýšení obsahu proteinů ve výrobku. Může se jednat o kaše, čokolády, tyčinky či pečivo. Motivací pro konzumaci těchto výrobků může být podpora zdravého životního stylu, ohleduplnost vůči životnímu prostředí a volba alternativního zdroje proteinů z etických důvodů.

Využití potemníka moučného se také nabízí v oblasti biodegradace. Vzhledem k jeho všežravému charakteru se potemník nemusí živit jen moukou a cereálními produkty. Naopak má schopnost konzumovat a recyklovat širokou škálu organických látek (Ramos-Elorduy et al., 2002). Mezi ně patří například polystyren. Tento obalový materiál je jeden z nejčastěji používaných plastů. Při rozměrech jeho produkce představuje polystyren velký problém pro životní prostředí kvůli nesnadné degradaci. Pomalu se rozkládá na nano-plasty, které lze poté najít jako residua v tělech různých živočichů. Machona et al. (2022) uvádí, že larvy potemníka moučného mohou být odchovány na polystyrenu jako jediném zdroji jejich potravy. Argumentují úbytkem polystyrenu jako substrátu a nalezení residuí polystyrenu v trávicím ústrojí larev. Nabízí se vysvětlení, že se v trávicím ústrojí larev potemníka nachází bakterie, které zvládnou rozkládat polystyren a podobné komplikované sloučeniny. To by znamenalo velký přínos pro biodegradaci plastů.

1.2.3 Nutriční hodnota

Larvy potemníka moučného jsou pro konzumaci zajímavé zejména svojí nutriční hodnotou. Nutriční hodnota se může lišit podle způsobu zpracování hmyzu před konzumací. Dále nutriční hodnotu ovlivňují (1) podmínky, ve kterých je hmyz

chován, (2) substrát, kterým je hmyz krměn a (3) vývojové stadium, ve kterém se hmyz nachází.

Larvy obsahují dostatek proteinů, tuků, vlákniny, minerálů a vitaminy. Ze stopových prvků se jedná převážně o fosfor, hořčík, zinek, železo, mangan a měď (Siemianowska et al., 2013). Vyznačuje se také obsahem polyfenolických látek, které jsou součástí chemické obrany hmyzu. Hmyzí fenolické látky jsou především známy pro svou antioxidační aktivitu, ale zároveň vykazují například protizánětlivé a protirakovinné účinky (Aiello et al., 2023).

Tabulka 2: Procentuální obsah komponent v larvách potměnky moučné

[%]	Čerstvé	Sušené
Obsah vody	36,42 ± 1,31	7,25 ± 1,16
Hrubý protein	52,14 ± 0,90	60,21 ± 1,08
Hrubý tuk	28,38 ± 0,48	19,12 ± 0,26
Hrubá vláknina	24,36 ± 0,54	22,35 ± 0,59
Hrubé sacharidy*	3,4	11,45 ± 0,38

(Heidari-Parsa et al., 2018; *Son et al., 2021)

Sacharidy nezastávají velkou část nutriční hodnoty larev a často jsou v analýzách opomíjeni. Zahrnují například cukry jako glukóza, fruktóza, galaktóza, ale také chitin. Chitin je velmi důležitý aminopolysacharid tvořící většinu nerozpustné složky sacharidů v larvách. Son et al. (2021) extrahovali chitin z prášku ze sušených larev a stanovili jeho obsah na 4,72 % ($\pm 0,21$). Fyzikální vlastnosti chitinu izolovaného z larev se podobají vlastnostem chitinu derivovaného z kůry. Rozdílem je ale jemnější struktura a protizánětlivé účinky prokázané u chitinu moučných červů. (Son et al., 2021)

Obsah chitinu v larvách na sebe váže riziko vzniku alergické reakce. Zejména u lidí s alergií na kůru je při konzumaci hmyzu potřeba zvýšené opatrnosti. Hlavním alergenem je zde právě chitin. Alergická reakce může být respirační při dlouhodobém působení alergenu nebo vznikne bezprostředně po konzumaci potravin s obsahem potměnky moučné. (Broekman et al., 2017)

1.3 *Zophobas morio*

Zophobas morio (Fabricius, 1776), nebo také potěmník brazilský, je brouk z čeledi *Tenebrionidae*. Taxonomické synonymum pro potěmníka brazilského je *Zophobas atratus* (Fabricius, 1775). Přirozeně se vyskytuje v tropických oblastech Centrální a Jižní Ameriky. Pro své využití je dnes chován prakticky po celém světě. I když se stejně jako potěmník moučný řadí mezi skladištní škůdce, jeho význam je v této souvislosti zanedbatelný. O škůdci se o něm hovoří pouze ve vztahu ke skladované pšeničné mouce (Hagstrum and Subramanyam, 2009).

V publikaci Kaur et al. (2023) se podařilo složit genom potěmníka brazilského o velikosti 462 Mbp, což je skoro dvojnásobek velikosti genomu potěmníka moučného. Genom ze 33,34 % tvoří páry C a G dusíkatých bází. Autoři publikace dále odhadují, že potěmník brazilský má celkem 28544 genů.

1.3.1 Vývojová stadia

Potěmník brazilský je hmyz s přeměnou dokonalou. Jeho metamorfóza zahrnuje stadia vajíčka, larvy, kukly a dospělce.

Vajíčka potěmníka brazilského jsou bílé až nažloutlé barvy a mají oválný tvar. Jejich délka je přibližně 1,7 mm a šířka 0,7 mm (Fursov and Cherney, 2018). Teplota pro optimální vývoj a líhnutí vajíček je 25 °C. Při dodržení této teploty se vajíčka líhnou po 8 dnech. Dospělá samička za svůj život dokáže naklást až 2200 vajíček. (Rumbos and Athanassiou, 2021)

Larvy jsou morfologicky podobné larvám potěmníka moučného, ale jsou mnohem větší. Proto se také larvám potěmníka brazilského přezdívá „king worm“ nebo „super worm“. V tomto stadiu dochází u larvy až k 18 svlekům. Po posledním svleku larvy nabývají délky až 60 mm (Kim et al., 2015). Larvy mají cylindrický, silně sklerotizovaný exoskelet. Jejich tělo je žluté barvy, která přechází do hnědých až černých odstínů. Doba trvání stadia larvy se může lišit podle hustoty populace. Quennedey et al. (1995) prokázali, že pokud jsou čerstvě vylíhnuté larvy separovány, trvá jejich vývoj déle než vývoj larev, které byly chovány ve skupině. Zároveň nedochází k zakuklení larvy, pokud je hustota larev v substrátu moc vysoká. Tento jev nebyl sledován u potěmníka moučného.

Při teplotě 25 °C trvá stadium kukly 13-15 dní. Se zvýšením teploty dochází k urychlení vývoje. Při teplotě 29 °C je možné zredukovat délku stadia na 11 dní.

I přesto trvá vývoj kukly potemníka brazilského v dospělého jedince déle, než vývoj kukly potemníka moučného. (Quennedey et al., 1995)

Z kukly se stává dospělý jedinec. Jedná se o hnědě až černě zbarevného brouka se segmentací těla na hlavu, hrud' a tělo. Dospělec morfologicky připomíná potemníka moučného, ale liší se od něj zejména velikostí. Délka těla dospělého potemníka brazilského je 38-57 mm. Charakterizují jej především tvrdé vroubkované krovky a protáhlá tykadla. Stadium dospělce trvá přibližně 6 měsíců. (Rumbos and Athanassiou, 2021)

1.3.2 Využití

Z hlediska entomofágie je potemník brazilský běžně konzumován několika etnickými skupinami v Mexiku (Ramos-Elorduy et al., 2009). V Evropě není zařazen na seznam Unie jako potravinu nového typu a ke dnešnímu dni (březen, 2024) není podána žádost pro jeho autorizaci. I přes mnoho společných vlastností s potemníkem moučným není možné na evropský trh uvádět potraviny obsahující potemníka brazilského.

Potemník brazilský je zajímavým zdrojem živin pro nejrůznější druhy zvířat. Nabízí se jeho využití v akvakultuře. Například Prachom et al. (2021) uvádí, že při 44% náhradě krmné dávky latesů stříbřitých larvami potemníka nedošlo k negativnímu ovlivnění růstu ryb, konverze živin, ani ke změně hematologicko-biochemických parametrů. V Evropské Unii ale není potemník brazilský oficiálně schválen pro účely krmení v akvakultuře, jelikož není zahrnut v Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2017/893.

Mimo krmení ryb je možné larvy potemníka brazilského použít také v krmných dávkách pro prasata nebo drůbež. Benzertiha et al. (2020) zjistili, že 0,3% přídavek larev do běžné krmné dávky brojlerových kuřat mělo pozitivní vliv na váhový přírůstek, příjem krmiva a obsah imunoglobulinů v krevní plazmě ptáků. Přídavek larev má také prebitoický efekt. Dochází ke zvýšení koncentrace probiotických a kmenzálních bakterií (např. rod *Actinobacteria*) ve střevním mikrobiomu pro ochranu před patogenními bakteriemi (Józefiak et al., 2020). Zároveň může sloužit jako proteinová pochoutka pro exotická zvířata chovaná v zajetí, včetně papoušků a plazů.

Nadějné uplatnění nachází potemník brazilský v biodegradaci plastů, zejména polyetylenů a polystyrenů (Rumbos and Athanassiou, 2021). Yang et al. (2020) demonstrovali, že larvy potemníka brazilského mohou být krmeny polystyrenem, a to

za konzumace čtyřikrát většího množství polystyrenu než larvy potměníka moučného. Larvy depolymerizují velké molekuly plastů na nízkomolekulární degradované sloučeniny (Yang et al., 2020). Nakládání s plastovým odpadem dnes představuje velký problém a téma degradace plastů je důležitým tématem. Proto jsou další studie degradačních schopností larev potměníka důležité. Kim et al. (2020) například prováděli rozbor střevního mikrobiomu larev, ze kterého byly izolovány kmeny bakterií s biodegradačním potenciálem (např. rod *Pseudomonas*).

1.3.3 Nutriční hodnota

Nutriční hodnota larev potměníků brazilských se liší podle způsobu chovu, vybraného substrátu jako krmení pro larvy a také úpravou larev. Zvířatům se většinou zkrmují larvy živé nebo částečně omráčené, které mají vysoký obsah vody. Do hotových krmiv se zakomponují spíše sušené larvy, které mohou být rozemleté na prášek.

Tabulka 3: Procentuální obsah komponent v larvách potměníka brazilského

	[%]
Obsah vody	60,46 ± 2,05
Hrubý protein	46,80 ± 1,78
Hrubý tuk	43,64 ± 0,47
Obsah sacharidů	1,39 ± 0,77

(Araújo et al., 2019; Cardoso et al., 2020, Dragojlović et al., 2022)

Obsah sacharidů je obecně u jedlého hmyzu velice nízký, pohybuje se v hodnotách 1-18 % (Ramos-Elorduy et al., 1997). U larev potměníka brazilského je obsah sacharidů obzvláště nízký ve srovnání s larvami potměníka moučného nebo cvrčkem pouštním (8,6 %)(Araújo et al., 2019). Celkové stanovení sacharidů zahrnuje například obsah hrubé vlákniny a chitinu.

2 Molekulárně biologické metody

2.1 Izolace DNA

Izolace nukleových kyselin představuje první důležitý krok pro většinu metod molekulární biologie. Dodržením přesného postupu je možné z biologického materiálu separovat všechny ostatní složky tak, aby zbyla pouze čistá DNA. Pro úspěšné provedení navazujících postupů je žádoucí, aby tato extrahovaná DNA byla kvalitní. Kvality lze dosáhnout zejména optimalizací a dodržováním vhodného izolačního postupu.

Existuje mnoho metod izolace DNA – některé se vyznačují vysokou výtěžností, některé vysokou čistotou výsledného produktu a některé vysokou cenou. Všechny uvedené atributy je nutné při výběru vhodné metody brát v potaz. DNA izolována tradičními laboratorními metodami může disponovat vysokou koncentrací a čistotou, ovšem dosažení tohoto výsledku je pracnější a časově náročnější. Zrychlenou alternativu představuje izolace DNA pomocí extrakčních kitů a automatizovaných postupů, které umožňují cestu od biologického materiálu k extrahované DNA snížit na časové jednotky v řádu hodin. Nevýhoda tohoto přístupu však spočívá ve vyšší ceně.

Purifikační procesy nukleových kyselin obecně využívají principy rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, adsorpce na určité částice a nebo ultracentrifugaci v gradientních roztocích (Šmarda et al., 2005).

Fáze izolace DNA

Samotná izolace se zahajuje odběrem biologického materiálu. Jelikož následný postup dosahuje nejlepších výsledků při využití homogenního vzorku, je vhodné nekonzistentní vzorky nejprve důkladně homogenizovat. Postup homogenizace se liší podle původu materiálu (živočišný, rostlinný, mikrobiální) nebo komplexnosti tkání a pletiv. Některé vzorky stačí oddělit od růstového média centrifugací či ultrazvukem. U komplexnějších tkání či pletiv je potřeba zvolit efektivnější metodu homogenizace. Ta může spočívat například v mechanické homogenizaci vzorku hmoždířem nebo drcením vzorku speciálními kuličkami za využití laboratorního vortexu či automatického homogenizátoru (Burden, 2012). Způsob homogenizace musí být šetrný, aby nedošlo k poškození DNA a její fragmentaci na kratší úseky. Dále je u vzorku nutné zabránit degradaci nukleových kyselin enzymy přítomnými

v buněčném extraktu, a to zejména využitím čerstvého, lyofilizovaného či zamraženého vstupního materiálu pro další kroky izolace (Šmarda et al., 2005).

K uvolnění DNA z komplexu buněčných membrán a bílkovin ovšem samotná homogenizace nestačí. Je potřebné provést lyzi buněčné stěny způsobem, který odpovídá typu buňky. U bakteriálních buněk se například k lyzi buněčné stěny často využívá dvou činidel. Jedná se o (1) enzym lysozym, který se přirozeně vyskytuje ve vaječném bílku a ve slinách. Slouží k rozrušení polymerních jednotek buněčné stěny (Brown, 2001). Dále jde o (2) chelatační činidlo EDTA, které se využívá k inhibici buněčných deoxyribonukleáz a zároveň k destabilizaci vnější bakteriální membrány navázáním hořčnatých iontů (Heikrujam et al., 2020). Jiný postup je volen v případě živočišných buněk, které bez buněčné stěny podléhají lyzi snadněji působením jemnějších detergenčních činidel. Využívají se například pufrý s obsahem SDS. U rostlinných buněk je často lyze buněčné stěny realizována lyzačním pufrém CTAB (Schenk et al., 2023).

