

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Účinky hmyzího chitinu na laktobacily a jeho význam jako
prebiotika**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Marie Neprašová

Obor: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Účinky hmyzího chitinu na laktobacily a jeho význam jako prebiotika" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za podnětné připomínky a pečlivé vedení práce, a Ing. Kristýně Horváthové za pomoc v laboratoři.

Účinky hmyzího chitinu na laktobacily a jeho význam jako prebiotika

Souhrn

V posledních letech se jedlému hmyzu věnuje větší pozornost i mimo exotické oblasti, ve kterých si své místo dlouhodobě udržuje nejen jako pochutina, ale i jako součást tradiční stravy. Entomofágie má své kořeny v různých koutech světa, přičemž v posledních letech proniká i do západních zemí.

Cílem práce bylo zjistit, zda chitin obsažený v jedlém hmyzu může mít prebiotické účinky na rod *Lactobacillus* jako významného zástupce lidské mikrobioty. Ke zkoumání byly vybrány tři druhy hmyzu – cvrček domácí (*Acheta domestica*), mouční červi (larvy *Tenebrio molitor*) a švábi (*Blatta orientalis*) – které byly použity v kultivačních médiích jako jediné zdroje uhlíku. Z rodu *Lactobacillus* spp. byly vybrány kmeny *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* a *L. plantarum*. Po kultivaci v médiích byla nejprve měřena denzita, poté pro zpřesnění výsledků i absorbance. Na závěr byl proveden mikrobiologický rozbor, kterým byly potvrzeny předešlé metody. Vyhodnocení proběhlo pomocí *t*-testu, kdy byly hodnoceny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými typy médií.

Výsledky ze všech tří stanovení ukázaly, že hmyz jako jediný zdroj uhlíku nemá stimulační účinek na vybrané kmeny rodu *Lactobacillus*. Z dosažených výsledků je patrné, že před vlastním testováním je třeba důkladnější příprava hmyzí moučky, případně natrávení trávicími enzymy, což v této práci neproběhlo. Pouhé rozvaření v kultivačních médiích bylo nedostatečné pro případné zpřístupnění živin sloužících jako prebiotika pro laktobacily.

Klíčová slova: Laktobacilus; hmyz; chitin; prebiotika; probiotika

Effect of insect chitin on lactobacillus and function as a prebiotic

Summary

In recent years, there has been marked an increase of attention to edible insect even outside its natural exotic areas, in which for a long maintained its place as a delicacy, but also as a part of traditional diet. Entomophagy has its origin in various parts of the world, but in the past few years it has also penetrated into Western countries.

The aim of the study was to determine whether the chitin contained in edible insects can have prebiotic effects on the genus *Lactobacillus* as an important representative of the human gut microbiota. Three insect species were selected for investigation - the domestic cricket (*Acheta domestica*), mealworms (*Tenebrio molitor* larvae) and cockroaches (*Blatta orientalis*) - which were used in the culture media as the only carbon sources. Of the genus *Lactobacillus* spp. were selected strains of *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* and *L. plantarum*. After culturing in the media, first was measured the optical density, then the absorbance was used to refine the results. Finally, a microbiological analysis was performed, which confirmed previous methods. The evaluation was performed using a t-test, in which were evaluated statistically significant differences between each type of media.

The results from all three determinations showed that insects as the only carbon source have no stimulating effect on the selected strains of the genus *Lactobacillus*. From the achieved results it is evident that before the actual testing, a more thorough preparation of insect meal or digestion with digestive enzymes is necessary, which did not take place in this work. Mere boiling in culture media was insufficient to make available nutrients (especially chitin) that can serve as prebiotics for lactobacilli.

Keywords: Lactobacillus; edible insect; chitin; prebiotics; probiotics

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 Jedlý hmyz	9
3.1.1 Druhy jedlého hmyzu	9
3.1.2 Nutriční aspekty	10
3.1.3 Bezpečnost potravin.....	15
3.1.4 Úprava jedlého hmyzu	17
3.2 Chitin.....	18
3.2.1 Struktura chitinu	18
3.2.2 Izolace a hydrolýza	18
3.2.3 Metabolismus chitinu.....	20
3.2.4 Využití chitinu	20
3.2.5 Chitin jako prebiotikum.....	21
3.3 Mikrobiota	22
3.3.1 Vývoj mikrobioty během života	22
3.3.2 Vliv na zdraví	24
3.3.3 Složení střevní mikrobioty.....	25
3.3.4 <i>Lactobacillus</i> spp.	27
4 Materiál a metodika.....	29
4.1 Materiál.....	29
4.2 Metodika	30
4.2.1 Stanovení čistoty kmenů.....	30
4.2.2 Příprava hmyzu.....	30
4.2.3 Sledování růstu laktobacilů v médiu s obsahem hmyzu jako jediného zdroje uhlíku	30
4.2.4 Statistické vyhodnocení	32
5 Výsledky.....	33
6 Diskuze	35
7 Závěr	37
8 Literatura.....	38
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	47
10 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Jedlý hmyz v posledních letech dostává v rámci potravinářství své specifické místo. Dříve byl bráný jako potravina jen v exotických oblastech, ale v následujících letech může zaujmout významné místo ve výživě lidí i v západních zemích. Entomofágie zde pomalu nabývá na popularitě a jedlému hmyzu je věnována větší pozornost. Ve specializovaných obchodech je již možno si koupit potraviny, které jsou obohaceny o hmyz nebo se skládají přímo jen z hmyzu. Aktuálně se entomofágie ve vyspělých zemích může jevit jako určitý trend, který ale v následujících desítkách let bude mít předpoklad zaujmout významnou roli ve výživě lidí. S postupným nárůstem populace je předvídan nedostatek potravy pro významnou část populace, což by bylo možné řešit právě řízeným chovem jedlého hmyzu. Oproti klasické živočišné produkci skýtá významnou část pozitiv, jako je např. nenáročnost na zemědělskou půdu, nižší spotřeba vody či produkce skleníkových plynů. Jde o témata, která jsou stále více aktuální vzhledem k celosvětové ekologické situaci.

