

Format rapportage projectinformatie PPS-en Landbouw, water, voedsel

Datum versie: 7 december 2020

Uit projectplan (svp zoveel mogelijk invullen)

1. Projectinformatie

1.1 Organisatie/financiering	TKI A&F en T&U
1.2 Projectnummer	LWV19289
1.3 Project titel	<i>Enhancing sustainable and safe protein production in Insects through Next Generation Sequencing (InsectNGS)</i>
1.4 Projectleider	Niek Steeghs n.steeghs@protifarm.com
1.5 Startdatum (dd-mm-jjjj)	01-01-2020
1.6 Einddatum (dd-mm-jjjj)	31-12-2021
1.7 MMIP primair (nummer en naam van het MMIP, zie overzicht bijlage 1)	D3
1.8 MMIP secundair (deze alleen invullen als er een 2^e MMIP is waar het project aan bijdraagt)	nvt

2. Projectomschrijving

2.1 Samenvatting

In de komende decennia zal de wereldbevolking sterk toenemen. Om al die mensen te kunnen voeden, is er een sterk stijgende vraag naar eiwitten. Bekende eiwitbronnen voor voeding van de mens zijn planten en dieren. Tegelijk met een toenemende vraag naar eiwitten is er een maatschappelijke discussie over de ongunstige CO2 footprint van de productie van hoogwaardige dierlijke eiwitten (vlees van pluimvee, varkens en runderen) en dierwelzijnsaspecten. Een alternatief zijn eiwitten afkomstig van insecten. Deze productie heeft een gunstiger CO2 footprint en er zijn geen dierwelzijn discussies zoals bij hogere organismen. Deze nieuwe voedselproductie systemen staan uiteraard voor nieuwe uitdagingen: naast consumentenacceptatie zijn er technische vragen. De basis van dit voorstel is de veronderstelling dat de verschillende soorten micro-organismen die zich in en op de larven bevinden kunnen worden aangetoond, zoals bijvoorbeeld ook wordt gedaan bij andere complexe systemen zoals micro-organismen in de darm van mens en dier. Met moderne DNA technieken ('metagenomics') kan de samenstelling van deze populatie ('flora') worden bepaald voor bacteriën, schimmels, virussen en parasieten. Hiermee kunnen in de productie in een vroeg stadium (early warning) ziekteverwekkers voor de mens (voedselveiligheid) als ook ziekteverwekkers voor de larven worden aangetoond. Daarnaast wordt in dit project nagegaan hoe de flora is samengesteld in batches larven die met een hoge efficiency worden geproduceerd en hoe de flora afwijkt bij batches met lage efficiency. Met het ontwikkelen van een systeem waarbij geregeld gemeten wordt (b.v. iedere week), kan de producent tijdig een signaal krijgen of er bijgestuurd moet worden in het productieproces. In dit project worden de ervaringen van een bedrijf dat insecteneiwitten voor humane voeding produceert, een bedrijf dat gegevensverzameling en verwerking automatiseert en structureert, en een bedrijf dat de data kan verwerken en daarmee voorspellingen kan doen, gecombineerd met de ervaring van de universiteit

op het gebied van (snelle) voorspellende DNA-gebaseerde methoden. Het project maakt een innovatieve techniek toepasbaar in een vernieuwend, toekomstbestendig eiwit productieproces.

2.2 Doel van het project

With the increasing demand for high value proteins in the human diet, insect-derived proteins are a sustainable alternative for the traditional animal- and plant-derived proteins. Science-based optimisation of the breeding process of insects is needed to keep a competitive position for the Dutch industry in the rapidly developing insect protein industry. With new technological developments, preparedness for new food safety risks is of utmost importance to produce a safe product for humans, and to meet the consumers requests for a reliable and healthy product. The production of insects at the scale of Protifarm is completely new, and so are the safety aspects for as well the insects as humans around the production are a novelty.

In general, the knowledge of insect pathogens in the production of insects is limited and the effect of different pathogens is yet unknown. Protifarm has experience with the Gregarina parasite. The effect of an infection could be limited to a lower growth rate or no signs, but with a severe infected population the effect could be dramatic, such as lower survival rate, lower yield per crate and less pupation. It could be very useful to be able to monitor other insect pathogens like Bacillus thuringiensis, to prevent serious infections. Furthermore, the total microbiome can be monitored with metagenomics and composition can be associated with production features. There is no metagenomics data available of the microbiome of A. diaperinus. This will be first study to do so and will set the standard. Although not a lot of specific information is known, this project is considered highly feasible as the laboratory techniques are available.