Výsledkem lyze buněčné stěny je směs proteinů, lipidů, sacharidů, nukleových kyselin a dalších komponentů. Následující krok spočívá zejména v oddělení cílové nukleové kyseliny, DNA, od ostatních složek směsi a zbavení se nežádoucích kontaminantů. Výsledku je dosaženo pomocí pufru ekvilibrovaným fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu, kde se jednotlivé složky směsi separují podle rozdílu rozpustnosti molekul za vzniku dvou nemísitelných látek (Hunt, 1997).

Důkladným promícháním v centrifuze dojde k denaturaci proteinů, jejichž sraženina poté tvoří mezifázi rozdělující vzorek na vodnou fázi (obsahující nukleové kyseliny) a organickou fázi (obsahující lipidy a ostatní složky). Využívá se fenol s neutrálním až alkalickým pH. V případě využití fenolu s kyselým pH ve vodné fázi zůstává pouze RNA. DNA přechází do organické fáze. Mimo jiné existují i lyzační postupy, které za působení solí zvyšují hustotu vodné fáze tak, že se jednotlivé fáze převrátí. (Xu et al., 2019)

Dalším krokem izolace DNA je její precipitace. Tento krok slouží k přečištění DNA od nežádoucích zbytků fenolu a chloroformu a zároveň k jejímu zakoncentrování. Z oddělené vodné fáze je DNA vysrážena pomocí isopropanolu nebo ethanolu. Na tomto kroku závisí mimo jiné i výtěžek nukleové kyseliny, který lze ovlivnit délkou a teplotními podmínkami precipitace. Jako nejvhodnější se jeví umístění vzorku do prostředí o teplotě -20 °C a méně až po dobu několika hodin

(Brown, 2001). Následuje centrifugace vzorku, při které DNA vytvoří pelet – DNA agregát sedimentující na dně mikrozkušavky.

Finální krok spočívá v přečištění DNA peletu od zbylých kontaminantů a jeho rozpuštění ve vhodném roztoku. Přečištění se provádí kvůli odstranění posledních zbytků lyzovaných buněk a přítomných solí, a to nejčastěji vymraženým ethanolem pro extrahovanou DNA ve formě peletu může být využit pufr Tris-HCl o pH okolo 8,0 v kombinaci s EDTA, jenž slouží jako stabilizátor pH prostředí a zejména jako inhibitor nukleáz (El-Ashram et al., 2016).

Podmínky uchování izolované DNA se mohou značně lišit. Odvíjí se od velikosti a konformace DNA, následujícího využití a plánované doby uchování. Krátkodobě se roztok DNA uchovává při teplotě 4 °C, u dlouhodobého skladování se využívá zamražení DNA při -20 °C. Lineární DNA o velikosti přesahující 20 kb je nestabilní a při rozmrazování a zamrazování degraduje. Proto pro ni není skladování při -20 °C vhodné. (Šmarda et al., 2005)

2.1.1 Detekce a kvantifikace DNA

Metody detekce a kvantifikace DNA zahrnují (1) gelovou elektroforézu, kde je DNA vizualizována na agarózovém gelu, lze zde identifikovat příměsi a také určit velikost fragmentů DNA, (2) spektrofotometrické měření a (3) fluorimetrické měření, kde se využívá speciální fluorescenční barvivo, jenž se specificky váže na nukleové kyseliny. Měření poté probíhá na základě emitované fluorescence z fluoroforu navázaného na DNA pod procházejícím světelným zářením. (Chauhan, 2019)

Při metodě spektrofotometrického měření se využívá vlastnosti DNA absorbovat světlo o specifické vlnové délce. Spektrofotometr měří absorbanci roztoku při různých vlnových délkách. Vlnová délka 260 nm slouží k detekci nukleových kyselin a zároveň k určení jejich koncentrace ve vzorku. Nevýhodou je zde nemožnost odlišit RNA od DNA, jelikož absorbují při stejné vlnové délce. Bílkoviny v roztoku lze identifikovat pomocí absorbance při 280 nm. Dále se při měření využívá vlnové délky 230 nm, při níž absorbují kontaminanty jako EDTA, fenoly a sacharidy. (Lucena-Aguilar et al., 2016)

Pro jednoduché, rychlé měření a interpretaci výsledků se nabízí použití přístroje NanoDrop. Malý objem vzorku extrahované DNA je umístěn na optické vlákno a měří se u něj absorbance UV světla. Pomocí počítačového software je pak možné

vyhodnotit jednotlivé naměřené absorbance, jejich poměry a vizualizovat je i v grafické podobě ve formě křivky.

Běžně NanoDrop měří koncentraci DNA ve vzorku, kterou udává v ng/μl. Ačkoliv je přístroj poměrně přesný, u vzorků s velice nízkou koncentrací DNA nemusí měření proběhnout správně. Nízké či negativní naměřené koncentrace DNA většinou indikují chybu v postupu izolace nebo nesprávně zvolenou metodu izolace. Pro následující PCR se vzorky s nízkou koncentrací ale využít dají, jelikož se jedná o velmi citlivou metodu. Naopak vzorky s velmi vysokou koncentrací DNA je poté pro PCR vhodné ředit.

NanoDrop dále interpretuje poměr absorbancí 260/280. Tato hodnota odráží čistotu nukleových kyselin a pro DNA by se měla pohybovat v blízkosti 1,8 (Lucena-Aguilar et al., 2016). Nižší hodnota může indikovat zejména přítomnost bílkovin a jiných kontaminantů, které silně absorbují v blízkosti vlnové délky 260 nm. Druhá hodnota měřící čistotu DNA je poměrem absorbancí 260/230 a měla by se nacházet v rozmezí 2-2,2 (Chauhan, 2019).

2.1.2 Magnetická izolace DNA

Magnetická extrakce DNA je jednou z metod separace a purifikace nukleových kyselin. Využívá se zde elektrostatické interakce DNA s povrchem magnetických částic (Beran et al., 2022). Ty jsou při izolaci představovány speciálními magnetickými kuličkami. Výhodou je zejména modernizace a automatizace celého procesu. Centrifugace či několikahodinové čekání při precipitaci DNA jsou vynechány a samotná extrakce se odehrává v robotické stanici. K přípravě vzorku před izolací se používají komerčně vyráběné kity. Vysokou pořizovací cenu kitů a celé robotické stanice kompenzuje úspora času, jelikož takto provedená izolace zabere nanejvýš několik hodin. Dalšími výhodami jsou například snížení rizika kontaminace vzorku při izolaci a opatrnější a šetrnější manipulace s molekulami DNA.

DNA je u této metody izolace navázána na magnetické kuličky obsahující částice oxidů různých kovů, které jsou externím magnetickým polem drženy při stěně izolační kolonky po celou dobu promývání a přečišťování. (Berensmeier, 2006)

V dalším kroku se externí magnetické pole ruší a DNA je uvolněna do elučního pufru. Prakticky jsou tyto kroky realizovány ve speciálních kazetách vkládaných do robotického izolátoru, které obsahují magnetické kuličky, pufr, kolonky a chemikálie na promývání vzorku. Kazety se liší podle typu biologického materiálu,

z něhož je DNA izolována. Robotický izolátor disponuje různými izolačními programy, které je nutné optimalizovat podle povahy vzorku. (krd.cz)

2.1.3 CTAB-PVP izolace DNA

I když se využití detergentu CTAB ve velké míře vztahuje na izolaci DNA z rostlinného materiálu, je možné jeho aplikaci přenést i na jiné biologické materiály. Na rozdíl od komerčních kitů a lyzačních pufrů jako SDS má tato izolace výhodu v efektivnější eliminaci fenolických látek. Tato oxidační činidla mají vlastnost vázat se na DNA, snížit výtěžnost a čistotu DNA a tím tedy inhibovat její další enzymatické modifikace (např. PCR)(Calderón-Cortés et al., 2010).

CTAB při izolaci slouží jako homogenizační pufr. Následně separuje polysacharidy při purifikaci a zabráňuje jejich koprecipitaci s DNA. Při izolaci DNA z hmyzu se často využívá v kombinaci s antioxidianty jako je (1) PVP, jenž se váže na polyfenoly a (2) β -merkapt ethanol, jenž denaturuje proteiny (Schenk et al., 2023). β -merkapt ethanol je považován za toxickou látku, neboť při kontaktu s kůží, očima či sliznicemi dýchacího traktu způsobuje iritaci tkání a při požití vážné trávicí problémy, případně až letální účinky při nadměrné expozici této chemikálii (Sigma-Aldrich, 2012). U izolace DNA je nutné pracovat se zvýšenou opatrností a v digestoři, která odvádí výpary pryč.

Přídavkem chloroformu v kombinaci s isoamylalkoholem je docíleno rozdělení vzorku na vodnou a organickou fázi. IAA je v roztoku využíván pro redukci pění, které by chloroform obvykle způsoboval (Hoy et al., 2013). Protokoly pro CTAB-PVP DNA izolace se často liší v provedení precipitace. Běžně je realizována isopropanolem nebo 96% ethanolem a probíhá za teploty $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výhodou této metody je optimalizace délky precipitace, která poté ovlivňuje výslednou výtěžnost DNA. Některé protokoly, například Drábková et al. (2002), doporučují následnou centrifugaci provádět za nižších teplot okolo $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby se podařilo zachovat co nejvíce precipitátu i při centrifugaci. Přechištění precipitátu probíhá prostřednictvím alkoholu ve dvou krocích. Prvně je použit vysoce koncentrovaný ethanol a podruhé ethanol s nižší koncentrací. Zvýšení efektivity může být zajištěno i přidáním TE pufru (Xin and Chen, 2012). Opět je důležité vzniklý DNA pelet dostatečně vysušit a tím se zbavit zbytků ethanolu ve vzorku. Při finálním kroku, eluci DNA, se pelet rozpustí buď v TE pufru nebo ve sterilní vodě.

Nevýhodou této metody izolace DNA je vysoká časová náročnost, jelikož při precipitaci a přečištění se vzorky nechávají v mrazu až přes noc. K úspěšně izolované DNA se v některých případech lze dostat až za 3 dny. Na druhou stranu je metoda vysoce spolehlivá, účinná a má vysokou výtěžnost DNA. Pro některé biologické materiály nemusí být CTAB-PVP ideální metodou izolace, ale obecně má velmi široké uplatnění při izolaci DNA z nejrozličnějších vzorků, včetně hmyzu (Hoy et al., 2013).

2.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce se stala revoluční metodou. PCR je v publikacích sice popisována už od roku 1985 (Innis et al., 2012), ale i dnes nachází v mnoha přístupech molekulární biologie naprosto bezkonkurenční uplatnění. Rutinně se využívá například v medicínské diagnostice k identifikaci onemocnění, forenzní analýze nebo při DNA klonování. Stále také slouží jako hlavní referenční technika při detekci DNA v potravinářství a krmivářství (Marien et al., 2022). Jedná se o velice sensitivní metodu, která dokáže spolehlivě amplifikovat i jedinou DNA molekulu. Je využitelná i do high-throughput procesů kvůli své rychlosti a efektivitě.

Princip PCR spočívá v mnohonásobné amplifikaci cílového úseku DNA podle konkrétního templátu. Termostabilní DNA polymeráza je zde využita k výstavbě nových fragmentů DNA. Ty poté slouží jako templát pro vznik nových amplikonů v dalších cyklech PCR, což vede k exponenciálnímu nárůstu specifických fragmentů v každém dalším cyklu. Přístroj, ve kterém PCR probíhá se nazývá termocykler. Jeho funkce spočívá v cyklickém střídání teplot, čímž aktivuje či inaktivuje funkci DNA polymerázy a zajišťuje další kroky polymerázové řetězové reakce. (Innis et al., 2012)

2.2.1 Reakční směs pro PCR

Reakční směs pro PCR se skládá z několika komponent. Jejich množství a poměry je potřeba optimalizovat ke zvýšení efektivity reakce.

Jednou z hlavních komponent reakční směsi je termostabilní DNA polymeráza. Mezi nejčastěji rutinně využívané DNA polymerázy při PCR patří *Taq* polymeráza. Její název je odvozen od termofilní bakterie *Thermus aquaticus*, nacházející se přirozeně v horkých pramenech. Teplotní optimum pro funkci *Taq* polymerázy je 72 °C, čehož se při PCR využívá ve fázi elongace. *Taq* polymeráza v této fázi z volných dNTPs skládá nové řetězce DNA dle templátu. Výstavba vlákna se realizuje ve směru 5'-3'. (Bartlett and Stirling, 2003)

Nezbytnou součástí reakční směsi jsou primery, které ohraničují cílový amplifikovaný úsek DNA. Primery představují řetězce oligonukleotidů o délce 18-25 bp, které do reakce vstupují minimálně v podobě jednoho páru. Je možné využít i více párů primerů, zejména při různých modifikacích. Mezi ně patří například nested PCR nebo multiplex PCR. Jeden pár primerů se skládá z (1) forward primeru, který hybridizuje se začátkem zkoumané DNA ve směru 5'-3' na kódujícím vlákně, a z (2) reverse primeru, který hybridizuje se začátkem této sekvence na komplementárním vlákně (Joshi and Deshpande, 2011). Navržení a využití vhodných primerů je důležitým krokem před samotnou PCR. Primery musí být dostatečně specifické, aby nenasedaly na jiné než vybrané úseky DNA. Zároveň nesmí nasedat jeden na druhý – došlo by tak ke vzniku nežádoucích primer dimerů (Šmarda et al., 2005).

Deoxynukleosidtrifosfáty představují další složku. Jedná se o volné částice, ze kterých DNA polymeráza syntetizuje nové fragmenty DNA. Konkrétně zahrnují dCTP, dGTP, dATP a dTTP. Jejich koncentrace v reakční směsi přímo ovlivňuje průběh PCR reakce. Příliš vysoká koncentrace snižuje specifitu reakce a může vyústit v mispriming na necílových místech (Innis et al., 2012). Pro správný chod reakce je nutné mimo dNTPs přidat také Mg^{2+} ionty, které s dNTPs tvoří komplexy. Ty poté slouží jako vhodný substrát pro DNA polymerázu (Kadri, 2019). Dále se do reakční směsi dodává speciální PCR pufr, který udržuje pH reakční směsi a zásobuje směs ionty pro optimální enzymatickou aktivitu.