Ukazuje se, že mezi benefity jedlého hmyzu se řadí především jeho nutriční složení. Například druhy jsou velmi variabilní, ale obecně je jedlý hmyz bohatý na bílkoviny a tuky. Také je dobrým zdrojem železa či zinku. Další významnou živinou tvořící tělo členovců je chitin, který se řadí mezi nerozpustnou vlákninu. Jedlý hmyz je komplexní potravina, která v mnoha ohledech převyšuje aktuální konvenční potraviny. Mnohdy jsou mu i přičítány prebiotické účinky na lidskou mikrobiotu.

Vzhledem k možné modulaci mikrobioty pomocí stravy je žádoucí u nově zaváděných potravin na trh zjistit jejich účinek na lidskou střevní mikrobiotu. Lidská mikrobiota je velmi rozmanitá a ovlivňuje procesy v rámci trávicího traktu, ale i mimo něj.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Chitin přítomný v těle hmyzu, může pozitivně ovlivňovat růst střevního mikrobiomu a být tak prebiotikem.

Cílem práce je zjistit, jak chitin v těle jedlého hmyzu může ovlivňovat *in vitro* růst laktobacilů a mít tak prebiotický účinek.

3 Literární rešerše

3.1 Jedlý hmyz

Konzumace jedlého hmyzu neboli entomofágie je v mnoha kulturách běžná již několik tisíc let. Celosvětově téměř 2,5 miliardy lidí suplementuje část své stravy právě hmyzem (van Huis 2016). V tropických oblastech Afriky, Asie a Latinské Ameriky je jedlý hmyz považován za klasickou potravinu. V těchto zemích se hmyz konzumuje pravidelně, mnohdy je i součástí jejich denní stravy jako malá svačina. Většinou se upravuje vařením, sušením, opékáním nebo smažením (Melgar-Lalanne et al. 2019). Naopak u většiny Evropanů, nepůvodních Američanů, Kanadánů, Australanů a Novozélandčanů je entomofágie velmi vzácná, mnohdy odsuzovaná či přímo tabu (Shelomi 2015).

V budoucnu by jedlý hmyz mohl představovat významnou komoditu. Každoroční populační přírůstek se v posledních letech pohybuje mezi 1 a 2 %, což je tak vysoké množství, díky kterému v roce 2050 může být problém se zajištěním dostatku potravin pro světovou populaci. Celosvětové riziko malnutrice by mohla odvrátit právě konzumace hmyzu, který svým složením dokáže zajistit dostatek potřebných živin (zejména mikronutrientů) (van Huis 2013; Imathiu 2020). Jako další benefity hmyzu se uvádí dobrá konverze krmiva, nízká náročnost na zemědělskou půdu, nutriční komplexnost, nízké emise skleníkových plynů, nízké riziko zoonóz a v neposlední řadě také nízká spotřeba vody (van Huis 2013; Garino et al. 2019).

3.1.1 Druhy jedlého hmyzu

Odhaduje se, že se dá konzumovat téměř 2000 druhů hmyzu, které jsou požitelné v jakékoli jejich formě (Imathiu 2020). Mezi nejčastěji konzumované však patří jen několik druhů (Tabulka 1).

Tabulka 1: Procentuální zastoupení druhů hmyzu v celosvětové konzumaci (van Huis et al. 2013).

druh	latinský název	procentuální zastoupení
brouci	<i>Coleoptera</i>	31 %
housenky	<i>Lepidoptera</i>	18 %
mravenci, vosy, včely	<i>Hymenoptera</i>	14 %
sarančata, cvrčci, kobylky	<i>Orthoptera</i>	13 %
křísci a cikády	<i>Hemiptera</i>	10 %
vážky	<i>Odonata</i>	3 %
termiti	<i>Isoptera</i>	3 %
mouchy	<i>Diptera</i>	2 %
ostatní druhy		6 %

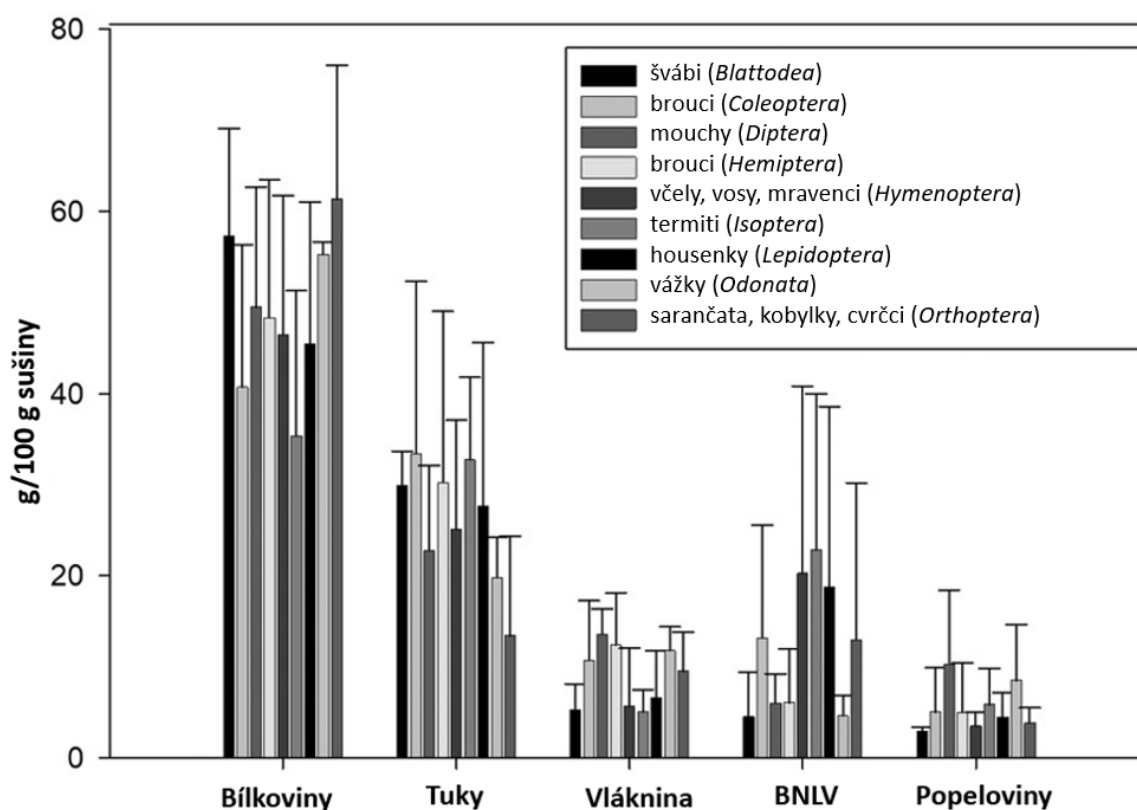
V rámci evropského kontinentu jsou nejvíce rozšířeni mouční červi, larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*), společně s cvrčkou (*Acheta domesticus*) (van Huis et al. 2013; Francis et al. 2019). Největší potenciál pro využití jako potraviny či krmiva v rámci EU mají společně s *A. domesticus* a larvami *T. molitor* druhy:

- moucha domácí (*Musca domestica*),
- bráněnka (*Hermetia illucens*),
- potemník brazilský (*Zophobas atratus*),
- potemník stájový (*Alphitobius diaperinus*),
- zavíječ voskový (*Galleria mellonella*),

- zavíječ malý (*Achroia grisella*),
- bourec morušový (*Bombyx mori*),
- cvrček krátkokřídlý (*Gryllex sigillatus*),
- saranče stěhovavá (*Locusta migratoria migratorioides*),
- saranče americká (*Schistocerca Americana*) (EFSA Scientific Committee 2015).

3.1.2 Nutriční aspekty

Nutriční složení i celková energetická hodnota se liší mezi jednotlivými druhy hmyzu. Také záleží na stádiu vývoje, krmivu a v neposlední řadě metodě zpracování (Rumpold & Schlüter 2013). Obecně se dá říct, že jedlý hmyz je bohatý především na bílkoviny, tuky a minerální látky (Obrázek 1) (Imathiu 2020).



Obrázek 1: Nutriční složení jedlého hmyzu (g/100 g sušiny). BNLV – bezdusíkaté látky výtahkové. Počet druhů podle řádů – *Blattodea*: 3, *Coleoptera*: 45, *Diptera*: 6, *Hemiptera*: 27, *Hymenoptera*: 45, *Isoptera*: 7, *Lepidoptera*: 50, *Odonata*: 2, *Orthoptera*: 51 (Rumpold & Schlüter 2013).

Energetická hodnota hmyzu je různorodá napříč jednotlivými druhy. Obecně je závislá na obsahu hlavních makronutrientů, zejména tuků. Larvy a kukly jsou obvykle energeticky bohatší než dospělí jedinci. Zpravidla hmyz obsahující vyšší procento bílkovin má nižší obsah tuku a zároveň i nižší energetickou hodnotu (Imathiu 2020). Dle Rumpold & Schlüter (2013) se průměrná energetická hodnota pohybuje v rozmezí 409 a 509 kcal/100 g. Nejvyšší obsah energie byl zjištěn v nočním motýlu *Phasus triangularis* (*Lepidoptera*), přes 700 kcal ve 100 g hmyzu. Finke (2002) analyzoval nejvíce používané druhy jedlého hmyzu, kde se na předních příčkách ohledně množství energie zařadily larvy potemníka brazilského (*Zophobas morio*) a mouční červi (larvy *T. mollitor*). Naopak nejméně energie obsahovaly larvy bource morušového (*B. mori*) (Tabulka 2). Obecně se dá říci, že obsah energie jedlého hmyzu je

srovnatelný s energetickou hodnotou masa (kromě hovězího díky jeho vysokému obsahu tuku) (Rumpold & Schlüter 2013).

Tabulka 2: Průměrná váha a bližší analýza složení (vztaženo k hmotnosti hmyzu) vybraných druhů hmyzu (Finke 2002).

	<i>Z. morio</i> (larva)	<i>T. molitor</i> (larva)	<i>B. mori</i> (larva)	<i>A. domesticus</i> (dospělec)
hmotnost(mg/hmyz)	610	126	1 045	465
vlhkost (%)	57,9	61,9	82,7	69,2
bílkoviny (%)	19,7	18,7	9,3	20,5
tuky (%)	17,7	13,4	1,4	6,8
vláknina (%)	6,6	8,2	2,2	10,0
popeloviny (%)	1,0	0,9	1,1	1,1
energie (kcal/100 g)	242,3	205,6	67,4	140,2

Bílkoviny

Hlavní část sušiny tvoří bílkoviny, díky čemuž může být hmyz považován za vhodnou alternativu tradičním potravinám živočišného původu (EFSA Scientific Committee 2015; Ghosh et al. 2017). Köhler et al. (2019) stanovili ve vzorcích hmyzu 27–54 g bílkovin (na 100 gramů). Nejméně bílkovin obsahovala housenka bource morušového (*B. mori*) a naopak nejvyšší obsah proteinů měl cvrček domácí (*A. domesticus*). Ve většině testovaných druhů z Jižní Koreje zaujímaly bílkoviny vysoký podíl sušiny (53,2 až 58,3 %) (Ghosh et al. 2017). Často se jedlý hmyz a jeho složení bílkovin dostává do srovnání s konvenčními potravinami, jako je maso, vejce či luštěniny (Tabulka 3). Konvenční zdroje jsou mnohdy považovány za drahé zdroje bílkovin, nadměrně využívané a také škodlivé pro životní prostředí. Mnohdy jsou živočišné bílkoviny nahrazovány rostlinnými, které mají ale značná negativa. Rostlinné bílkoviny nejsou považovány za plnohodnotné z důvodu nedostatku několika esenciálních aminokyselin a také jsou hůře stravitelné. Je tedy doporučeno kombinovat různé rostlinné proteiny pro kompletní a výživnou stravu. Konzumace hmyzu by v tomto hledisku mohla být zvýhodněná, protože hmyz obsahuje všechny esenciální aminokyseliny (Gravel & Doyen 2020).