Furthermore, it is preferable to maintain a production-system free of human pathogens, as in animal and plant production systems. The insect production systems are closed but introduction of pathogens through humans working in the production area is a possible food hazard. Although the insect proteins are processed in the post-harvest phase with methods that inactivate microbial contaminants, for product integrity reasons it is highly desirable to screen for human pathogens in production. As part of the quality system, a continuous monitoring of the presence of human pathogens is recommended. If contamination is detected, the production can be destroyed and a systematic evaluation of routes of introduction of the pathogens will take place with consequently targeted interventions (e.g. regarding biosecurity). The fact that insect protein production for human consumption is relatively new, the introduction of (new) types of pathogens is rather unpredictable and therefore an unbiased method, detecting the broadest scope of potential pathogens and deviations should be used. Metagenomics meets these criteria.

In the project, Next Generation Sequencing (NGS) of larvae (intestine) samples will be used. This approach circumvents the limitations of traditional culturing approaches. The huge increased throughput and reduced cost of genome sequencing has made it possible to sequence not just single genomes, but all the species in a sample. This approach is called metagenomics: all DNA in a sample is sequenced. DNA of a sample is directly investigated for the presence of potential pathogens, whether they are bacteria, fungi, viruses or parasites. Costs of sequencing, but also the time required for sequencing a sample however has limited the use of this approach for SMEs. Recently, inexpensive single molecule sequencing devices have been developed and are now entering a stage of maturity. These smartphone-sized devices, developed by Oxford Nanopore Technologies, of which the MinION is the most well-known, require very little sample preparation, and produce long sequence reads, directly from isolated DNA, addressing limitations which have

thus far hampered uptake of rapid NGS-based sample investigation. Using the Oxford Nanopore Technologies sequencing platform, we will investigate and describe the microbiome of *A. diaperinus* larvae with different aims: i) investigate which species are often found associated with successful harvested and efficiently produced larvae, ii) which pathogens (for larvae) are detected that may affect production negatively and iii), rapidly detect the presence of potential pathogens that may pose a problem for human health.

The project has three main objectives:

- i) the identification of the microbiome-composition associated with efficient larvae production;
- ii) the quantification of (known) larvae-pathogens
- iii) developing a detection system for human pathogens in the larvae production.

Combining these 3 aims will lead to an integrated early warning system (EWS) that detects deviations of an optimal production system and the presence of potential human pathogens. This is input for corrective measures in the management of the larvae production, and facilitates a safe production of insect protein sources.

2.3 Motivatie

The societal impact is that the project supports Protifarm in the development of a reliable and sustainable production of insects and that food safety is secured. The economic impact is by having an EWS, Protifarm is able to take corrective actions before the production collapses and/or food safety risks become manifest. The production of insects at the scale of Protifarm is completely new, therefore all the aspects around the production have not been explored. Very little is known about bacteria and other pathogens (fungi, parasites) in the production.

For Hellebrekers it is the first project concerning complex metagenomics data. This method of detecting environmental microbes is rapidly developing and already used in a wide range of fields, e.g. in other agricultural businesses, engineering, medicine, sustainability and ecology.

Metagenomics concerns highly complex bioinformatics and data analysis. Knowledge and software which will be obtained and developed during this project can be used in a wide range of other projects.

We consider this project highly feasible as the laboratory techniques are available. The only potential "setback" would be that all the crates in all the phases of the cycle will have the same production results. The experience of Protifarm so far, however, is that clear variation in production results have been observed. It is crucial to plan the place and moments of sampling correct, so we could correlate the production data with the sampling data.

2.4 Resultaat

The project is successful when at least 3 of the following 5 criteria are met. Firstly, the project is successful when the microbiome approach is able to detect human pathogens with high sensitivity in the production process. Secondly, the microbiome of *Alphitobius diaperinus* should be described from the metagenomics data and variations within production cycles should be stable enough to analyse deviations from normal microbiome compositions. Thirdly, when variation in technical production characteristics, such as feed, temperature, moisture can be associated with differences in microbiome composition. Fourthly, when the presence of the known parasite *Gregarina* spp can be quantitatively associated with the production efficiency, and when this can act as prediction (signal is prior to negative effect in production efficacy). This allows corrective actions in the management to prevent production losses. Finally, when potentially other specific pathogens can be identified associated with impaired production.

Jaarrapportage (svp ook laatste jaar invullen)

3. Status project

3.1 Status project	project loopt achter
3.2 Toelichting incl. voorziene wijzigingen t.o.v. het oorspronkelijke werkplan	Als gevolg van Covid draait het lab op de Universiteit Utrecht op beperkte capaciteit. Het sequenciewerk heeft daardoor erg veel vertraging opgelopen. De vertraging bedraagt op dit moment al enkele maanden en zal mogelijk nog toenemen door voortdurende uitval van analisten. Er zal een verlenging van een half jaar aangevraagd worden van het project.