Posledním důležitým komponentem reakční směsi je templátová DNA. Může se jednat jak o jednovláknovou, tak o dvouvláknovou DNA. Pro správný průběh PCR reakce je vhodné, aby byla templátová DNA z analyzovaného materiálu získána vhodným izolačním postupem, nebyla poničena a vyznačovala se dostatečnou koncentrací a čistotou. U kruhové DNA může být účinnost reakce nižší, než při amplifikaci lineární DNA (Beran et al., 2022).

2.2.2 Fáze PCR

PCR reakci je možné rozdělit do tří fází, které se liší teplotou a dobou trvání. Pro každou reakci je nutné na přístroji nastavit a dále optimalizovat celý reakční cyklus. Nevhodným reakčním cyklem nemusí vůbec k amplifikaci dojít.

Úvodním krokem reakčního cyklu je počáteční denaturace. V této fázi přístroj působí na vzorek teplotou 94 °C po dobu 2-5 minut. Dochází k denaturaci

dvouřetězcových molekul za oddělení jednotlivých řetězců. Následuje již samotný cyklus PCR, jehož počet opakování se pohybuje mezi 25-35. Příliš vysoký počet cyklů zvyšuje množství vznikajících nespecifických PCR produktů. První fázi cyklu je opět denaturace, kde se volí teploty okolo 94 °C s působením po dobu 15-45 sekund. (Kadri, 2019)

Další fáze se nazývá annealing a dochází zde k nasedání primerů na jednotlivé řetězce DNA. Tato fáze trvá 30-60 sekund a teplota závisí zcela na konkrétních primerech (Innis et al., 2012).

Každý primer má jinou optimální teplotu annealingu, která vychází z jeho kompozice a struktury. Teploty annealingu jsou uvedené na balení komerčně vyráběných primerů, ale přesto se doporučuje pomocí gradientové PCR nejprve provést optimalizaci pro zjištění, při které teplotě primery nasedají nejlépe. V termocykleru se pro jednotlivé sloty na vzorky nastaví gradient teplot (cca 50-68 °C). Po proběhlé PCR lze například gelovou elektroforézou vyhodnotit, při které teplotě proběhlo k nejúčinnější a nejintenzivnější amplifikaci. Tato teplota se poté jeví jako nejvhodnější pro použití v dané reakci. (Rychlik et al., 1990)

Třetí fázi reakčního cyklu je elongace, při které se pomocí termostabilní DNA polymerázy prodlužuje nově vzniklé řetězce DNA ve směru 5'-3'. Syntéza DNA probíhá zpravidla při 68-72 °C (Šmarda et al., 2005). Dobu trvání této fáze určuje zejména délka amplifikovaného úseku DNA. *Taq* polymeráza například zvládne syntetizovat vlákno o délce 1000 bp za 1 minutu (Beran et al., 2022).

Po proběhnutí všech reakčních cyklů je doporučeno nastavit i závěrečnou elongaci, kdy se při 72 °C dosyntetizují poslední řetězce DNA. Poté může být v termocykleru nastaveno chlazení, které zchladí vzorky na takovou teplotu, aby se s nimi dalo dále pracovat. (Kadri, 2019)

2.3 Gelová elektroforéza

Elektroforéza označuje skupinu metod vhodných pro separaci molekul DNA, RNA či proteinů. Jednou z těchto metod je právě gelová elektroforéza, která pracuje s odlišnou pohyblivostí různě velkých molekul na gelu ve stejnosměrném elektrickém poli. Běžně se využívá agarózový nebo polyakrylamidový gel. Polyakrylamidový gel je vhodný pro separaci menších molekul, od 1 bp do 300bp (Chory and Pollard, 2001). Tento gel je náročnější na přípravu a analyticky se využívá například ve formě nativní PAGE nebo SDS-PAGE. Příprava agarózového gelu je naopak jednodušší. Agarózový

gel je pro separaci fragmentů DNA velice účinný. Dokáže oddělit fragmenty o velikosti od 100 bp do 25 kbp (Lee et al., 2012).

Hlavní složkou agarózového gelu je agaróza. Tento polysacharid se izoluje z mořských ruduch rodu *Gracilaria* a *Gelidium*. Při tuhnutí gelu se na sebe agarózové polymery nekovalentně vážou a vytváří tak porézní síť, která určuje propustnost gelu (Lee et al., 2012). Technicky je možné propustnost gelu regulovat změnou množství agarózy v gelu. Pro pohodlnou separaci menších fragmentů DNA je vhodné využít gel s větší koncentrací agarózy, protože velké molekuly neprojdou a ty menší bude lehké od sebe oddělit. U separace větších DNA fragmentů se naopak volí gel s nižší koncentrací, aby mohly porézní sítí projít i větší molekuly.

Pro separaci se vzorky u gelové elektroforézy aplikují do jamek, které byly v gelu vytvořeny hřebínkem při přípravě gelu. Gel se nechává zatuhnout v nalévací vaně. Ta je poté přesunuta do elektroforetické vany s připraveným pufrem (nejčastěji TBE (Beran et al., 2022)). Elektroforetická vana disponuje kladnou a zápornou elektrodou (anodou a katodou) a připojeným zdrojem elektrického napětí. Molekuly DNA obsahují záporně nabitou fosfátovou skupinu, a tak se ve stejnosměrném elektrickém poli pohybují směrem k anodě, kladné elektrodě (Tan and Yiap, 2009). Elektrické napětí se volí v rozmezí 80-150 V. Mělo by odpovídat 5-10 V/cm vzdálenosti od jedné elektrody k druhé (Beran et al., 2022). U menších van nelze zvolit tak velké elektrické napětí, jako u van větších. Při příliš velkém napětí by hrozilo přehřátí elektroforézy a degradace vzorku.

Pohyblivost DNA molekuly gelem závisí na velikosti molekuly, typu a koncentraci agarózy v gelu, konformaci DNA, velikosti napětí, přítomnosti interkalačního barviva a elektroforetickém pufru (Lee et al., 2012). Pro provedení gelové elektroforézy je důležité i správné vyhodnocení, které zajišťuje (1) barvivo pro vizualizaci molekul a (2) velikostní marker.

Na obyčejném gelu nelze vizualizovat molekuly DNA běžnou adspekci. V tomto případě se využívají interkalační barviva, která mají schopnost vmezeřit se do dvoušroubovice DNA. Vyhodnocení je poté prováděno pod UV světlem, kde lze barvivo navázané na molekuly DNA vizualizovat. Nejčastěji využívaným barvivem je ethidium bromid. Ten je ovšem považován za karcinogenní mutagen, a tak je při práci s ním především třeba dbát na bezpečnost (Lee et al., 2012). I přes zdravotní rizika je pro gelovou elektroforézu často využíván kvůli své excelentní citlivosti a cenové dostupnosti oproti jiným interkalačním barvivům (SYBR Green, GelRed)(Huang

et al., 2010). Interkalační barvivo je možné přidat do gelu již při jeho přípravě, případně hotový gel máčet v pufru s obsahem interkalačního činidla (Hoy et al., 1994). V jiných případech je možné obarvit vzorky DNA při jejich nanášení do gelu.

DNA ladder, nebo také velikostní marker, je spolehlivým ukazatelem velikostí molekul procházejících gelem. Jedná se o roztok, který se nanáší do gelu stejně jako ostatní vzorky. Obsahuje standardizovanou směs různě velkých fragmentů DNA, které poté slouží jako reference při posuzování velikostí separovaných fragmentů DNA z konkrétních vzorků (Šmarda et al., 2005). Komerčně se vyrábí různé typy a velikosti ladderů. Proto je důležité podle velikosti analyzovaných fragmentů DNA vybírat také konkrétní ladder.

Pod UV světlem (280-320 nm) se elektroforéza vyhodnocuje po vyjmutí gelu z elektroforetické vany. Cílové fragmenty DNA je možné z gelu vyříznout pro další molekulárně-biologické postupy. Běžně se gelová elektroforéza vyhodnocuje v počítačovém software, který udělá snímek gelu a umožňuje jeho vizualizaci. Na snímku jsou vidět fragmenty DNA, které obsahují molekuly konkrétní velikosti. Jejich velikost se dá odhadnout podle DNA ladderu. Také intenzita produktů vypovídá o množství fragmentů DNA ve vzorku. Pokud jsou fragmenty až téměř neviditelné, není zde přítomna dostatečná koncentrace DNA. To může značit nevhodné předchozí postupy, ať už se jedná o izolaci DNA, PCR nebo pouhé nevhodné nanesení vzorků do gelu. (Weaver, 2008)

3 Cíl práce

Cílem bakalářské práce je vyvinutí přesné a citlivé molekulární metody detekce hmyzu v potravinách, která bude moci být využita při dozoru nad dodržováním stanovených legislativních pravidel pro produkci hmyzu určeného k lidské spotřebě a výrobu potravin z hmyzu. Dosažení cíle práce zahrnuje selekci vhodné metody izolace DNA z larev *Tenebrio molitor* a její optimalizaci pro získání čisté a dostatečně koncentrované DNA. Následně má práce za cíl optimalizaci reakčního cyklu PCR pro spolehlivou detekci potměníka moučného v potravinách. Dalším cílem je ověření specifity metody diferenciací od larev *Zophobas morio*, které pocházejí ze stejné čeledi jako *Tenebrio molitor*, ale nejsou v Evropské Unii schváleny pro konzumaci. Hypotézou práce je, že produkty označené obsahem potměníka moučného uvádějí na obalu pravdivé informace a neobsahují jiné, nepovolené druhy hmyzu.

4 Metody a materiály

Experimentální část bakalářské práce byla provedena v laboratořích molekulární biologie a genetiky na Katedře genetiky a biotechnologií při Zemědělské a technologické fakultě Jihočeské Univerzity. Vedoucí práce je Ing. Dagmar Stehlíková, PhD.

4.1 Příprava vzorků

V experimentální části bakalářské práce bylo pracováno se vzorky pocházejícími ze 2 druhů hmyzu – *Tenebrio molitor* a *Zophobas morio*. Specifita metodiky pro detekci těchto druhů byla testována využitím vzorků v různé formě. V první části experimentu byla využita namletá moučka z obou druhů hmyzu (označení TM pro *Tenebrio molitor*, ZM pro *Zophobas morio*). Původ těchto vzorků byl zajištěn a zpracován doc. Ing. et Ing. Annou Adámkovou, Ph.D. z Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Dále bylo analyzováno pečivo s různým obsahem namleté hmyzí moučky. Na konci experimentu již byly pro detekci využity produkty s obsahem moučky z potměníka moučného, které jsou volně prodejně.

4.1.1 Pečivo s obsahem hmyzí moučky

Perník

Pro pečení perníku bylo využito: 400 g hladké mouky, 120 g moučkového cukru, 20 g prášku do pečiva, 5 g skořice, 5 g perníkového koření, 10 g moučky z potměníka moučného (TM), 15 g kakaa, 200 ml mléka, 200 ml vody, 120 ml oleje. Z těchto ingrediencí bylo vytvořeno těsto, které bylo pečeno 35 minut při teplotě 165 °C.

Běžné pečivo

Tabulka 4: Využitý recept na běžné pečivo

[g]	TM / ZM	Mouka	Voda	Cukr	Sůl	Droždí
1 %	0,5	49,5	55	0,93	0,75	0,9
2,5 %	1,25	48,75				
10 %	5	45				

4.1.2 Volně prodejné produkty s obsahem moučky z potměníka moučného

WormUP Křupaví červíci s příchutí česneku, chilli

Složení: sušené larvy potměníka moučného (96,7 %), sůl (2 %), česnek/chilli (1,3 %)

Proteinoví křupíci natural

Sušené larvy potměníka moučného



Obrázek 1: Křupaví červíci chilli



Farmerio čokoláda s červíky DARK LOW CARB

Složení: kakaové boby, kakaové máslo, larvy *Tenebrio molitor*

Obrázek 2: Hořká čokoláda s larvami potměníka moučného

Farmerio instantní rýžová kaše

Složení: rýže loupáná (84 %), kukuřičná kaše (2,5 %), hmyzí mouka z larev potměníka moučného (11,5 %), lyofilizované ovoce (2 %)



Obrázek 3: Rýžová kaše s moučkou z larev potměníka moučného

4.2 Izolace DNA

4.2.1 Magnetická izolace DNA

Proces magnetické izolace DNA je ve velké míře automatizován, jelikož je pracováno s robotickým izolátorem DNA MagCore od výrobce RBC Bioscience. Komerčně dodávaná kazeta obsahuje 14 zkumavkových stripů, přičemž deset z nich je zakryto z důvodu, že obsahují reagentie používané při izolaci. Ochranné folie na stripech se perforují až speciálním hrotem před přidáním vzorku, čímž se redukuje riziko kontaminace reagentií. DNA z lyzátu se během inkubace naváže na speciální magnetitové částice pokryté celulózą a silný magnet přitáhne částice ze suspenze

ke stěně zkumavky (krd.cz). Poté dochází k omytí kontaminantů díky vířivému proudění v promývací zkumavce.

Před vložením vzorku do automatického izolátoru nukleových kyselin je nutné vzorek připravit a provést několik předcházejících kroků. Tyto kroky se liší podle povahy biologického materiálu, ze kterého je DNA izolována. Protokoly k těmto postupům jsou dodávány výrobcem izolátoru, stejně jako používané reagenty. V rámci experimentu byly využity dva různé protokoly k přípravě vzorku, a to Solid Animal Tissue a Stool Sample.

Solid Animal Tissue protokol je určen pro izolaci DNA ze živočišných tkání.

Postup je následující:

- Z pečiva odebrat malé částice o hmotnosti okolo 30 mg a vložit je do mikrocentrifugační zkumavky.
- Přidat 400 µl GT pufru a 20 µl proteinázy K, promíchat vortexem.
- Inkubovat 90 minut při teplotě 55 °C do kompletní lyze vzorku.
- V případě viditelných nečistot převést vzorek přes Filter Column a centrifugovat 5 minut při maximální rychlosti.
- Suspenzi převést do Collection Tube.
- 400 µl čisté suspenze převést do Sample Tube.
- Vložit kazetu do automatického izolátoru, poté vložit vzorek v Sample Tube.
- Na obrazovce automatického izolátoru zvolit program 401.

Pro izolaci DNA ze vzorku stolice existuje protokol Stool Sample. V této bakalářské práci byl tento protokol vyzkoušen proto, že má důkladnější homogenizační a lytický postup. Ačkoliv se nejednalo o vzorky stolice, bylo se vzorky pečiva nakládáno následovně:

- Z pečiva odebrat vzorky o hmotnosti okolo 30 mg a vložit je do 2 ml mikrocentrifugační zkumavky.
- Do zkumavky přidat 2 kovové kuličky a nejprve nasucho ponechat v homogenizátoru po dobu 15 sekund při frekvenci 30 Hz.
- Přidat 1 ml TE pufru, opět homogenizovat 15 sekund při 30 Hz.
- Vzorek promíchat pomocí vortexu a centrifugovat 15 minut při 4000 otáčkách za minutu.
- Odstranit supernatant.
- Pelet rozpustit v 1,5 ml GT pufru.

