

Insekten als Lebensmittel

Identifikation mittels MALDI-TOF-MS

C. Wind¹, R. Diekmann¹, S. Helble¹, N. Grabowski², B. Scherer¹



Einleitung

Das Thema „Insekten als Lebensmittel“ gewinnt in Deutschland immer mehr an Bedeutung. Ob als Mutprobe, aus Neugierde am Unbekannten oder weil es schmeckt – bei den Verbrauchern ist das Interesse an essbaren Insekten geweckt. Dies entspricht dem europäischen bzw. internationalen Trend. Die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (FAO) weist seit einigen Jahren darauf hin, dass Insekten eine gangbare Alternative zur Ernährung der steigenden Weltbevölkerung darstellen [1].

Diesem Trend folgend, hat sich auch die Lebensmittelüberwachung hier einer neuen Herausforderung zu stellen. Das CVUA Freiburg beschäftigt sich daher seit geraumer Zeit mit dieser Thematik (siehe Posterbeitrag „Insekten als Lebensmittel - ein Thema beschäftigt das CVUA Freiburg“) [2]. Einen Schwerpunkt legen wir derzeit auf die Artenbestimmung der Insekten in allen Entwicklungsstadien, um bei einer Vielzahl möglicher Spezies eine gesicherte Aussage zur Identität der vorgelegten Proben machen zu können, zum Schutz des Verbrauchers vor falsch deklarierten Lebensmitteln.

Neben der klassischen entomologischen Bestimmung am Insekt stehen bisher kaum etablierte Methoden zur Identifizierung der Tiere zur Verfügung. Die MALDI-TOF Massenspektrometrie hat als moderne Analysetechnik in der mikrobiologischen Untersuchung in den letzten Jahren eine rasante Entwicklung durchlaufen. Dieses Prinzip kann ebenfalls zur Identifizierung von Insektenarten herangezogen werden. Basis der Artidentifizierung bildet dabei die Detektion spezifischer Massenprofile von Proteinen. Die resultierenden charakteristischen Fingerprints werden mit vorhandenen Datenbankeinträgen abgeglichen. Bisher sind jedoch für essbare Insekten keine kommerziellen Datenbanken verfügbar. Um diese Lücke zu schließen, entwickelt das CVUA Freiburg derzeit eine erste Datenbank auf diesem Gebiet.

Datenbankaufbau

Zur Erzeugung von Referenzspektren für die Datenbank wurden durch einen renommierten Fachmann identifizierte Insekten verwendet. Nach Proteinextraktion wurden im MALDI microflex LT/SH System (Fa. Bruker) Referenzspektren erzeugt. Dazu wurden aus den vorbereiteten Proben Rohspektren im Massebereich 2-20 kDa aufgenommen. Es folgte eine Qualitätskontrolle bevor die Rohspektren durch die gerätespezifische Software in MSPs (Main Spectra Projections) umgewandelt wurden. Diese wurden als Referenz in der Datenbank hinterlegt. Für jede Referenz wurde ein Cross-Check gegen die weiteren in der Datenbank hinterlegten Referenzen durchgeführt. Die Datenbank umfasst derzeit 24 Referenzen von 11 verschiedenen Insektenarten (Abb. 1).

Identifizierung von Insektenproben

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Insekten in gefrorenem, gefriergetrocknetem oder gemahlenem Zustand, die als Lebensmittel oder Futtermittel gehandelt wurden. Probenmaterial wurde aus dem Oberschenkel der Insekten bzw. bei Larvenstadien aus dem vorderen Körperdrittel entnommen. Die Probenextraktion erfolgte durch mechanischen und chemischen Aufschluss mit zwei verschiedenen Extraktionsverfahren (Verfahren A EtOH-FA-I: Ameisensäure-Extraktionsmethode (EX) der Firma Bruker - modifiziert für Insekten; Verfahren B Chloroform-I: Extraktionsmethode nach Stephan et al. (2014) [3] – modifiziert für Insekten).

Das beschickte Stahltarget wurde im MALDI microflex LT/SH System (Fa. Bruker) gemessen. Der Abgleich der Probenspektren erfolgte gegen die oben beschriebene Datenbank. Dabei wurde durch die gerätespezifische Software die Übereinstimmung der Probe mit den Referenzen berechnet und die besten Treffer in Form einer Rang-Liste wiedergegeben (Abb. 3).

A) EtOH-FA-I Extraktionsmethode
Die Probe in 300 µl analysenreinem Wasser mit einem Mikropipistill zermahlen. 900 µl Ethanol absolut zufügen, zentrifugieren, Überstand dekantieren. 300 µl analysenreines Wasser zufügen, zentrifugieren, Überstand abpipettieren.
Resuspension des Pellets mit 70%iger Ameisensäure, Zirkonium/Glas-Beads zugeben, vortexen, Acetonitril zugeben, vortexen, zentrifugieren. 1 µl Überstand auf das Stahltarget pipettieren, überschichten mit 1 µl Matrix-Lösung (α-Cyano-4-Hydroxizimtsäure, HCCA).

B) Chloroform-I Extraktionsmethode
Die Probe in 100 µl analysenreinem Wasser mit einer Schere zerteilen und mit einem Mikropipistill zermahlen. Eine stecknadelkopfgroße Portion in 100 µl 25%ige Ameisensäure geben, vortexen. 100 µl Methanol und 100 µl Chloroform zufügen (Abzug), vortexen, zentrifugieren. 5 µl aus der oberen Phase mit 10 µl Matrix-Lösung (α-Cyano-4-Hydroxizimtsäure, HCCA) vermischen. 1 µl auf das Stahltarget pipettieren.