4. Behaalde resultaten

4.1 Korte beschrijving van de inhoudelijke resultaten en hun bijdrage aan het MMIP (zoals beschreven in 2.2)
<p>We have optimized DNA isolation procedures and sequencing procedures and have successfully sequenced samples from feces, whole larvae and larval intestines from a single timepoint. Initially we started from a feces and substrate sample taken mid-cycle. Fecal samples are typical for microbiome studies as it generally gives a good view of the gut microbiome of the organism, however after sequencing that sample it became clear that 2/3 of the sample consisted of feed DNA, mostly <i>Triticum Aestivum</i>, "Common Wheat".</p> <p>In earlier developmental stages, the DNA of the feed would probably take 99% of the sequences, making a fecal sample not usable. To get a good view of the gut microbiome, the intestinal tract of approximately 100 larvae was removed and sequenced. This represents an optimal microbiome sample, however it is very labor intensive. From these sequences we can adequately observe the microbiome, including bacteria, protists, fungi and nematode DNA.</p> <p>To facilitate easier processing of samples we also tested whole larvae. After initial issues with processing the samples as the chitin exoskeleton resisted processing, we developed an optimized protocol by slicing up the larvae followed by a bead beating protocol that releases the DNA from the gut microbiome. Comparison of the whole larval DNA and isolated intestinal tract shows that the microbiome of processed whole larvae is very similar.</p> <p>In short, we have detected the DNA sequenced of multiple bacterial species, nematodes and protists and also the DNA of the insect host and the feed, and developed a method to analyze these DNA sequences and present these in a tabular format. We are currently sequencing the longitudinally sampled larvae and will investigate changes in their microbiome over time, increases and decreases in protist and nematode DNA and correlations between the species (bacterial and eukaryotic).</p>
4.2 Deliverables (bijeenkomsten en andere output, die niet benoemd wordt in 4.3 en 4.4)
- 1 on-site kick-off project meeting to investigate sampling conditions

- Several virtual meetings to present initial results, the exchange of samples and the selection of the sample matrix.
4.3 Communicatie (lijsten)
4.3.1 Wetenschappelijke artikelen en hun doi (<i>Digital Object Identifiers</i>)
-
4.3.2 Rapporten/artikelen in vakbladen
-
4.3.3 Overige communicatie-uitingen (inleidingen/posters/radio-tv/social media/workshops/beurzen)
-
4.4 Overige resultaten: technieken, apparaten, methodes
See 4.1.
4.5 Projectwebsite: nvt

Eindrapportage

5. TRL bij afsluiting van een project

Technology Readiness Level (TRL) van de technologie bij afsluiting van het project. Er zijn twee indicatoren die verschillen in detailniveau. Vul zo mogelijk het detailniveau in. Als dat niet mogelijk is, vul dan de hoofdcategorie in.

5.1 Hoofdcategorie (<i>keuze maken</i>)	Fundamenteel onderzoek Industrieel onderzoek Experimentele ontwikkeling
5.2 Detailcategorie bij start van het project (<i>in cijfers, nummer van de betreffende categorie, zie bijlage voor toelichting</i>)	
5.3 Detailcategorie bij afsluiting van het project	

6 Status project bij afronding

Status project (<i>keuze maken</i>)	1. Het project is afgerond conform de oorspronkelijk scope. Alle mijlpalen zijn behaald. 2. Het project is naar tevredenheid afgerond, maar de inhoud van de mijlpalen is gewijzigd. 3. Het project is niet afgerond en definitief afgesloten.
--	--

7 Output over het hele project

		aantal
7.1	Aantal gerealiseerde wetenschappelijke publicaties <i>gepubliceerde artikelen in peer-reviewed journals</i>	
7.1 lijst	Zie lijst onder 4.3.1 voeg evt. artikelen uit eerdere jaren toe (incl. doi)	
7.2	Aantal verwachte wetenschappelijke publicaties	

	<i>publicaties waarvan verwacht wordt dat ze gepubliceerd zullen worden in een peer-reviewed journal</i>	
7.2 lijst		
7.3	Aantal gerealiseerde niet-wetenschappelijke publicaties <i>rapporten, vakbladartikelen</i>	
7.3 lijst	Zie lijst onder 4.3.2 voeg evt. publicaties uit eerdere jaren toe	
7.4	Aantal aangevraagde patenten <i>Het aantal patenten die op basis van onderzoek uit het project zijn aangevraagd</i>	
7.4 lijst	Geef van elk patent de doi, wanneer beschikbaar	
7.5	Aantal verleende licenties <i>Het aantal verleende licenties die op basis van onderzoek uit het project zijn verleend</i>	
7.5 lijst		
7.6	Aantal prototypes <i>Het aantal gerealiseerde prototypes die op basis van onderzoek uit het project zijn ontwikkeld</i>	
7.6 lijst		
7.7	Aantal demonstrators <i>Het aantal gerealiseerde demonstrators die op basis van onderzoek uit het project zijn ontwikkeld</i>	
7.7 lijst		
7.8	Aantal spin-offs/ spin-outs <i>Het aantal spin-offs en spin-outs die op basis van onderzoek uit het project zijn voortgekomen.</i>	
7.8 lijst		
7.9	Aantal nieuwe of verbeterde producten/ processen/diensten geïntroduceerd <i>Het aantal producten dat verbeterd of nieuw ontwikkeld is/wordt en het aantal processen en diensten die verbeterd of nieuw is op basis van onderzoek uit het project.</i>	
7.9 lijst		