-
- Promíchat pomocí vortexu po dobu jedné minuty.
 - Inkubovat 5 minut při 70 °C.
 - Promíchat pomocí vortexu 15 sekund, centrifugovat 1 minutu při 13000 otáčkách za minutu.
 - 400 µl supernatantu přenést do nové mikrocentrifugační zkumavky.
 - Přidat 20 µl proteinázy K, promíchat pomocí vortexu.
 - Inkubovat 2-3 hodiny při teplotě 60 °C.
 - Přelít přes Filter Column a centrifugovat 5 minut při 14000 otáčkách za minutu.
 - Pipetovat 400 µl suspenze do Sample Tube.
 - Vložit kazetu do automatického izolátoru, poté vložit vzorek v Sample Tube.
 - Na obrazovce automatického izolátoru zvolit program 401.

4.2.2 CTAB-PVP izolace DNA

Metody izolací DNA využívajících CTAB a PVP jsou sice primárně doporučovány k izolacím z rostlinných pletiv, ale u většiny druhů hmyzu může být tato metoda také efektivní (Hoy et al., 2013). Jelikož se pracuje s toxickými a dráždivými látkami, veškerá práce byla prováděna v digestoři.

- Připravit roztok 2 x PVP – CTAB a 1% merkaptoethanol s využitím 500 µl roztoku na jeden vzorek.
- Roztok předehřát na 65 °C.
- Z pečiva či produktu s hmyzí moučkou odebrat vzorek o přibližné hmotnosti 100 mg a vložit jej do 2ml mikrocentrifugační zkumavky.
- Do zkumavky přidat 2 kovové kuličky a nejprve nasucho ponechat v homogenizátoru po dobu 15 sekund při frekvenci 30 Hz.
- Přidat 500 µl předehřátého roztoku, opět homogenizovat 15 sekund při 30 Hz.
- Inkubovat 45 minut při teplotě 65 °C, každých 15 minut lehce promíchat.
- Přidat 500 µl směsi chloroform-IAA.
- 10 minut promíchávat, 5 minut centrifugovat při 12000 otáčkách za minutu.
- Do nových 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek odpipetovat vodnou fázi.
- Přidat 5% CTAB, přidané množství odpovídá 1/5 objemu vzorku.
- Promíchat, přidat 500 µl směsi chloroform-IAA.
- 10 minut promíchávat, centrifugovat 5 minut maximální rychlostí při pokojové teplotě.

-
- Do nových 1,5ml mikrocentrifugačních zkumavek odpipetovat vodnou fázi.
 - Přidat ledový isopropanol (2/3 objemu vzorku), až třikrát jemně promíchat.
 - Ponechat na noc v mrazu (-20 °C).
 - Centrifugovat 5 minut maximální rychlostí při teplotě 4 °C.
 - DNA vytvoří pelet, odstranit supernatant.
 - Přidat 300 µl 1x TE a 30-60 minut inkubovat při teplotě 37 °C.
 - Přidat 2 objemy ledového 96% ethanolu (asi 600 µl), jemně promíchat.
 - Ponechat na noc v mrazu (-20 °C).
 - Centrifugovat 10 minut maximální rychlostí při teplotě 4 °C.
 - DNA vytvoří pelet, odstranit supernatant.
 - Přidat 1 ml ledového 70% ethanolu, dvakrát až třikrát lehce promíchat.
 - Centrifugovat 2 minuty maximální rychlostí při teplotě 4 °C.
 - Odstranit všechnen supernatant, v případě nečistot tento krok opakovat.
 - Vzorky nechat dobře vysušit (maximálně 3 hodiny).
 - Rozpustit DNA ve sterilní vodě nebo 1x TE pufru při 37 °C po dobu 40 minut.

4.3 Polymerázová řetězová reakce

4.3.1 Gradientová PCR

Gradientová PCR sloužila k nalezení optimálních teplot annealingu jednotlivých primerů. K ověření výsledků byla použita pozitivní kontrola (vzorek obsahující DNA izolovanou z namletého hmyzu) a negativní kontrola (vzorek, u kterého byl 1 µl DNA nahrazen vodou). Pro každý vzorek byla v termocykleru nastavena jiná teplota fáze annealingu. Vyhodnocení proběhlo pomocí snímku gelové elektroforézy.

Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 25 µl):

- 12,5 µl Master Mixu One Taq® Hot Start Quick-Load®
- 9,5 µl PCR Ultra H₂O Top-Bio
- 1 µl forward primeru
- 1 µl reverse primeru
- 1 µl templátové DNA

Tabulka 5: Sekvence využitých primerů

Druh hmyzu	Cílový gen	Primer	Sekvence (5'→3')	Velikost amplikonu
<i>Tenebrio molitor</i>	16S <i>rRNA</i>	Forward	CAAAGGTAGCATAATCATTAGT	240 bp
		Reverse	AGTTAAATAAATTTTCTAACCG	
<i>Zophobas morio</i>	<i>COI</i>	Forward	GGGCATCAGTCGATCTCGCA	120 bp
		Reverse	CGATCAAAAGTTATTCCTTGTGG	

(Tramuta et al., 2018)

Gradientová PCR byla provedena v termocykleru (Biometra, DE) s nastavením reakčního protokolu popsaného v tabulce č. 7. Konkrétní teploty gradientu annealingu byly: 52,5 °C; 55 °C; 56 °C, 58 °C, 59 °C, 60,3 °C. Pozitivní a negativní kontroly prošly reakcí s annealingem při teplotě 56 °C.

Tabulka 6: Reakční protokol gradientové PCR

Fáze reakce	Teplota	Čas	Cyklus
Počáteční denaturace	94 °C	5 minut	1x
Denaturace	94 °C	1 minuta	40x
Annealing	Gradient teplot 52,5-60,3 °C	30 sekund	
Elongace	68 °C	1 minuta	
Finální elongace	68 °C	5 minut	1x
Chlazení	4 °C	∞	1x

4.3.2 PCR se vzorky z pečiva a produktů

U všech vzorků (perník, kynuté, nekynuté pečivo, volně prodejné produkty) byla provedena PCR s použitím konkrétních primerů z tabulky ##. Teplota annealingu v reakčním protokolu byla optimalizací stanovena na 55 °C. K provedení reakce byl opět použitý termocykler Biometra (DE).

Složení reakční směsi pro 1 vzorek (celkem 25 µl):

- 12,5 µl Master Mixu One Taq® Hot Start Quick-Load®
- 9,5 µl PCR Ultra H₂O Top-Bio
- 1 µl forward primeru
- 1 µl reverse primeru
- 1 µl templátové DNA

Tabulka 7: Reakční protokol PCR

Fáze reakce	Teplota	Čas	Cyklus
Počáteční denaturace	94 °C	5 minut	1x
Denaturace	94 °C	1 minuta	40x
Annealing	55 °C	30 sekund	
Elongace	68 °C	1 minuta	
Finální elongace	68 °C	5 minut	1x
Chlazení	4 °C	∞	1x

4.4 Gelová elektroforéza

Vyhodnocení veškerých PCR reakcí bylo provedeno pomocí gelové elektroforézy. Elektroforéza probíhala na 2% agarózovém gelu. Agarózový prášek (2 g) byl převeden do 100 ml 1x TBE pufru a povařen do úplného rozpuštění. Gel byl poté ochlazen a obohacen o 3 µl ethidium bromid. Takto připravený gel byl nalit do nalévací vany s hřebínky, kde tuhnul přibližně 45 minut. Poté byl umístěn do elektroforetické vany a byly do něj napipetovány vzorky. Mimo vzorky byl použit i 100 bp DNA ladder (NEB, UK) pro jednoduché vyhodnocení. Elektroforéza probíhala 40 minut při napětí 120 V v prostředí 1x TBE pufru. Gel byl následně vyfocen a posuzován pomocí UV přístroje InGenius 3 (SynGene, UK).

5 Výsledky

5.1 Izolace DNA

5.1.1 Magnetická izolace DNA

Tabulka 8: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných protokolem Solid Animal Tissue

Vzorek	Koncentrace NK [ng/μl]	OD 260/280	OD 260/230	OD 260	OD 280	OD 230
10 % ZM	643,14	0,95	0,34	24,238	24,928	49,237
10 % TM	807,24	1,03	0,28	24,466	24,033	65,795
10 % MIX	743,17	1,03	0,31	25,746	25,307	59,359
2,5 % ZM	606,39	1,02	0,26	18,328	18,137	53,435
2,5 % TM	774,06	1,03	0,25	24,595	24,198	70,198
2,5 % MIX	569,73	1,04	0,27	17,450	16,991	48,899
PERNÍK A	641,80	1,02	0,36	33,809	33,553	56,571
PERNÍK B	807,84	1,03	0,30	38,734	38,294	76,555

Poměry absorbancí 260/280 by se měly pohybovat okolo 2. U vzorků se hodnoty nacházely v intervalu od 0,95 do 1,04. Průměrná hodnota OD 260/280 byla 1,02. Optimální hodnota OD 260/230 by se měla pohybovat okolo 1,8. Hodnoty u vzorků se nacházely v intervalu od 0,25 do 0,36, s průměrnou hodnotou 0,296. Byly naměřeny vysoké koncentrace totální DNA, ale směrodatnost těchto výsledů nekoresponduje s čistotou DNA (OD 260/280 a OD 260/230). Mezi jednotlivými vzorky s odlišným obsahem moučky z potměníka moučného nebyly nalezeny významné rozdíly.

Tabulka 9: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných protokolem Stool Sample

Vzorek	Koncentrace NK [ng/μl]	OD 260/280	OD 260/230	OD 260	OD 280	OD 230
10 % ZM	9,44	2,32	-0,83	0,008	-0,100	-0,409
10 % TM	22,57	2,26	-3,81	0,294	0,042	-0,275
10 % MIX	18,86	2,25	-3,70	0,293	0,084	-0,186
2,5 % ZM	13,47	2,67	-1,54	0,083	-0,086	-0,361
2,5 % TM	31,47	2,35	-39,42	0,437	0,076	-0,208
2,5 % MIX	17,45	2,85	-2,40	0,146	-0,080	-0,348
PERNÍK A	7,98	8,19	-1,01	-0,059	-0,199	-0,377
PERNÍK B	5,75	27,02	-0,54	-0,094	-0,205	-0,423

Koncentrace totální DNA u vzorků je na hranici citlivosti přístroje NanoDrop. Poměry absorbancí 260/280 se u vzorků z pečiva pohybovaly od 2,25 do 2,85, s průměrnou hodnotou 2,45. Některé absorbance nabývaly záporných hodnot, což ukazuje chybu v měření. U vzorků z perníku byly naměřeny nesprávné hodnoty absorbancí.

5.1.2 CTAB-PVP izolace DNA

Tabulka 10: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných z pečiva metodou CTAB-PVP

Vzorek	Koncentrace NK [ng/μl]	OD 260/280	OD 260/230	OD 260	OD 280	OD 230
10 % ZM	228,73	1,97	1,49	5,523	3,271	4,014
10 % TM	199,41	2,04	1,94	4,166	2,133	2,230
10 % MIX	255,48	2,05	1,80	5,303	2,688	3,039
2,5 % ZM	140,45	2,09	1,90	2,855	1,391	1,522
2,5 % TM	258,46	2,07	2,01	5,245	2,568	2,646
2,5 % MIX	147,98	2,10	2,06	3,031	1,483	1,511
1 % ZM	60,73	2,54	1,23	1,651	0,914	1,423
1 % TM	40,19	2,42	1,98	1,257	0,785	0,859
1 % MIX	24,49	2,38	1,99	0,432	0,148	0,188
PERNÍK A	55,80	2,07	1,73	1,105	0,529	0,635
PERNÍK B	53,70	1,89	0,98	1,235	0,729	1,261

Poměry absorbancí 260/280 se nacházely v intervalu od 1,89 do 2,54, s průměrnou hodnotou 2,15. Naměřené poměry absorbancí 260/230 byly intervalu od 0,98 do 2,06, s průměrnou hodnotou 1,74.

Vzorky obsahovaly 10 %, 2,5 % nebo 1 % moučky z potemníka moučného, potemníka brazilského nebo obou. Vysoké koncentrace byly naměřeny u vzorků s 10% a 2,5% obsahem hmyzí moučky. U 1% obsahu hmyzí moučky byla totální koncentrace nukleových kyselin nižší. To platí i pro vzorky, které byly izolovány z perníku.

Tabulka 11: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných z produktů s obsahem larev potemníka moučného metodou CTAB-PVP

Vzorek	Koncentrace NK [ng/μl]	OD 260/280	OD 260/230	OD 260	OD 280	OD 230
KAŠE HOTOVÁ 1	206,16	2,10	1,86	4,333	2,178	2,430
KAŠE HOTOVÁ 2	238,70	2,07	1,92	5,009	2,541	2,718
KAŠE SYPKÁ 1	196,35	2,05	1,78	4,216	2,204	2,501
KAŠE SYPKÁ 2	231,56	2,08	1,75	5,002	2,600	3,021
ČOKOLÁDA 1	225,68	2,07	1,95	4,669	2,336	2,474
ČOKOLÁDA 2	207,48	2,04	1,59	4,647	2,533	3,103
KČ ČESNEK 1	96,32	2,16	2,42	1,960	0,923	0,830
KČ ČESNEK 2	163,35	2,22	2,25	3,268	1,469	1,452
KČ CHILLI 1	150,03	2,21	2,44	2,955	1,310	1,187
KČ CHILLI 2	134,43	2,21	2,41	2,705	1,231	1,133

U vzorků izolovaných z produktů obsahujících larvy potemníka moučného se OD 260/280 pohybovala v intervalu od 2,04 do 2,22, s průměrnou hodnotou 2,12. Hodnoty OD 260/230 se nacházely v intervalu od 1,75 do 2,44 a průměrná hodnota byla 2,04. Koncentrace totální DNA byly vysoké, s průměrnou hodnotou 217,7 ng/μl.