Tabulka 3: Rozsah obsahu bílkovin v jedlém hmyzu druhu *Orthoptera* ve srovnání s konvenčními potravinami (g/100 g sušiny vzorku) (Blásquez et al. 2012).

druh	%
<i>Orthoptera</i>	43,9 ± 1,5 – 77,1 ± 2,8
konvenční potraviny	%
fazole	23,5 ± 1,0
čočka	26,7 ± 0,8
sója	41,1 ± 0,5
kuřecí maso	43,3 ± 0,6
vejce	46,0 ± 1,1
hovězí maso	54,0 ± 0,7
ryby	81,1 ± 0,8

Členovci se ukazují jako dobrý zdroj esenciálních aminokyselin, ačkoli některé druhy hmyzu jsou lehce pod doporučenou hodnotou sirnatých aminokyselin – methionin a cystein (Finke 2002). Ohledně zastoupení aminokyselin uvádí Köhler et al. (2019), že je nejvíce

obsažený leucin (1,7 až 4 g/100 g). Naopak nejmenší obsah byl u tryptofanu s hodnotami 0,23 g až 0,72 g/100 g. Esenciální aminokyseliny zaujímaly největší podíl bílkovin (44 %) u housenky bource morušového (*B. mori*), kdy nejvyšší podíl proteinů tvořily aminokyseliny histidin, lysin, methionin, fenylalanin a tryptofan. Naopak nejnižší procento esenciálních aminokyselin bylo detekováno v kobyлке *Patanga succincta* (33 %). Přesnější zastoupení esenciálních aminokyselin v určitých hmyzu je znázorněno v tabulce 4. Z neesenciálních aminokyselin byl nejvíce zastoupen tyrosin (až 5 g/100 g).

Tabulka 4: Zastoupení esenciálních aminokyselin u vybraných druhů hmyzu (Finke 2002).

	<i>Z. morio</i> (larva)	<i>T. molitor</i> (larva)	<i>B. mori</i> (larva)	<i>A. domesticus</i> (dospělec)
fenylalanin	0,68	0,66	0,27	0,65
isoleucin	9,3	9,4	3,0	9,4
leucin	19,1	19,9	4,9	20,5
lysin	10,3	10,2	4,4	11,0
methionin	2,1	2,4	1,3	3,0
threonin	7,8	7,7	2,9	7,4
tryptofan	1,8	1,5	0,7	1,3
valin	10,3	11,0	3,8	10,7

Limitující aminokyseliny jsou variabilní mezi druhy hmyzu. Tryptofan je limitující aminokyselinou u kobyلكy bombajské a cvrčka domácího, leucin u housenky bource morušového a sirmé aminokyseliny u poterníka moučného (Poelaert et al. 2018; Köhler et al. 2019). Kvalita bílkovin hmyzu byla zkoumána *in vivo* pomocí krysu a bylo zjištěno, že proteiny dvou druhů cvrčků (*A. domesticus* a *Anabrus simplex*) jsou rovnocenné nebo daleko lepší jak sójový protein vzhledem k aminokyselinovému skóre (Rumpold & Schlüter 2013). Hodnota PDCAAS (protein digestibility corrected amino acid score, aminokyselinové skóre upravené dle stravitelnosti bílkoviny) se dle Poelaert et al. (2018) pohybuje u *A. domesticus* a *T. molitor* v rozmezí 0,69 až 0,86. Ve srovnání s konvenčními živočišnými zdroji bílkovin se jedná o nižší hodnoty, ale oproti rostlinným zdrojům je hodnota PDCAAS hmyzí bílkoviny značně vyšší (Churchward-Venne et al. 2017).

Lipidy

Lipidy reprezentují druhou největší část nutrientů jedlého hmyzu. Vyšší obsah lipidů se zároveň pojí s vyšší energetickou hodnotou hmyzu. Jeho obsah se pohybuje v rozmezí 10 až 50 % sušiny (Jantzen et al. 2020). Dle Rumpold & Schlüter (2013) se průměrný obsah tuku pohyboval v rozmezí 13,41 % pro *Orthoptera* (kobyلكy, cvrčci, sarančata) až po 33,4 % pro řád *Coleoptera* (brouci, larvy). Procento tuku je mezi druhy a vývojovými stádii hmyzu variabilní, ale dá se všeobecně říct, že velmi vysoký obsah tuku mají larvy především díky jejich energetickým požadavkům v rámci vývoje (Payne et al. 2016). Tuky obsažené v hmyzu mohou pocházet buď z jeho diety nebo jsou hmyzem syntetizovány. Převážně se vyskytuje ve formě triacylglycerolů a minoritně se může vyskytovat cholesterol, parciální glyceridy, volné mastné kyseliny, fosfolipidy či estery vosku. Většina lipidů obsažených v hmyzu má tekutý charakter při pokojové teplotě (25 °C), proto se nazývají „hmyzí oleje“. Svým složením jsou bohaté na esenciální nenasycené mastné kyseliny, jako je linolová kyselina, α -linolenová kyselina a n-3 nenasycené mastné kyseliny (Jantzen et al. 2020).