8 Impact

Impact betreft het verhaal van het project: een kwalitatieve omschrijving van hoe het project heeft bijgedragen aan de missies en/of het realiseren van economische kansen. Geef aan wat er met de ontwikkelde kennis/tools uit het project wordt gedaan. Geef een toelichting op de (bredere) bijdrage van het project aan de maatschappelijke uitdaging, zoals verwoord in 1.4b. De genoemde impact kan bijvoorbeeld betrekking hebben op:

- Producten, concepten, kennis e.d. die door de partners in de praktijk worden toegepast (nu of op afzienbare termijn)
- een aansprekend voorbeeld dat onder de output (paragraaf 7) gerapporteerd is;
- (nieuw) inzicht in randvoorwaarden (buiten kennis&innovatie) die nodig zijn om de missiedoelen te realiseren (denk aan financiering, regelgeving, communicatie, etc).
- het bereiken van (nieuwe) partners en het versterken van opgebouwde netwerken;
- verbinding met (praktijkgericht) onderwijs en andere wijzen van disseminatie;

Geef een link naar de website van het project, video of infographic (indien van toepassing).

Beschrijf de impact van het project, geef evt. ook een link naar de website van het project, een video of infographic (indien van toepassing)

Bijlage 1 MMIP's

KIA: Landbouw, water en voedsel	
MMIP	A1 Verminderen fossiele nutriënten, water en stikstofdepositie
	A2 Gezonde, robuuste bodem en teeltsystemen gebaseerd op agro-ecologie en zonder schadelijke emissies naar grond- en oppervlaktewater
	A3 Hergebruik zij- en reststromen
	A4 Eiwitvoorziening voor humane consumptie uit (nieuwe) plantaardige bronnen
	A5 Biodiversiteit in de kringlooplandbouw
	B1 Emissiereductie methaan veehouderij
	B2 Landbouwbodems, emissiereductie lachgas en verhoging koolstofvastlegging
	B3 Vermindering veenoxidatie veenweide
	B4 Verhoging vastlegging koolstof in bos en natuur
	B5 Energiebesparing, -productie en -gebruik
	B6 Productie en gebruik van biomassa
	C1 Klimaatbestendig landelijk gebied voorkomen van wateroverlast en watertekort
	C2 Klimaatadaptieve land- en tuinbouwproductiesystemen
	C3 Waterrobuust en klimaatbestendig stedelijk gebied
	C4 Verbeteren waterkwaliteit
	D1 Waardering van voedsel
	D2 Gezonde voeding een makkelijke keuze
	D3 Veilige en duurzame primaire productie
	D4 Duurzame en veilige verwerking
	E1 Duurzame Noordzee
	E2 Natuur-inclusieve landbouw, visserij en waterbeheer in Caribisch Nederland
	E3 Duurzame rivieren, meren en intergetijdengebieden
	E4 Overige zeeën en oceanen
	E5 Visserij
	F1 Verduurzamen en kostenbeheersing uitvoeringsprojecten waterbeheer
	F2 Aanpassen aan versnelde zeespiegelstijging en toenemende weersextremen
	F3 Nederland Digitaal Waterland
	F4 Energie uit water
	ST1 Smart Agri-Horti-Water-Food
	ST2 Biotechnologie en Veredeling

Bijlage 2 TRL-categorieën

De detailcategorieën bestaan uit:

TRL 1 – basisprincipes zijn geobserveerd en gerapporteerd

TRL 2 – technologisch concept en/of toepassing is geformuleerd

TRL 3 – kritische functie of karakteristiek is analytisch en experimenteel bewezen

TRL 4 – component of experimenteel model is gevalideerd in laboratoriumomgeving

TRL 5 – component of experimenteel model is gevalideerd in relevante omgeving

TRL 6 – systeem/subsysteem model of prototype is gedemonstreerd in een relevante omgeving

TRL 7 – prototype van het systeem is gedemonstreerd in een operationele omgeving

TRL 8 – daadwerkelijk systeem is compleet en gekwalificeerd door test en demonstratie

TRL 9 – daadwerkelijk systeem is bewezen door succesvol operationeel bedrijf