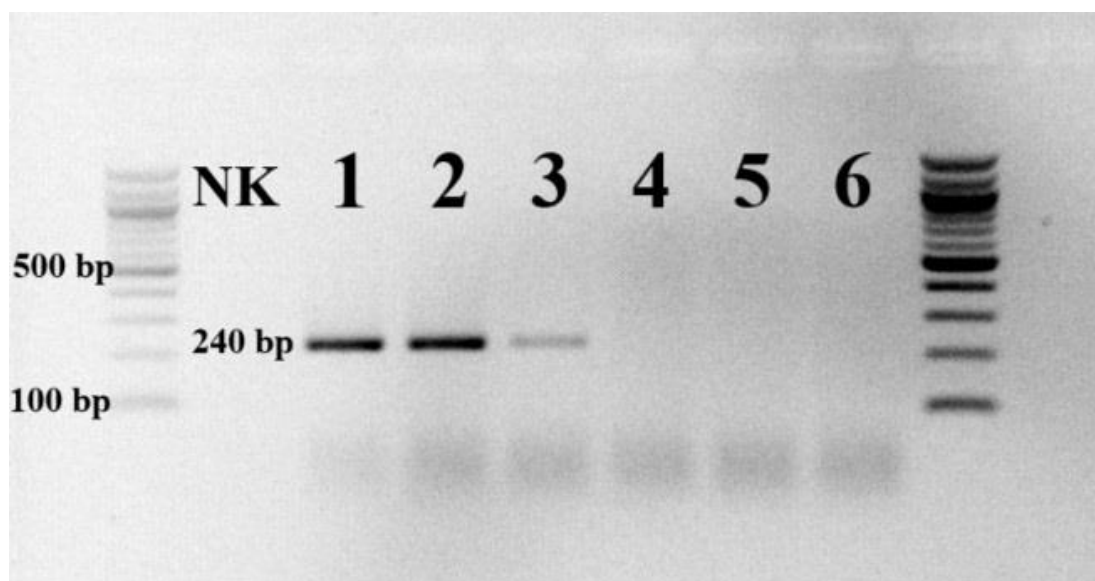
5.2 PCR a gelová elektroforéza

5.2.1 Gradientová PCR

Při gradientové PCR pro zjištění optimální teploty annealingu konkrétních primerů bylo využito 6 teplot v intervalu od 52,5 °C do 60,3 °C. Pro ověření správnosti byl využit vzorek s negativní kontrolou.

Obrázek 4: Gradient teplot annealingu u *Tenebrio molitor*. Využité teploty:

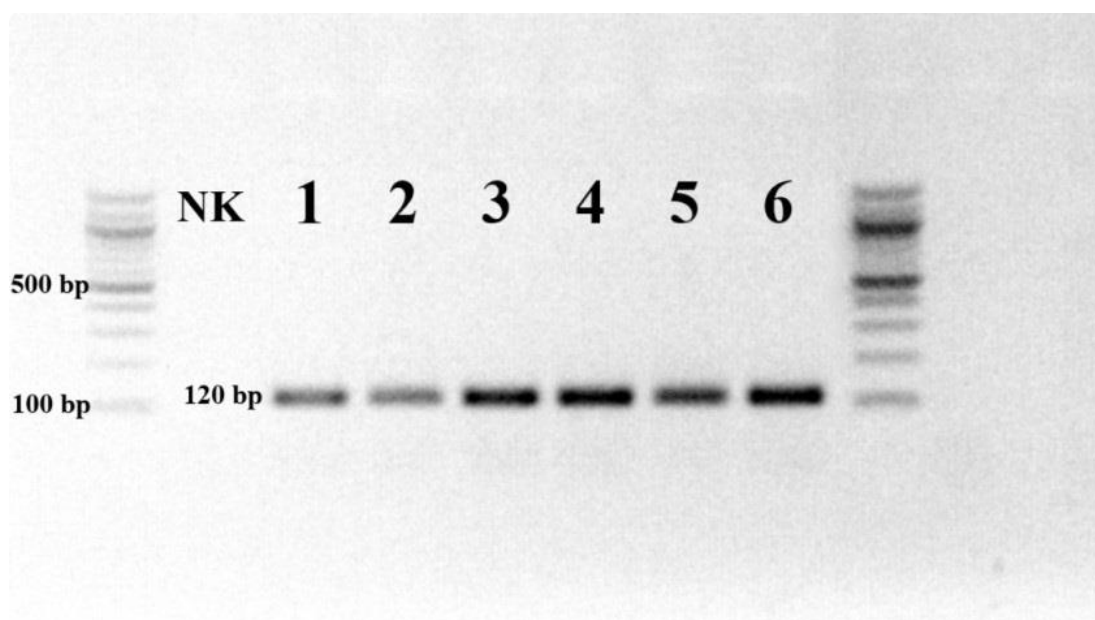
1 – 52,5 °C; **2** – 55 °C; **3** – 56 °C; **4** – 58 °C; **5** – 59 °C; **6** – 60,3 °C



Teplotní optimum annealingu primerů pro *Tenebrio molitor* nejlépe odpovídalo teplotám 52,5 °C a 55 °C. Při teplotě 56 °C byl fragment méně viditelný a při vyšších teplotách nasedání primerů vůbec neproběhlo.

Obrázek 5: Gradient teplot annealingu u *Zophobas morio*. Využité teploty:

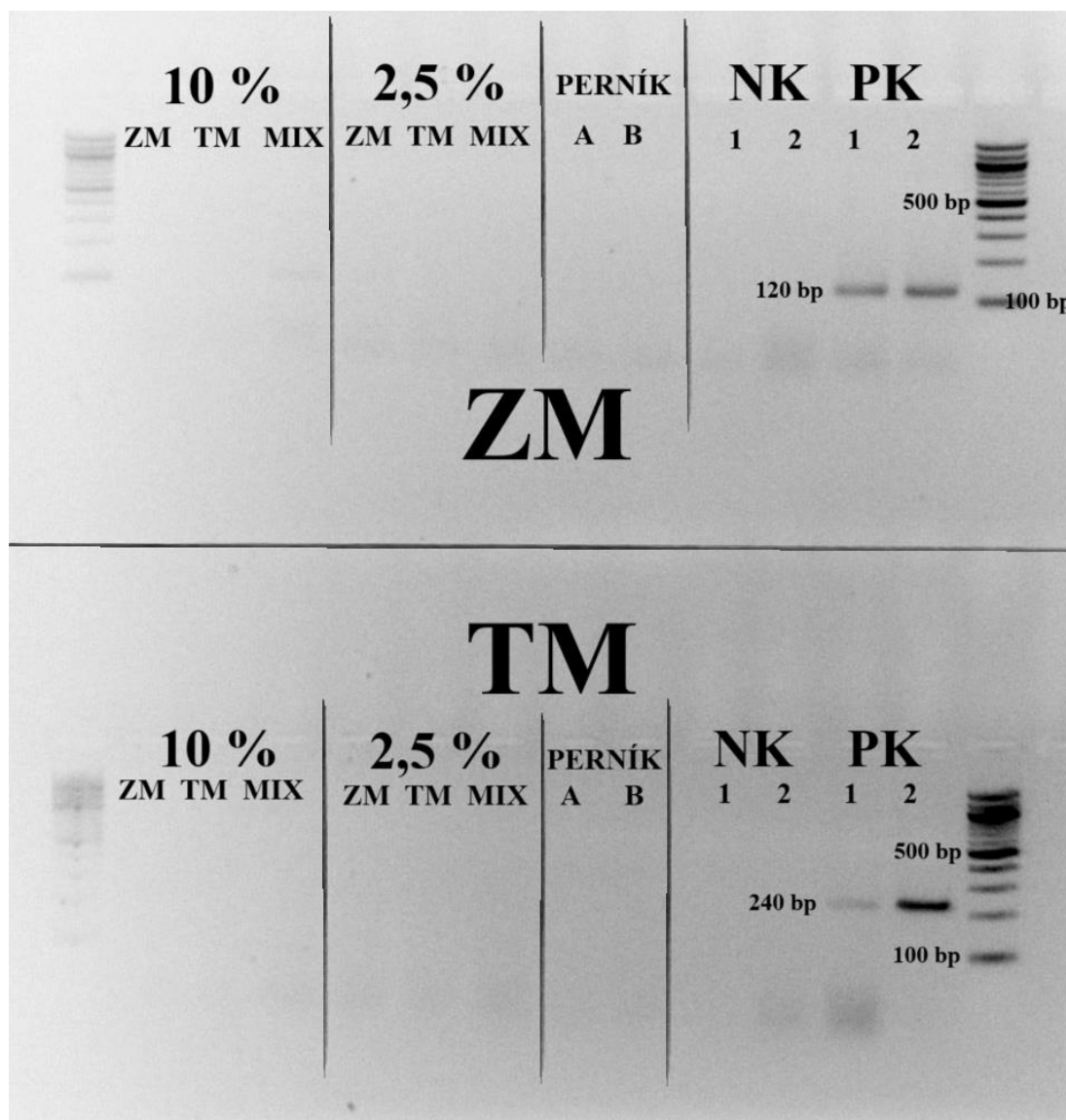
1 – 52,5 °C; **2** – 55 °C; **3** – 56 °C; **4** – 58 °C; **5** – 59 °C; **6** – 60,3 °C



Primery pro *Zophobas morio* nasedaly na templát při všech využitých teplotách. K nejintenzivnější amplifikaci došlo při teplotách 56 °C, 58 °C, 59 °C a 60,3 °C. Fragменты u teplot 52,5 °C a 55 °C byly slabší, ale stále využitelné pro další analýzy.

5.2.2 Magnetická izolace DNA

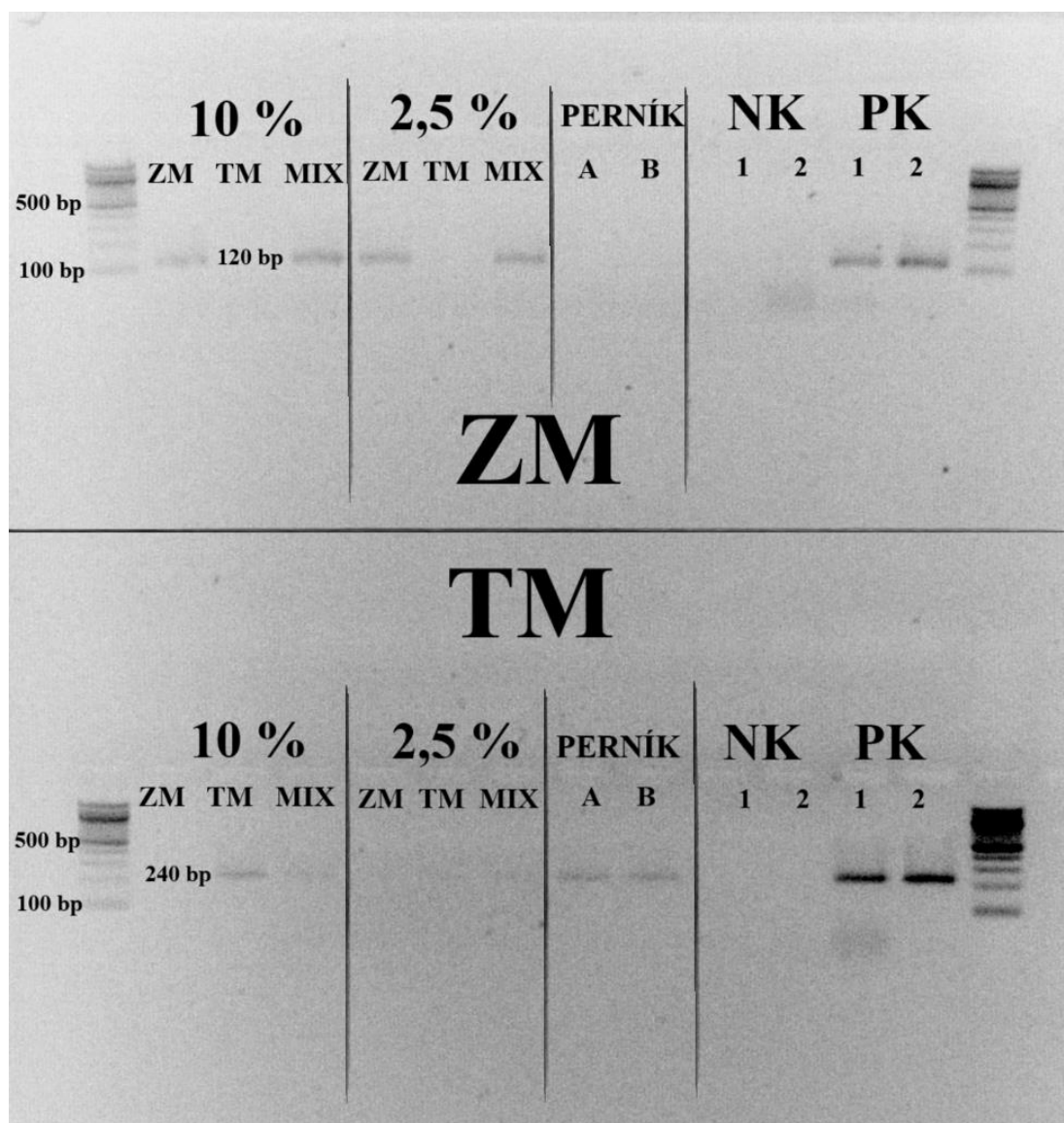
Obrázek 6: Magnetická izolace DNA pomocí protokolu Solid Animal Tissue. Horní část: využití primery pro *Zophobas morio*; Dolní část: využití primery pro *Tenebrio molitor*



Protokolem Solid Animal Tissue byly vyhodnocovány vzorky pečiva s obsahem hmyzí moučky. Vzorky s obsahem potměníka brazilského jsou označeny ZM, vzorky s obsahem potměníka moučného TM. Perník obsahoval pouze moučku potměníka moučného.

PCR neproběhla úspěšně, u většiny vzorků vůbec nedošlo k amplifikaci. Pouze u 10% MIX je u ZM slabý fragment s DNA o přibližné velikosti 120 bp. Mimo to proběhla reakce pouze u negativní a pozitivní kontroly.