Dle Otero et al. (2020) byly ve cvrčku domácím (*A. domesticus*) a moučných čvrčech (*T. molitor*) z mastných kyselin nejvíce zastoupené palmitová, olejová a linolová kyselina (Tabulka 5). Celkový obsah lipidů byl u *T. molitor* s 23,4 % oproti *A. domesticus* s obsahem tuku 13,7 %.

Tabulka 5: Zastoupení mastných kyselin v *A. domesticus* a *T. molitor* v g na 100 gramů methylesterů mastných kyselin (Otero et al. 2020).

mastné kyseliny	<i>A. domesticus</i> (dospělec)	<i>T. molitor</i> (larva)
14:0	1,28 ± 0,03	4,05 ± 0,04
16:0	22,84 ± 0,27	16,66 ± 0,09
16:1	1,69 ± 0,07	3,01 ± 0,11
18:0	4,65 ± 0,12	1,57 ± 0,04
18:1	20,91 ± 0,24	34,26 ± 1,26
18:2	48,00 ± 0,39	39,85 ± 1,23
20:0	0,15 ± 0,02	0,05 ± 0,01
20:1	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
22:0	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Σ SFA	29,33 ± 0,22	22,75 ± 0,10
Σ MUFA	22,68 ± 0,18	37,39 ± 1,27
Σ PUFA	48,00 ± 0,39	39,85 ± 1,23

SFA – nasycené mastné kyseliny, MUFA – mononenasycené mastné kyseliny, PUFA – polynenasycené mastné kyseliny

Poměr nasycených a nenasyčených mastných kyselin je variabilní stejně jako obsahu tuku. Rumpold & Schlüter (2013) udávají průměrný obsah SFA v rozmezí 30,83 % pro *Hymenoptera* až 41,97 % pro *Isoptera*. Mezi hlavní zástupce SFA u jedlého hmyzu patří palmitová (C16:0) a stearová kyselina (C18:0). Dle Payne et al. (2016) nejnižší obsah SFA bylo u druhů cvrčka a bource morušového v množství 2280 resp. 2300 mg (vztaženo na 100 g porci). Naopak nejvyšší obsah nasycených mastných kyselin byl zjištěn u larev *Rynchophorus ferrugineus* a termitů (17500 resp. 13900 mg). Procento obsahu hlavní frakce MUFA se pohybovala mezi hodnotami 22,0 % pro *Isoptera* a 48,6 % pro *Hymenoptera*. Největší zastoupení měly palmitoolejová (C18:1n-7) a olejová kyselina (C18:1n-9). Obsah PUFA tvořil 15,95 až 39,76 %. Z PUFA frakce se vyskytovaly zejména kyseliny linolová (C18:2n-6) a α -linolenová (C18:3n-3), dále pak také dihomogamma-linolenová (C20:3n-6) a arachidonová (C20:4n-6). Jedlý hmyz obsahoval pouze stopová množství eikosapentaenové adokosahexaenové kyseliny, takže se nedá považovat za zdroj bohatý na n-3 nenasyčené mastné kyseliny (Rumpold & Schlüter 2013).

Cholesterol je u jedlého hmyzu pouze minoritní složkou lipidů. Jeho obsah závisí především na typu krmiva, kterým je hmyz krměn. Dle studie Ramos-Bueno et al. (2016) byl cholesterol obsažen v rozmezí 24,8 mg v *Z. morio* a 82,6 mg/100 g sušiny v *T. molitor*.

Sacharidy

Obsah sacharidů je obecně nižší u hmyzu, který má měkkou tělesnou schránku. Hmyz s pevným exoskeletem vykazuje vyšší hodnoty vlákniny i celkově sacharidů. Sacharidy jedlého hmyzu jsou převážně tvořeny polysacharidy a hlavním zástupcem je chitin, který může zastupovat 25-40% podíl sušiny (Finke 2002).

Obsah vlákniny se dle Rumpold & Schlüter (2013) pohyboval v rozpětí 5,06 % (termity, *Isoptera*) do 13,56 % (praví brouci, *Hemiptera*). Procento obsahu ostatních sacharidů bylo v rozmezí 4,63 % pro *Odonata* až 22,84 % u *Isoptera*.

Mikronutrienty

Pro správný růst organismu a zajištění správných fyziologických funkcí je důležitý příjem mikronutrientů, protože se účastní různých metabolických procesů. Deficience mikronutrientů jsou naprosto běžné v rozvojových zemích a mohou mít za následek nepříznivé zdravotní následky, které přispívají ke zpomalení růstu, snížení imunity či zpomalení mentálního a fyzického vývoje (Zielińska et al. 2015). Z hlediska mikroživin jsou všechny druhy hmyzu značně unikátní (Tabulka 6), ale celkově se dá jedlý hmyz považovat za dobrý zdroj především esenciálních minerálních látek. Obsahuje všechny vitaminy a minerální látky, které jsou deficitní především ve stravě se sníženou konzumací masa a mléka. Jde o jeden z klíčových argumentů pro zařazení hmyzu do lidské stravy. Jedná se hlavně o železo, zinek, vápník, jód, vitamin B₁₂ a riboflavin (vitamin B₂) (van Huis 2013).

Tabulka 6: Obsah mikronutrientů ve vybraných druzích hmyzu uvedeno na porci o 100 g (Payne et al. 2016).

mikronutrient	<i>A. domesticus</i> (dospělec)	<i>T. molitor</i> (larva)
Na (mg)	163	51,2
Fe ¹ (mg)	6,11	2,47
Zn (mg)	11	6,05
Ca (mg)	99,6	77,5
I (mg)	0,021	0,017
vitamin B ₁₂ (g)	5,37	0,47
vitamin B ₂ (mg)	3,41	0,81

¹ Obsah Fe je vztažen k 12% biodostupnosti.