C) **D)**

| Rank (Quality) | Matched Pattern | Score Value |
|----------------|---|-------------|
| 1 (+++) | Tenebrio molitor Mehlwurm Chloroform-I CVFR P154.2 CVFR | 2,571 |
| 2 (++) | Tenebrio molitor Mehlwurm EtOH-FA-I CVFR P118.1 CVFR | 2,018 |
| 3 (+) | Tenebrio molitor Mehlwurm EtOH-FA-I CVFR P154.1 CVFR | 1,819 |
| 4 (-) | Zophobas atratus Riesenmehlwurm EtOH-FA-I CVFR P155.1 CVFR | 1,143 |
| 5 (-) | Zophobas atratus Riesenmehlwurm Chloroform-I CVFR P155.2 CVFR | 1,090 |

Abb. 3: A) + B) Ablauf der Extraktionsverfahren, C) Beschickung des Stahltargets und Messung im MALDI microflex LT/SH System (Fa. Bruker), D) Darstellung der Übereinstimmung der Probe mit der Referenz (graphisch und als Rang-Liste)

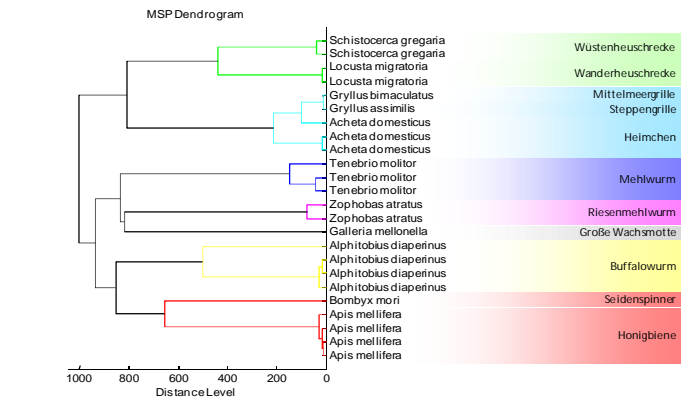


Abb. 1: Dendrogramm der in der Datenbank hinterlegten Insekten-Referenzen

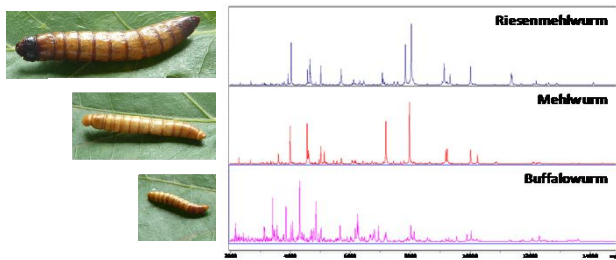


Abb. 2: Beispiele für Spektren verschiedener Insekten-Arten

Ergebnisse und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Identifizierung von Insekten mittels MALDI-TOF MS möglich ist. Das hier dargestellte Verfahren, bestehend aus Probenvorbereitung und der anschließenden massenspektrometrischen Messung, ermöglicht eine Bestimmung der Art innerhalb kurzer Zeit (ca. 1-1,5 h). Entomologisches Expertenwissen ist dafür nicht erforderlich. Beide getesteten Extraktionsverfahren erwiesen sich als geeignet und können alternativ verwendet werden.

Voraussetzung für die Identifizierung ist die Hinterlegung von Referenzspektren in einer Datenbank. Die Qualität der Analyse ist von der Anzahl und Güte der in der Datenbank verfügbaren Referenzen abhängig. Das CVUA Freiburg hat beim Datenbank-Aufbau zunächst Arten berücksichtigt, die in einzelnen EU-Mitgliedstaaten bereits als Lebensmittel-Insekten vermarktet werden. Die Erweiterung der Datenbank wird mit ähnlichen bzw. nicht-erlaubten oder unerwünschten Arten fortgeführt. Auch werden Arten einbezogen, die im deutschen Zoofachhandel erhältlich sind, wo sie von Verbrauchern als Futtermittel gekauft und ggf. eigenverantwortlich zum Verzehr verwendet werden. Als Voraussetzung für den Routineeinsatz im Labor werden parallel Validierungsstudien zur Überprüfung des Systems durchgeführt, um die Spezifität und Selektivität der in der Datenbank vorhandenen Arten zu ermitteln.

Literatur:

1. <http://www.fao.org/forestry/edibleinsects/en/>
2. Nach dem Fest ist vor dem Fest: Anstatt „Weihnachtsgans mit Knödeln“ in diesem Jahr vielleicht „Heuschrecken-Chili-Spieße mit Mehlwurm-Pfannkuchen“ und „Schoko-Grillen-Häufchen“? http://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=3&thema_ID=2&ID=2208&lang=DE&Pdl=No, 28.01.2016
3. Stephan, R., Jöhler, S., Oesterle, N., Nümann, G., Vogel, G., & Pflüger, V. (2014). Rapid and reliable species identification of scallops by MALDI-TOF mass spectrometry. Food Control, 46, 6–9.

Anschrift der Verfasser:

¹Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg, e-mail: poststelle@cvuafv.bwl.de
²Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover

57. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG vom 27. bis 30. 09. 2016 in Garmisch-Partenkirchen



Baden-Württemberg