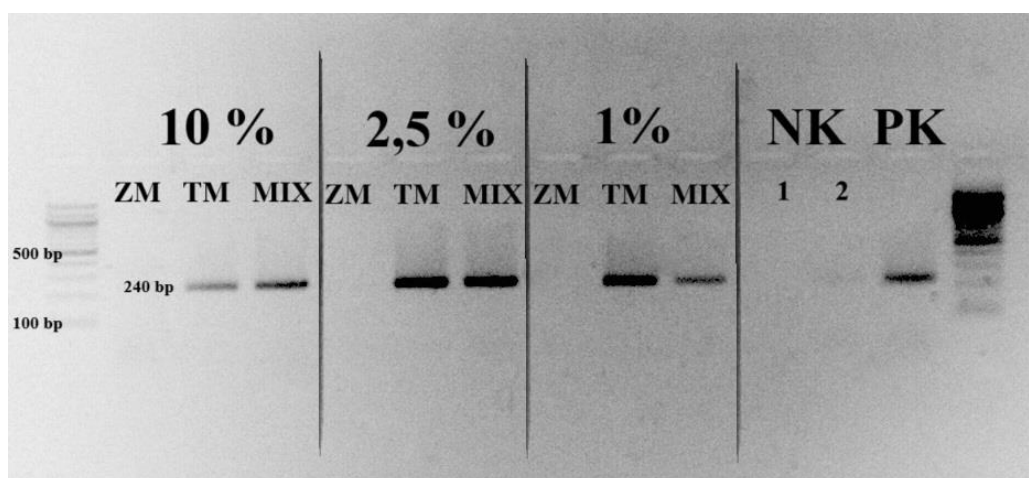
Obrázek 7: Magnetická izolace DNA pomocí protokolu Stool Sample. Horní část: využití primery pro *Zophobas morio*; Dolní část: využití primery pro *Tenebrio molitor*



Protokolem Stool Sample byla izolována DNA ze stejného pečiva jako u Solid Animal Tissue. U ZM primerů byly výsledky pozitivní. Fragmenty DNA o velikosti 120 bp se nacházely ve vzorcích, které obsahovaly ZM. Fragmenty byly ale poměrně slabé, indikující nedostatečnou amplifikaci cílového úseku DNA. Slaběji viditelné byly i výsledky dosažené s využitím TM primerů. U 10% obsahu hmyzí moučky byly fragmenty DNA o velikosti 240 bp mírně viditelné, u 2,5% obsahu nebyly vidět téměř vůbec. Došlo tedy k minimální amplifikaci. U perníku byly výsledky také slabé, zatímco pozitivní kontrola byla velice výrazná.

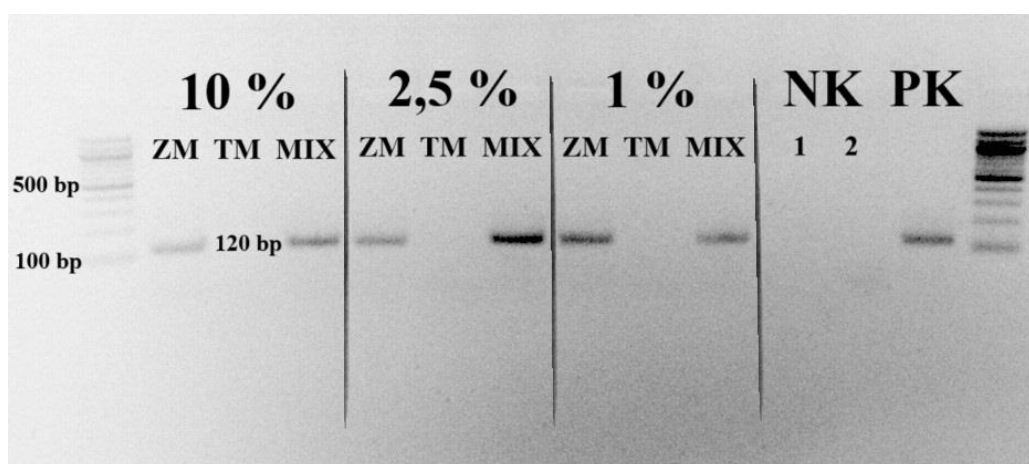
5.2.3 CTAB-PVP izolace DNA

Obrázek 8: Izolace DNA ze vzorků běžného pečiva metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro *Tenebrio molitor*



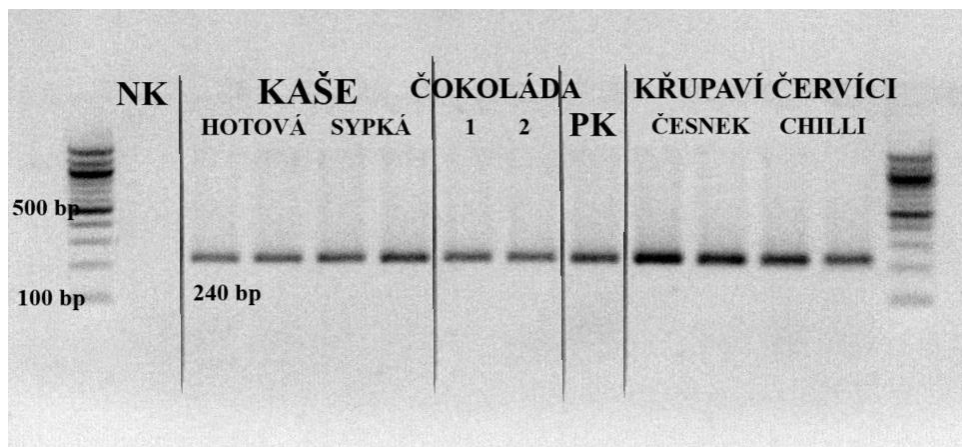
Metodou CTAB-PVP byla izolována DNA ze vzorků pečiva s 10%, 2,5% a 1% obsahem hmyzí moučky. Za použití primerů pro TM bylo dosaženo pozitivních výsledků pro vzorky s obsahem moučky z potměníka moučného. Fragmenty DNA o velikosti 240 bp byly dostatečně silné a viditelné. PCR byla úspěšná, došlo k amplifikaci cílového úseku DNA u všech žádoucích vzorků. Negativní a pozitivní kontroly sloužily k ověření výsledků.

Obrázek 9: Izolace DNA ze vzorků běžného pečiva metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro *Zophobas morio*



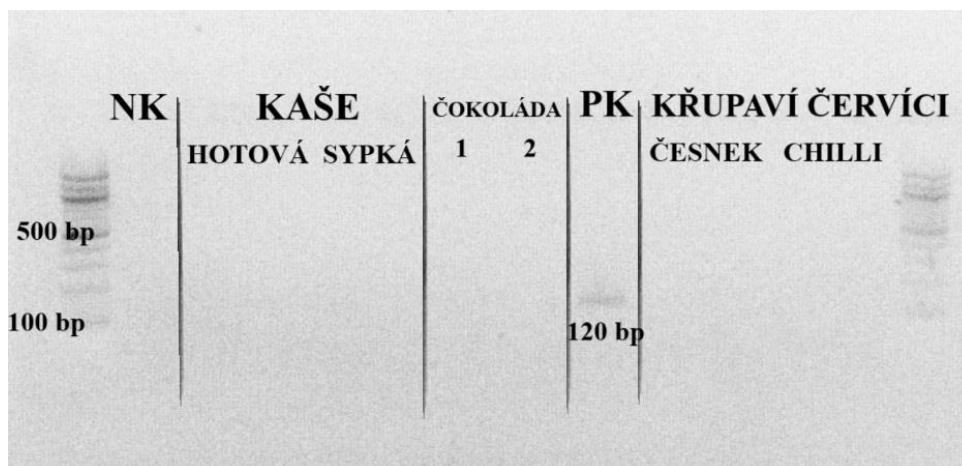
PCR s primery pro ZM vyšla také úspěšně. Na gelu byly vizualizovány fragmenty DNA o velikosti 120 bp u vzorků, které obsahovaly moučku z potměníka brazilského, a to i při 1% obsahu moučky.

Obrázek 10: Izolace DNA z produktů obsahujících larvy *Tenebrio molitor* metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro *Tenebrio molitor*



Při využití TM primerů došlo k amplifikaci u všech vzorků, které obsahovaly potměníka moučného. Malinová kaše byla u dvou vzorků využita v sypkém stavu, pro druhé dva vzorky byla připravena podle návodu. Čokoláda s larvami byla testována ve dvou vzorcích. Vzorek č. 2 obsahoval více čokolády než vzorek č. 1. Výsledky u obou vzorků byly bez rozdílu. Křupaví červíci také vykazovali pozitivní výsledky, bez ohledu na využití koření.

Obrázek 11: Izolace DNA z produktů obsahujících larvy *Tenebrio molitor* metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro *Zophobas morio*



Využití primerů pro ZM prokazuje správnost údajů na obalech výrobků. Při výrobě těchto produktů nebyly využity larvy potměníka brazilského. Pro ověření správnosti slouží pozitivní kontrola. Jiné fragmenty DNA u ostatních vzorků nebyly při PCR amplifikovány.

5.3 Shrnutí

Při gradientové PCR pro optimalizaci annealingu primerů pro TM i ZM nejlepší amplifikace proběhla při annealingu okolo 55 °C.

Výsledkem magnetické extrakce DNA pro postup Solid Animal Tissue byla sice vysoká koncentrace totální DNA, ale zároveň nesprávné hodnoty OD určující čistotu DNA. Při PCR u těchto vzorků amplifikace vůbec neproběhla a gelovou elektroforézou je nešlo vizualizovat.

Magnetickou extrakcí DNA s protokolem Stool Sample se podařilo izolovat DNA ze vzorků pečiva a perníku, ale celková DNA ve vzorcích byla velice nízká a hodnoty OD byly na přístroji NanoDrop neměřitelné. Při PCR u vzorků došlo k velmi slabé amplifikaci a fragmenty bylo možné vizualizovat na gelu. Intenzita amplifikace ovšem byla nedostatečná. Výsledky byly stejné pro jednotlivé vzorky s odlišným množstvím hmyzím moučky (10 %, 2,5%, 1%).

Všechny vzorky izolované metodou CTAB-PVP nabývaly vysoké koncentrace totální DNA. DNA ve vzorcích byla čistá a nekontaminovaná. Při PCR reakci primery nasedaly na správné místo a amplifikace proběhla v dostatečné intenzitě, a to i u vzorků s 1% obsahem hmyzí moučky. Na gelu bylo možné vizualizovat fragmenty DNA a posoudit, zda daná potravina obsahuje potměníka moučného nebo potměníka brazilského.

6 Diskuse

V současné době představuje konzumace hmyzu nadějnou cestu k jednoduchému a nízkonákladovému využití živočišných produktů, na které zatím nejsou obyvatelé Evropy zvyklí (Siemianowska et al., 2013). Potemník moučný už zde není vnímán jen jako skladištní škůdce a krmivo pro domácí či exotická zvířata, ale také jako zajímavý alternativní zdroj proteinů a jiných živin pro člověka. Přínosům a limitům entomofagie se věnuje spousta studií, které řeší zejména zdravotní aspekty a rizika konzumace hmyzu. Chemickou bezpečností hmyzu se zabývají Meyer et al. (2021), kteří rozebírají rozsah bioakumulace těžkých kovů v larvách konzumovaného hmyzu a obsah dalších kontaminantů, které ovšem podle autorů nepředstavují významné bezpečnostní riziko při konzumaci. Jako nadějnou a bezpečnou potravinu budoucnosti shledává hmyz například Conway et al. (2024).

Na mezery v autentičnosti a bezpečnosti potravin z hmyzu objektivně poukazuje komplexní studie od Traynor et al. (2024). Po extenzivním výzkumu literatury, trhu s hmyzími produkty a rozhovory s klíčovými zainteresovanými stranami autoři varují před možným podvodným jednáním v této oblasti v zájmu finančního obohacení těchto stran. Jako podvodné jednání se shledává například nepřesné a zavádějící označení produktů, náhrada složek produktu, nevhodná dokumentace nebo nedodržení hygienických podmínek chovu hmyzu. K lednu 2024 (Traynor et al., 2024) nebyla v EU detekována žádná podvodná aktivita na trhu s hmyzími produkty. I přesto je nutné věnovat se otázce dozoru nad těmito potravinami. Sušené larvy potemníka moučného se na evropském trhu objevují s průměrnou cenou 46 euro/kg (Ortiz et al., 2016). Mnohem levnější alternativu by mohly představovat sušené larvy potemníka brazilského, které ale nejsou oficiálně schváleny v EU jako potravina.

Cílem práce bylo nalezení vhodné a jednoduché metody detekce potemníka moučného v potravinách a jeho diferenciaci od podobného, ale nepovoleného hmyzu, která by mohla přispět k ulehčení dozoru nad dodržováním stanovených legislativních pravidel pro produkci hmyzu určeného k lidské spotřebě. V práci byla nejprve optimalizována molekulární metoda pro detekci těchto dvou druhů hmyzu na vlastních vzorcích. Poté byly testovány produkty s obsahem larev potemníka moučného uvedené na trh. Hypotéza práce hovoří o tom, že obaly produktů uvádějí správné informace a produkty opravdu obsahují hmyz povolený ke konzumaci.

Molekulární metody poskytují silné a přesné nástroje pro identifikaci živočišných i rostlinných příměsí v potravinách. Většina z metod aplikovaných pro identifikaci jednotlivých druhů hmyzu je založena na analýze nukleových kyselin (Daniso et al., 2020). Jedním z cílů práce byla optimalizace metody izolace DNA. Ideální metoda by měla být citlivá, přesná, jednoduchá a levná. Výsledná DNA by měla být především čistá a neponičená, aby byla využitelná pro další analýzu. Velké množství autorů pro izolaci DNA *Tenebrio molitor* využili komerční kity, které jsou sice nákladnější, ale poskytují přesné a rychlé výsledky. Oppert et al. (2023) využili k izolaci DNA z larev potměníka moučného Insect DNA Kit od firmy Omega BioTek (USA). Dovedli izolovat gDNA o průměrné velikosti větší než 50 kbp, vhodnou pro long-read sekvenování. Pro genomické analýzy izolovali úspěšně DNA potměníka také Eriksson et al. (2020), a to kitem DNeasy Blood & Tissue od firmy Qiagen (DE). Vstupním materiálem pro tyto postupy byly různé části těla dospělého potměníka moučného. Kit od firmy Qiagen (DE) použili i Daniso et al. (2020) při detekci *Gryllodes sigillatus* v potravinách. Při Real-Time PCR detekci autoři shledali, že u stejného množství izolované hmyzí DNA získali odlišné signály, které závisely především na způsobu technologického zpracování suroviny a případné přítomnosti inhibitorů.