Z minerálních látek je jedlý hmyz především bohatý na železo a zinek. Obsah Fe se dá velmi dobře ovlivnit stravou hmyzu. Nejvyšší obsah Fe byl detekován u housenky *Gonimbrasia belina* v rozmezí 31-77 mg/100 mg sušiny, což je v porovnání s 6 mg Fe v 100 g sušiny hovězího masa až desetinásobná hodnota. Každodenní zařazení jedlého hmyzu ve výživě představuje účinné řešení prevence anémie v rozvojových zemích, kde deficiencí železa trpí každá druhá žena a zhruba 40 % dětí v předškolním věku. Stejně problematická je i deficience zinku, která by mohla být v některých zemích řešena stejně jako deficience železa. Obsah zinku byl u larev *Rhynchophorus ferrugines* 26,5 mg ve 100 g sušiny. Hovězí maso obsahuje v průměru 12,5 mg Zn na 100 g sušiny (van Huis et al. 2013).

Všichni bezobratlí také dle Finke (2002) obsahovali dostatečné množství fosforu a kalcia. Poměr Ca:P se pohyboval v rozmezí 1:3,6 u žížal až po 1:16,9 pro moučné červy. Nejvyšší množství hořčíku bylo zejména u zástupců řádů *Hemiptera* a *Orthoptera*. Obecně se ukazuje, že jedlý hmyz obsahuje jen nízké procento sodíku. Lze vyvodit závěr, že ačkoliv 100 g jedlého hmyzu postrádá dostatečné množství vápníku a draslíku, má potenciál poskytovat specifické mikroživiny, jako je měď, železo, hořčík, mangan, fosfor, selen a zinek. Dále díky nízkému obsahu sodíku by mohl být jedlý hmyz zařazen i do diety s nízkým obsahem Na (Rumpold & Schlüter 2013).

Ohledně biodostupnosti mikronutrientů byla provedena studie (Latunde-Dada et al. 2016), díky které bylo zjištěno, že jedlý hmyz (v tomto případě kobylky, cvrčci a mouční červi) ve srovnání se steakem z nízkého roštěnce vykazovaly značně vyšší chemickou dostupnost kalcia, mědi, hořčíku, manganu a zinku. Ukázalo se, že běžně konzumovaný hmyz by mohl být výborným zdrojem biologicky dostupných minerálních látek a mohl by být využíván jako účinný prostředek pro zvýšení příjmu minerálních látek ve stravě.

Z hlediska obsahu vitaminů se nejvíce vyjímá svým množstvím riboflavin, pantothenová kyselina a biotin. U řádů *Orthoptera* a *Coleoptera* je také ve vyšším množství obsažen folacin. Na druhou stranu jedlý hmyz není vhodný zdroj vitamínu A, E, C, niacinu a ve většině případů i thiaminu. Jedlý hmyz může být bohatý na určité vitaminy (Tabulka 7), ale druhy musí být speciálně vybrány pro poskytnutí požadovaných vitaminů. Popřípadě lze regulovat obsah vitaminů pomocí krmiva (Rumpold & Schlüter 2013).

Tabulka 7: Množství vybraných vitaminů v jedlém hmyzu (Payne et al. 2016)

vitaminy	<i>A. domesticus</i> (dospělec)	<i>T. molitor</i> (larva)
A (µg)	14,4	16,9
E ¹ (mg)	2,26	1,31
C (mg)	3	1,2
D (µg)	640	640
B ₁ (mg)	0,04	0,24
B ₃ (mg)	3,84	4,07
B ₅ (mg)	2,3	2,62
B ₇ (mg)	0,017	0,03
B ₉ (mg)	150	0,157

¹ d- α -tokoferol; 0,667 mg d- α -tokoferolu je ekvivalentem 1 IU vitamínu E

Kromě nutričního složení byly také zkoumány funkční benefity spojené s hmyzem. Bylo zjištěno, že hlavní funkční vlastnosti jsou retence vody a tuků, zahušťovací kapacita, emulgační kapacita, pěnivost a gelovací schopnost (Sosa & Fogliano 2017).

3.1.3 Bezpečnost potravin

Společně s chovem hmyzu vyvstává otázka ohledně potravinové bezpečnosti, stejně jako je tomu u ostatních potravin. Jelikož se jedlý hmyz chová převážně divoce a v rozvojových zemích, nemusí splňovat parametry pro západní země, zejména požadavky stanovené Evropskou unií. S definováním možných rizik by se zároveň mohl zvýšit zájem o jedlý hmyz.

Alergeny

První skupinou jsou alergenů, látky bílkovinné povahy schopné vyvolat imunitní reakci organismu. Doposud nejznámější alergická reakce na hmyz je vyvolaná štípnutím (zejména řád *Hymenoptera*) či přímým kontaktem (např. švábi) (Demain et al. 2010; Ribeiro et al. 2018). Také z hlediska potravinové alergie představuje hmyz určité riziko. Vzhledem k blízké taxonomické příbuznosti hmyzu a korýšů (*Crustacea*) se dá předpokládat, že může docházet ke zkřížené alergii. Francis et al. (2019) se zabývali arginin kinasou, která je přítomná jak v korýších, tak ve hmyzu. Na arginin kinasu obsaženou v těle cvrčka domácího (*A. domestica*) reagovalo 21 % testovaných lidí, naopak na arginin kinasu z potměníka moučného (*T. molitor*) nebyla zjištěna žádná specifická reakce.

Společně s rozvojem entomofágie v západních zemích se během následujících let dá očekávat, že zároveň vzroste riziko vzniku alergie na jedlý hmyz z důvodu vyšší přímé expozice. Pro stálé zařazení hmyzu do jídelníčku lidí z vyspělých zemí bude důležité v budoucnu specifikovat možná rizika alergenicity hmyzu.

Rezidua pesticidů

Riziko reziduí pesticidů je důležitou otázkou u divoce žijícího hmyzu. Hmyz není hlídáný, může migrovat i na pole, kde jsou aplikovány pesticidy, a žít se takto ošetřovanými plodinami. Tělo hmyzu může kumulovat rezidua a způsobovat chronickou toxicitu u svých konzumentů. Společně s farmovým chovem se dá ale toto riziko minimalizovat či mu naprosto předcházet (Imathiu 2020).