Problém detekce potměníka moučného v potravinách spočívá v odlišnosti vstupního materiálu při izolaci DNA. V analyzované potravíně se nenachází jen larvy potměníka, ale spousta dalších ingrediencí, jejichž složení by mohlo s izolací DNA interferovat. Jednou z analyzovaných potravin v této práci byla hořká čokoláda s obsahem sušených larev potměníka moučného. Vysoký obsah polysacharidů a fenolických látek v kakaových bobech a čokoládě přirozeně inhibuje PCR reakci (Haymes et al., 2004). De Oliveira et al. (2022) proto vybírali nejvhodnější metodu izolace DNA z čokolády pro Real-Time PCR. Nejlepších výsledků dosahovala metoda CTAB. V této práci byla z čokolády úspěšně izolována DNA potměníka moučného pomocí CTAB-PVP a následná PCR reakce byla také úspěšná.

První pokusy o izolaci DNA ze vzorků pečiva s hmyzem byly realizovány pomocí robotického izolátoru MagCore. Nejprve byl využit protokol Solid Animal Tissue, který byl vybrán pro optimální využití k izolaci DNA ze živočišných tkání. Izolace se nepodařila. Na NanoDropu byly sice u vzorků naměřeny vysoké koncentrace nukleových kyselin, ale čistota DNA byla velice nízká, a tak lze předpokládat kontaminaci. Tento postup byl shledán jako nedostatečný. Za neúspěchem mohla stát nedostatečná homogenizace a inkubace vzorku.

Druhý MagCore protokol byl Stool Sample, určený pro izolaci DNA ze vzorků stolice. K izolaci DNA ze stolice je potřeba důkladnější postup, protože stolice je komplexní materiál obsahující vlákninu, mikroorganismy a nukleázy, které by mohly izolaci DNA negativně ovlivnit (McOrist et al., 2002). Tento postup zahrnoval mimo jiné důkladnou homogenizaci pomocí kovových kuliček v třepacím homogenizátoru a až tři hodiny inkubace při 60 °C. Výsledky byly lepší než u protokolu Solid Animal Tissue. DNA se podařilo izolovat, avšak s velice nízkou koncentrací. Při měření na NanoDropu se poměr OD 260/230 dostával do záporných hodnot, což naznačuje nesprávné měření vzorků a indikuje možnou hranici citlivosti přístroje.

Debode et al. (2017) izolovali z výrobků s obsahem potměníka moučného genomickou DNA pomocí metody CTAB popsané v mezinárodním standardu ISO 21571 (2005). V této práci byla také použita metoda založená na CTAB, s odlišností v kombinaci s PVP, který se váže na polyfenolické látky a usnadňuje tak izolaci DNA (Schenk et al., 2023). Touto metodou bylo možné bez problému izolovat hmyzí DNA z různých vstupních materiálů, jako je kynuté a nekynuté pečivo, perník, rýžová kaše a čokoláda. Provedení metody bylo ale velice pomalé. Izolace trvala celkem 3 dny, což není aplikovatelné pro větší laboratorní provozy. S odhlédnutím od rychlosti metoda CTAB-PVP vykazovala vysoké výtěžky DNA. V některých případech vzorky DNA bylo potřeba pro PCR reakci zředit. Naměřené hodnoty optické density na NanoDropu odpovídaly optimu. Výhodou metody je mimo vysokou výtěžnost i nízká cena. V této práci byla tato metoda shledána jako optimální pro izolaci DNA larev potměníka moučného a potměníka brazilského. Optimálních výsledků dosahuje tato metoda v publikaci od Marien et al. (2022) i při izolaci DNA potměníka stájového, což je další druh hmyzu povolený ke konzumaci v EU.

Jako referenční metoda pro identifikaci různých druhů hmyzu v potravinách se nabízí metoda Real-Time PCR (Köppel et al., 2018; Debode et al., 2017). Podle Köppel et al. (2018) zejména proto, že se hmyz může v potravinách vyskytovat také jako kontaminant. Kvantifikační analýza by mohla pomoci odlišit běžnou kontaminaci od zamýšleného přídatku hmyzu do potravin. Tato práce je zaměřena zejména na specifickou detekci a ověření správnosti údajů na obalu výrobku, proto nebyla kvantitativní analýza nutná a byla využita PCR reakce bez modifikací.

Limit PCR metody jako detektoru hmyzu v potravinách je zejména její rychlost a fixace na podmínky laboratorního prostředí. Navázáním na tuto práci by mohlo být vyvinutí metody detekce potměníka moučného v potravinách metodou LAMP, která

je velice přesná, specifická, sensitivní a rychlá. Metoda LAMP využívá izotermické DNA polymerázy, která dokáže disociovat a posouvat vznikající vlákno a speciálně navržené smyčkové primery. Amplifikace probíhá při konstantní teplotě (60-65 °C), proto se dá provádět v terénu. To by v praxi zajistilo rychlou detekci v prostředí. (Wong et al., 2017).

Zhu et al. (2023) například vyvinuli sensitivní LAMP metodu detekce *Hermetia illucens*, jejíž provedení od odběru vzorku do výsledku trvá pouhých 60 minut. Optimalizaci LAMP metody k detekci potměníka moučného v potravinách by se dalo věnovat pro dosažení cílů této práce v navazující diplomové práci.

Metodu Real-Time PCR k detekci potměníka moučného využili Debode et al. (2017), kteří se věnovali návrhu vhodných primerů. Autoři navrhli jednotlivé páry primerů ohraničující 87 bp dlouhý úsek DNA na dvou cílových genech - *wingless* a *cadherin*. Poté testovali jejich specifitu oproti necílové DNA. Primery na *wingless* genu nevykazovaly žádnou nespecifitu. Primery na *cadherin* genu ovšem vykazovaly pozitivní signál pro hmyz *Zophobas morio* a *Bombyx mori*, a také pro korýše *Gammarus sp.*

V této práci byla specifita reakce testována oproti *Zophobas morio*, který patří do stejné čeledi jako *Tenebrio molitor*. Byly využity primery podle Tramuta et al. (2018), kteří optimalizovali multiplex PCR metodu pro detekci devíti druhů konzumovaného hmyzu. U *Tenebrio molitor* bylo cíleno na gen *16S rRNA* s velikostí amplikonu 240 bp. U *Zophobas morio* bylo cíleno na gen *COI* s velikostí amplikonu 120 bp. Primery pro TM nasedaly na templát nejlépe při teplotě 52,5 °C a 55 °C, přičemž Tramuta et al. (2018) uvádí optimum 55 °C. Stejně optimum uvádí i pro primery pro ZM, které v praktické části této práce nasedaly na templát dobře při všech využitých teplotách při optimalizaci.

V následujících PCR postupech byla využita teplota denaturace 94 °C, teplota annealingu 55 °C a teplota elongace 68 °C. U magnetické izolace s protokolem Solid Animal Tissue byly výsledky PCR negativní, následnou elektroforézou se nepovedlo vizualizovat DNA na gelu. Lze tedy předpokládat, že cílové úseky DNA nebyly amplifikovány, a metoda izolace tak není vhodná pro tento účel. U vzorků DNA izolovaných protokolem Stool Sample byla i přes neuspokojivé výsledky kvantifikace na NanoDropu provedena PCR a gelová elektroforéza, kde byly vizualizovány slabě viditelné fragmenty DNA o odpovídajících velikostech 120 bp pro ZM a 240 bp pro TM. K amplifikaci tedy došlo, ale nebyla tolik intenzivní. Porovnáním

s protokolem Solid Animal Tissue vyšlo najevo, že protokol Stool Sample je sice pro tuto izolaci DNA vhodnější, ale slabá vizualizace by nemohla být využita při doзору nad dodržováním legislativy v potravinářství.

Metoda CTAB-PVP představuje nadějný postup pro izolaci DNA hmyzu z potravin. PCR byla po optimalizaci annealingu a správné reakční směsi úspěšná ve všech případech, ať už se jednalo o vzorky pečiva nebo instantní rýžové kaše. Gelovou elektroforézou se povedlo vizualizovat výrazné fragmenty o odpovídajících velikostech pro oba druhy hmyzu. Testováním volně prodávajících produktů lze zamítnout využití nepovoleného potměníka brazilského v konkrétních potravinách, a naopak potvrdit hypotézu této práce a správnost údajů na obalu výrobků, které obsahují larvy potměníka moučného.

Závěr

V této bakalářské práci se úspěšně podařilo optimalizovat přesnou a spolehlivou metodu detekce potměníka moučného v potravinách. DNA byla izolována z usmrčených larev potměníka, a dále z produktů, které larvy obsahovaly (běžné pečivo, perník, rýžová kaše, čokoláda). Specifická reakce byla testována proti larvám potměníka brazilského, který patří do stejné čeledi *Tenebrionidae*.

Jako vhodnou metodu izolace DNA lze doporučit postup pomocí CTAB-PVP. Izolovaná DNA měla vysokou koncentraci, byla čistá a vhodná pro použití na PCR. Magnetická extrakce DNA pomocí robotického izolátoru MagCore nedosahovala uspokojivých výsledků. Protokolem Solid Animal Tissue se v práci nepodařilo izolovat DNA ze vzorků pečiva. Protokol Stool Sample byl o něco úspěšnější. Na přístroji NanoDrop ale tato DNA vykazovala nízkou koncentraci a čistotu. Při následné PCR reakci amplifikace proběhla velice slabě.

PCR reakcí byla ověřena kvalita DNA. Byly použity primery podle Tramuta et al. (2018), jejichž annealing byl optimalizován na 55 °C. Dále byla provedena optimalizace reakční směsi pro PCR. PCR produkty byly vizualizovány elektroforézou na 2% agarózovém gelu. U všech vzorků izolovaných metodou CTAB-PVP se podařilo detekovat a potvrdit přítomnost buď potměníka moučného nebo potměníka brazilského podle konkrétního vzorku. Otestovány byly i běžně prodávané produkty s obsahem potměníka moučného, u kterých byla vyvinutou metodou ověřena správnost údajů na obalech produktů. Žádné z těchto produktů neobsahovaly levnější, ale v EU k lidské konzumaci neschválené larvy potměníka brazilského.

Seznam použité literatury

Aiello, D., Barbera, M., Bongiorno, D., Cammarata, M., Censi, V., Indelicato, S., Mazzotti, F., Napoli, A., Piazzese, D., Saiano, F. (2023). Edible Insects an Alternative Nutritional Source of Bioactive Compounds: A Review. *Molecules*, 28(2):699.

Araújo, R. R. S, Benfica, T. A. R. d. S., Ferraz, V. P., Santos, E. M. (2019). Nutritional composition of insects *Gryllus assimilis* and *Zophobas morio*: Potential foods harvested in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 76:22-26.

Bartlett, J. M., Stirling, D. (2003) A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology*, 226:3-6.

Benzertiha, A., Kierończyk, B., Kołodziejewski, P., Pruszyńska-Oszmałek, E., Rawski, M., Józefiak, D., Józefiak, A. (2020). *Tenebrio molitor* and *Zophobas morio* full-fat meals as functional feed additives affect broiler chickens' growth performance and immune system traits. *Poultry Science*, 99:196–206.

Beran, P., Jozová, E., Stehlíková, D., Hejna, O., Hoštičková, I., Rost, M., Čurn, V. (2022). *Základy metod molekulární biologie*. Kopp, České Budějovice. ISBN 978-80-7394-956-3.

Berensmeier, S. (2006). Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3):495-504.

Broekman, H. C. H. P., Knulst, A. C., Jager, C. F. d. H., van Bilsen, J. H. M., Raymakers, F. M. L., Kruizinga, A. G., Gaspari, M., Gabriele, C., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Houben, G. F., Verhoeckx, K. C. M. (2017). Primary respiratory and food allergy to mealworm. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 140(2):600-603.

Brown, T. A. (2001). *Gene cloning: an introduction*. 4th ed. Oxford: Blackwell Science. ISBN 0-632-05901-X.

Burden, D. W. (2012) Guide to the disruption of biological samples. *Random primers*, 12:1-25.

Calderón-Cortés, N., Quesada, M., Cano-Camacho H., Zavala-Páramo, G. (2010). A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12):5056-64.

Cardoso, S. F., Mateus, T., Lopes, J. (2020). Effect of diet on the chemical composition of *Zophobas morio* larvae. *Book of Abstracts of the 71st Annual Meeting of the European Federation of Animal Science*, 26. ISBN: 978-90-8686-349-5.

Conway, A., Jaiswal, S., Jaiswal, A. K. (2024). The Potential of Edible Insects as a Safe, Palatable, and Sustainable Food Source in the European Union. *Foods*, 13:387.

Daniso, E., Tulli, F., Cardinaletti, G., Cerri, R., Tibaldi, E. (2020). Molecular approach for insect detection in feed and food: the case of *Gryllodes sigillatus*. *European Food Research and Technology*, 246:2373–2381.

Debode, F., Marien, A., Gérard, A., Francis, F., Fumiere, O., Berben, G. (2020). Development of real-time PCR tests for the detection of *Tenebrio molitor* in food and feed. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(8):1421-1426.

de Oliveira, A. C., Marien, A., Hulin, J., Muhovski, Y., Baeten, V., Janssen, E., Berben, G., Rogez, H., Debode, F. (2022). Development of real-time PCR methods for cocoa authentication in processed cocoa-derived products. *Food Control*, 131, 108414.

Drábková, L., Kirschner, J., Vlček, Č. (2002). Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20:161–175.

Dragojlović, D., Đuragić, O., Pezo, L., Popović, L., Rakita, S., Tomičić, Z., Spasevski, N. (2022). Comparison of Nutritional Profiles of Super Worm (*Zophobas morio*) and Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) as Alternative Feeds Used in Animal Husbandry: Is Super Worm Superior? *Animals*, 12(10):1277.

El-Ashram, S., Al Nasr, I., Suo, X. (2016). Nucleic acid protocols: Extraction and optimization. *Biotechnology Reporter*, 5(12):33-39.

Eleftheriou, E., Aury, J. M., Vacherie, B., Istace, B., Belser, C., Noel, B., Moret, Y., Rigaud, T., Berro, F., Gasparian, S., Labadie-Brethau, K., Lefebvre, T., Madoui, M.-A. (2022). Chromosome-scale assembly of the yellow mealworm genome [version 3; peer review: 2 approved]. *Open Research Europe*, 1:94.

Eriksson, T., Andere, A. A., Kelstrup, H., Emery, V. J., Picard, C. J. (2020). The yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) genome: a resource for the emerging insects as food and feed industry. *Journal of Insects as Food and Feed*, 6(5):445-455.

EU, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/2283 ze dne 25. listopadu 2015 o nových potravinách [online]. [cit. 5.4. 2024] Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/TXT/?uri=CELEX%3A32015R2283>

EU, Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2011/1169 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004 [online]. [cit. 5.4. 2024] Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:CS:PDF>

EU Commission Regulation 2017/893 of 24 May 2017 amending Annexes I and IV to Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council and Annexes X, XIV and XV to Commission Regulation (EU) No 142/2011 as regards the provisions on processed animal protein [online]. [cit. 5.4. 2024] Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32017R0893>

Hagstrum, D. W., and B. Subramanyam. (2009). *Stored-product insect resource*. AACC International Inc., St. Paul, MN. 2009. ISBN: 978-1-891127-66-3.