Mykotoxiny

Mykotoxiny, sekundární metabolity mikroskopických hub, jsou hlavním kontaminantem potravin. Dle van Huis et al. (2013) detekované mykotoxiny obsažené v jedlém hmyzu mohou pocházet jak z kontaminovaného krmného substrátu, tak mohou být produkovány ve střevch hmyzu. Nejčastěji se vyskytují rody *Fusarium*, *Aspergillus* a *Penicillium*. Mykotoxiny představují velký problém bezpečnosti potravin zejména kvůli akutním a chronickým účinkům, které mohou mít na zdraví zvířat a lidí.

Nejčastěji vyskytovaný druh mykotoxinů jsou aflatoxiny produkované již zmíněnými rody. Aflatoxiny byly izolovány jak z čerstvého, tak ze zpracovaného jedlého hmyzu (Musundire et al. 2016). V Zambii dokonce obsah aflatoxinů v některých druzích dosahoval národní regulační limit 10 µg/kg. Všechny měřené druhy hmyzu ale nesplňovaly limitní obsah, který platí v Evropské unii, tj. vzorky obsahovaly nad 4 µg/kg (Kachapulula et al. 2018).

Antinutriční látky

Jedná se o antinutriční faktory, které se přirozeně vyskytují v potravinách a inhibují příjem, trávení, vstřebání či utilizaci živin. Dle Ekop et al. (2010) zkoumaný hmyz z Nigérie obsahoval čtyři antinutrienty – tannin, oxalát, hydrokyanid a fytát. Další detekované antinutriční látky v jedlém hmyzu jsou saponiny a alkaloidy (Musundire et al. 2014). Pro rozšíření konzumace hmyzu je nutné zjistit, jaké antinutriční látky jsou přítomné v jednotlivých druzích hmyzu pro následné navrhnutí způsobu jejich eliminace před konzumací, pro celkové vyhnutí se rizikovým druhům nebo konzumace alternativního druhu (Imathiu 2020).

Těžké kovy

Těžké kovy jsou považovány za systémové toxikanty, které mohou způsobit poškození několika orgánů již při expozici malým dávkám, a zároveň se řadí mezi karcinogeny. Patří mezi ně olovo, kadmium, arsen a rtuť. Jedná se o kovy, které jsou schopny působit toxicky již v nízkých koncentracích (Jan et al. 2015). Možná akumulace těžkých kovů v jedlém hmyzu záleží na mnoha faktorech zahrnující druh hmyzu, fáze vývoje či krmivo (EFSA Scientific Committee 2015). Nejvíce obávaným rizikem je kadmium společně s arsenem kvůli potenciální kumulaci v *H. illucens* a žlutých moučných červech, což jsou druhy, o které je v západních zemích značný zájem (van der Fels-Klerx et al. 2018).

Patogenní mikroorganismy

Vědeckých studií (Osimani et al. 2017; Garofalo et al. 2017; Vandeweyer et al. 2017), které by se zabývaly mikrobiální kontaminací jedlého hmyzu, je zatím velmi málo, ale jedná se o oblast, které se v poslední době dostává vyšší pozornosti. Data ukazují, že mohou být v jedlém hmyzu přítomny mikroorganismy jak patogenní, tak hmyzu vlastní. Rozsah kontaminace se odvíjí od několika faktorů jako je druh hmyzu, původ hmyzu, použité postupy zpracování a manipulace v průběhu přípravy a hygienické postupy (Rumpold & Schlüter 2013). Je zapotřebí zajistit hygienické postupy produkce, zpracování a konzervace, které mají za cíl snížit riziko šíření mikrobiální látek způsobující alimentární onemocnění.

Hmyz představuje velké zdravotní riziko v zemích, kde se konzumuje v syrovém stavu. Patogenní mikroorganismy, které jsou často spojovány s alimentárními onemocněními, byly izolovány v mnoha druzích jedlého hmyzu. Záznamy o mikrobiálních infekcích a intoxikacích pocházejících z entomofágie (Durst et al. 2010) ukazují, že je nutné podpořit účinné a správné hygienické postupy v celém řetězci produkce jedlého hmyzu pro ochranu zdraví spotřebitelů. V jedlém hmyzu, jež byl prodáván v Thajsku, byla zjištěna přítomnost potenciálně pro člověka patogenních bakterií především zástupci rodů *Vibrio*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* a *Bacillus* (Osimani et al. 2017). Nejčastěji se v jedlém hmyzu vyskytovaly patogenní bakterie rodů *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Shigella* a *Clostridium* (Mézes 2018; Ssepuyua et al. 2019).

3.1.4 Úprava jedlého hmyzu

Pro minimalizaci rizik spojených s konzumací hmyzu je doporučeno jej před konzumací tepelně upravit. Dle Ministerstva zemědělství (2018) má nejdříve dojít k usmrcení hmyzu, kdy mezi nejčastější metody se řadí zmrazení, suché zmrazení, drcení, zadušení CO₂, ponoření do vroucí vody či usmrcení horkou párou. Všechny produkty hmyzu určené pro lidskou konzumaci by měly být dále podrobeny tepelnému ošetření (minimálně pasterací).