Haymes, K. M., Ibrahim, I. A., Mischke, S., Scott, D. L., Saunders, J. A. (2004). Rapid isolation of DNA from chocolate and date palm tree crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17):5456-5462.

Heidari-Parsa, S., Imani, S., Fathipour, Y., Kheiri, F., Chamani, M. (2018). Determination of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) nutritional value as an animal and human food supplementation. *Arthropods*, 7(4):94-102.

Heikrujam, J., Kishor, R., Behari Mazumder, P. (2020). The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols. *Biochemical Analysis Tools - Methods for Bio-Molecules Studies*. ISBN: 978-1-78984-857-1.

Hong, J., Kim, Y. Y. (2022). Insect as feed ingredients for pigs. *Animal Bioscience*, 35(2):347-355.

Hoy, M. A. (2013). *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*. Elsevier Inc., 3rd Edition. ISBN: 978-0-12-415874-0.

Hunt, G.J. (1997). Insect DNA Extraction Protocol. *Fingerprinting Methods Based on Arbitrarily Primed PCR*, 21-24.

Charlesworth, D. (2021). Evolution: The oldest sex chromosomes. *Current Biology*, 31(24):1585-1588.

Huang, Q., Baum, L., Fu, W. L. (2010) Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory*, 56(3-4):149-52.

Hůrka, K. (2017). Brouci České a Slovenské republiky = Beetles of the Czech and Slovak Republics. 2. nezměněné vydání. Kabourek, Zlín. ISBN 978-80-86447-17-9.

Chauhan, T. (2019). *How to Detect DNA from a Biological Sample?* [online]. Genetic Education Inc. [cit. 5.4. 2024] Dostupné z: <https://geneticeducation.co.in/how-to-detect-dna-from-a-biological-sample/>

Chory, J., Pollard, J. D. (2001) Separation of Small DNA Fragments by Conventional Gel Electrophoresis. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2, 2.7.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (2012) *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101. ISBN: 0-12-372180-6.

Joshi, M., Deshpande, J. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5):81-97.

Józefiak, A., Benzertiha, A., Kierończyk, B., Łukomska, A., Wesołowska, I., Rawski, M. (2020). Improvement of cecal commensal microbiome following the insect additive into chicken diet. *Animals*, 10:577.

Kadri, K. (2019). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science. *IntechOpen*. DOI: 10.5772/intechopen.86491.

Kaur, S., Stinson, S. A., diCenzo, G. C. (2023). Whole genome assemblies of *Zophobas morio* and *Tenebrio molitor*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 13(6).

Kierończyk, B., Rawski, M., Pawełczyk, P., Różyńska, J., Golusik, J., Mikołajczak, Z., & Józefiak, D. (2018). Do insects smell attractive to dogs? A comparison of dog reactions to insects and commercial feed aromas—a preliminary study. *Annals of animal science*, 18(3):795-800.

Kim, H. R., Lee, H. M., Yu, H. C., Jeon, E., Lee, S., Li, J., Kim, D. H. (2020). Biodegradation of polystyrene by *Pseudomonas* sp. isolated from the gut of superworms (larvae of *Zophobas atratus*). *Environmental Science & Technology*, 54: 6987–6996.

Kim, S. Y., Kim, H. G., Song, S. H., Kim, N. J. (2015). Developmental characteristics of *Zophobas atratus* (Coleoptera: *Tenebrionidae*) larvae in different instars. *International Journal of Industrial Entomology*, 30: 45–49.

Köppel, R., Schum, R., Habermacher, M., Sester, C., Piller, L. E., Meissner, S., Pietsch, K. (2019). Multiplex real-time PCR for the detection of insect DNA and determination of contents of *Tenebrio molitor*, *Locusta migratoria* and *Achaeta domestica* in food. *European Food Research and Technology*, 245:559–567.

KRD. MagCore - magnetická síla na izolaci nukleových kyselin [online]. [cit. 5.4. 2024] Dostupné z: <https://www.krd.cz/blog/magcore-magneticka-sila-na-izolaci-nukleovych-kys>.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., Kim, Y. H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62:3923.

Lei, X., Lu, S., Guoyu, G., Qianwu, H., Jun, L., Liang, Y., Liefeng, L., Yao, Z. (2019). The effects of pH and salts on nucleic acid partitioning during phenol extraction. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 38(4):305-320.

Lima, J., Pittaluga, M., Lovatto, N., Veiverberg, C., Borille, R., Lazzari, R. (2021). Mealworm (*Tenebrio molitor*) potencial in fish nutrition: a review. *Research, Society and Development*, 10(16).

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4):264-270.

Machona, O., Chidzwondo, F., Mangoyi, R. (2022). *Tenebrio molitor*: possible source of polystyrene-degrading bacteria. *BMC Biotechnology*, 22(1):2.

Marien, A., Sedefoglu, H., Dubois, B., Maljean, J., Francis, F., Berben, G., Guillet, S., Morin, J. F., Fumière, O., Debode, F. (2022). Detection of *Alphitobius diaperinus* by

Real-Time Polymerase Chain Reaction With a Single-Copy Gene Target. *Frontiers in Veterinary Science*, 9:718806.

McOrist, A. L., Jackson, M., Bird, A. R. (2002). A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 50(2):131-139.

Meyer, A. M., Meijer, N., Hoek-van den Hil, E. F., van der Fels-Klerx, H. J. (2020). Chemical food safety hazards of insects reared for food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed, Special Issue: Advancement of insects as food and feed in a circular economy*, 7(5):823-831.

Novák, V. (2014). *Brouci čeledi potemníkovití (Tenebrionidae) střední Evropy = Beetles of the family Tenebrionidae of Central Europe. Zoologické klíče*. Praha: Academia, 2014. ISBN 978-80-200-2338-4.

Ooninckx, L.; Berrens, S.; Van Peer, M.; Wuyts, A.; Broeckx, L.; Van Miert, S. (2022). Determining the Effect of Different Reproduction Factors on the Yield and Hatching of *Tenebrio molitor* Eggs. *Insect*, 13:615.

Oppert, B., Dossey, A. T., Chu, F.-C., Šatović-Vukšić, E., Plohl, M., Smith, T. P. L., Koren, S., Olmstead, M. L., Leierer, D., Ragan, G., Johnston, J. S. (2023). The Genome of the Yellow Mealworm, *Tenebrio molitor*: It's Bigger Than You Think. *Genes*, 14(12):2209.

Ortiz, J. C., Ruiz, A. T., Morales-Ramos, J., Thomas, M., Rojas, M., Tomberlin, J., Yi, L., Han, R., Giroud, L., Jullien, R. (2016). Insect mass production technologies. Insects as sustainable food ingredients. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands, 2016. ISBN: 978-0-12-802856-8.

Prachom, N., Boonyoung, S., Hassaan, M. S., El-Haroun, E., Davies, S. J. (2021). Preliminary evaluation of Superworm (*Zophobas morio*) larval meal as a partial protein source in experimental diets for juvenile Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture Nutrition*, 27(5):1304-1314.

Quennedey, A., Aribi, N., Everaerts, C., Delbecq, J.-P. (1995). Postembryonic development of *Zophobas atratus* F. (Coleoptera: Tenebrionidae) under crowded or isolated conditions and effects of juvenile hormone analogue applications. *Journal of Insect Physiology*, 41(2):143–152.

Ramos-Elorduy, J. (2009). Anthro-po-entomophagy: Cultures, evolution and sustainability. *Entomological Research*, 39(5):271–288.

Ramos-Elorduy, J., González, E. A., Hernández, A. R., Pino, J. M. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal of Economic Entomology*, 95(1):214-220.

Ramos-Elorduy, J., Moreno, J. M. P., Prado, E. E., Perez, M. A., Otero, J. L., de Guevara, O. L. (1997). Nutritional Value of Edible Insects from the State of Oaxaca, Mexico. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10(2):142-157.

Rosentrater, K. A. (2022). Insects in grains: identification, damage and detection. *Storage of Cereal Grains and Their Products*, 5(21):607-646.

Rumbos, C. I., Athanassiou, C. G. (2021). The Superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera:Tenebrionidae): A ‘Sleeping Giant’ in Nutrient Sources. *Journal of Insect Science*, 21(2):13, 1-11.

Rychlik, W., Spencer, W. J., Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research*, 18(21):6409-6412.

Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D., Hake, S. B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols*, 2(6):1445-1457.

Schenk, J. J., Becklund, L. E., Carey, S. J., Fabre, P. P. (2023). What is the “modified” CTAB protocol? Characterizing modifications to the CTAB DNA extraction protocol. *Applications in Plant Sciences*, 11(3).

Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., Jędras, M. (2013) Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food. *Agricultural Sciences*, 4:287-291.

Sigma-Aldrich. (2024). Safety Data Sheet - Ethidium bromide [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/sds/SIGMA/E1510?userType=undefined>

Son, Y. J., Hwang, I.K., Nho, C.W., Kim, S. M., Kim, S. H. (2021). Determination of Carbohydrate Composition in Mealworm (*Tenebrio molitor* L.) Larvae and Characterization of Mealworm Chitin and Chitosan. *Foods*, 10(3):640.

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžicková, V., Koptíková, J. (2005) *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.

Tan, S. C., Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *BioMed Research International*, 2009:2009:574398.

Tang, C., Yang, D., Liao, H., Sun, H., Liu, C., Wei, L., Li, F. (2019). Edible insects as a food source: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*, 1(8).

Tramuta, C., Gallina, S., Bellio, A., Bianchi, D. M., Chiesa, F., Rubiola, S., Romano, A., Decastelli, L. (2018). A Set of Multiplex Polymerase Chain Reactions for Genomic Detection of Nine Edible Insect Species in Foods. *Journal of Insect Science*, 18(5):3.

Traynor, A., Burns, D.T., Wu, D., Karoonuthaisiri, N., Petchkongkaew, A., Elliott, C. T. (2024). An analysis of emerging food safety and fraud risks of novel insect proteins within complex supply chains. *npj Science of Food*, 8(1):7.

Weaver, R. F. *Molecular biology*. 4th ed. Boston: McGraw-Hill, 2008. ISBN 978-007-127548-4.

Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S., Chee, H. Y. (2017) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3):626-643.

Xin, Z., Chen, J. (2012). A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods*, 8(26).

Yang, Y., Wang, J., Xia, M. (2020). Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating superworms *Zophobas atratus*. *Science of The Total Environment*, 708:135233.

Zahradník, J. (2008). *Brouci. Fotografické atlasy*. Praha: Aventinum, 2008. ISBN 978-80-86858-43-2.

Zhu, W., Hussain, M., Gao, J., Mao, R., An, X. (2023). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid and Sensitive Identification of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Methods and Protocols*, 6(81).

Seznam obrázků

Obrázek 1: Křupaví červíci chilli.....	30
Obrázek 2: Hořká čokoláda s larvami potemníka moučného	30
Obrázek 3: Rýžová kaše s moučkou z larev potemníka moučného	30
Obrázek 4: Gradient teplot annealingu u <i>Tenebrio molitor</i> . Využité teploty:	39
Obrázek 5: Gradient teplot annealingu u <i>Zophobas morio</i> . Využité teploty:	39
Obrázek 6: Magnetická izolace DNA pomocí protokolu Solid Animal Tissue. Horní část: využití primery pro <i>Zophobas morio</i> ; Dolní část: využití primery pro <i>Tenebrio molitor</i>	40
Obrázek 7: Magnetická izolace DNA pomocí protokolu Stool Sample. Horní část: využití primery pro <i>Zophobas morio</i> ; Dolní část: využití primery pro <i>Tenebrio molitor</i>	41
Obrázek 8: Izolace DNA ze vzorků běžného pečiva metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro <i>Tenebrio molitor</i>	42
Obrázek 9: Izolace DNA ze vzorků běžného pečiva metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro <i>Zophobas morio</i>	42
Obrázek 10: Izolace DNA z produktů obsahujících larvy <i>Tenebrio molitor</i> metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro <i>Tenebrio molitor</i>	43
Obrázek 11: Izolace DNA z produktů obsahujících larvy <i>Tenebrio molitor</i> metodou CTAB-PVP s využitím primerů pro <i>Zophobas morio</i>	43

Seznam tabulek

Tabulka 1: Druhy hmyzu povoleného ke konzumaci v EU a jejich využitelné formy	10
Tabulka 2: Procentuální obsah komponent v larvách potěmníka moučného.....	14
Tabulka 3: Procentuální obsah komponent v larvách potěmníka brazilského	17
Tabulka 4: Využitý recept na běžné pečivo	29
Tabulka 5: Sekvence využitých primerů.....	34
Tabulka 6: Reakční protokol gradientové PCR	34
Tabulka 7: Reakční protokol PCR	35
Tabulka 8: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných protokolem Solid Animal Tissue	36
Tabulka 9: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných protokolem Stool Sample.....	37
Tabulka 10: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných z pečiva metodou CTAB-PVP	37
Tabulka 11: Detekce a kvantifikace DNA ve vzorcích izolovaných z produktů s obsahem larev potěmníka moučného metodou CTAB-PVP.....	38

Seznam použitých zkratek

bp – *base pair*, báзовý pár

CTAB – *cetrimonium bromide*, cetyltrimethylamoniumbromid

DNA – *deoxyribonucleic acid*, deoxyribonukleová kyselina

dNTPs – *deoxynucleosidtriphosphates*, deoxynukleosidtrifosfáty

EDTA - *ethylenediaminetetraacetic acid*, kyselina ethylendiamintetraoctová

EU – *The European Union*, Evropská Unie

gDNA – *genomic deoxyribonucleic acid*, genomová deoxyribonukleová kyselina

IAA – *isoamyl alcohol*, isoamylalkohol

kbp – *kilobase pairs*, kilobázové páry

KČ – křupaví červíci

PAGE – *polyacrylamide gel electrophoresis*, polyakrylamidová gelová elektroforéza

PCR – *polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce

PVP – *polyvinylpyrrolidone*, polyvinylpyrrolidon

RNA – *ribonucleic acid*, ribonukleová kyselina

SDS – *sodium dodecyl sulfate*, dodecylsíran sodný

TE – Tris-EDTA

TBE – Tris-borát-EDTA

UV – *ultraviolet*, ultrafialový