Společně s tepelnou úpravou vyvstává otázka ohledně změny nutriční hodnoty. Dle Poelaert et al. (2018) se ukazuje vaření hmyzu při 200 °C po dobu 10 min jako nejvhodnější tepelná úprava, která zachovává jeho vysokou nutriční hodnotu. Obecně zpracování hmyzu jako je pražení, napařování, smažení, sušení a vaření se obvykle doporučuje ke zlepšení bezpečnosti, chutnosti, ale dochází i k zachování kvality (Williams et al. 2016). Tyto metody zpracování, které jsou velmi zřídka kontrolovány v oblastech, kde je jedlý hmyz tradičně konzumován, mohou negativně ovlivnit stravitelnost a využitelnost živin (Imathiu 2020). Manditsera et al. (2019) zkoumali stravitelnost a využitelnost proteinů a minerálních látek po tepelné úpravě hmyzu. Hmyz upravili vařením, pečením nebo kombinací obou technik, čímž imitovali tradiční úpravu využívanou v Zimbabwe. Vařením došlo k 50% poklesu obsahu železa a zinku. Zároveň syrový hmyz měl vyšší *in vitro* stravitelnost proteinů než hmyz upravený vařením nebo pečením. Snížení stravitelnosti a využitelnosti proteinů i minerálních látek může být způsobeno modifikací proteinů a interakcí minerálních látek s ostatními nutrienty, jako je chitin nebo fytochemikálie.

Je důležité zmínit, že mechanismy pro možné zlepšení stravitelnosti a biologické dostupnosti živin jedlého hmyzu po tepelných úpravách nejsou stále dobře prozkoumány jako je to u tradičních potravin (např. hovězí maso a jiné druhy živočišných bílkovin). Tato oblast

stále není dostatečně popsána a rozhodně by tato část entomofágie měla být důkladněji prozkoumána (Imathiu 2020).

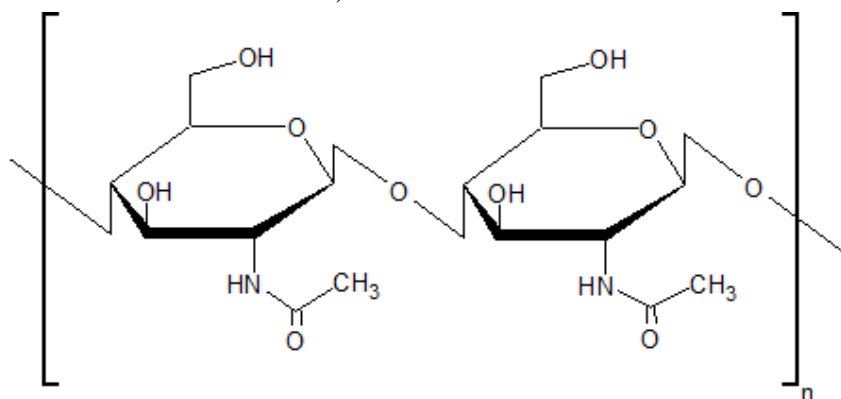
3.2 Chitin

Chitin je ve vodě nerozpustný polysacharid. Jedná se o netoxický, biodegradabilní a biokompatibilní polymer se špatnou rozpustností v neutrálním pH (Jung & Park 2014).

Tento biopolymer je syntetizován enormním množstvím živých organismů a společně s celulózou patří mezi nejhojněji vyskytované přírodní polymery. Je strukturální složkou buněčných stěn bakterií a hub, ale i exoskeletu korýšů (Gopalakannan & Arul 2006) a hmyzu (Lee et al. 2008). V rámci říše rostlin a živočichů zajišťuje výztuž a pevnost (Rinaudo 2006). V této době jsou hlavním komerčním zdrojem chitinu krunýře krabů a krevet (Younes & Rinaudo 2015).

3.2.1 Struktura chitinu

Chemickou strukturou chitinu je lineární polysacharidový řetězec tvořený N-acetylglukosaminovými jednotkami, které jsou spojené β -(1 \rightarrow 4)-glykosidickou vazbou (Obrázek 2) (Elieh Ali Komi et al. 2018).



Obrázek 2: Vzorec chitinu.

V závislosti na jeho zdroji se vyskytuje ve třech variantách – α , β a γ forma (Rinaudo 2006). Formy lze rozlišit pomocí infračervené a NMR spektroskopie pevného stavu společně s rentgenovými paprsky. Ve všech strukturách jsou chitinové řetězce uspořádány do listů, které jsou mezi sebou silně vázány vodíkovými můstky. Nejvíce mezimolekulových vodíkových můstků má alfa a gama chitin, kterým zajišťují větší stabilitu (Kaya et al. 2017). Dle krystalografických parametrů se α -chitin sestává ze dvou antiparalelních jednotek, zatímco u β -chitinu jsou řetězce uspořádány paralelně. Častěji vyskytovaný α -chitin je přítomen v houbových a kvasinkových buněčných stěnách nebo zpevňuje krunýře krevet či kutikulu hmyzu. Vzácnější β -chitin se vyskytuje společně s proteiny v tělní opoře chobotnic a γ -chitin se vyskytuje především u hub (Rinaudo 2006).

3.2.2 Izolace a hydrolýza

Chitin je syntetizovaný intracelulárně chitin-syntázou, následně je přenesen přes plazmatickou membránu, kde splyne za vzniku tuhých krystalů, které nakonec formují chitinové části organismů (Cohen 2001). Hydrolýzu chitinu na N-acetylglukosaminové

(GlcNAc) jednotky zajišťují dva enzymy – chitináza a β -N-acetylglukosaminidáza (Purushotham et al. 2012).

Chitin se získává především z kutikul různých korýši, hlavně krabů a krevet. Obsah chitinu se mezi jednotlivými druhy organismů značně liší. Pohybuje se v rozmezí 16-23 % v krunýři humrů, 25-30 % v krunýři krabů, 18-38 % v kutikule švábů, 20-44 % v bourci morušovém, 8-43 % v buněčných stěnách hub (Jones et al. 2020). U korýšů chitin tvoří komplexní síť s proteiny, na kterou se ukládá uhličitan vápanetý a tím vzniká pevný krunýř. Izolace chitinu z měkkýšů zahrnuje odstranění dvou hlavních konstituentů schránky. Dochází k deproteinizaci a demineralizaci. Během těchto kroků se také odstraňují pigmenty a látky lipidové povahy, v některých případech se přidává další krok dekolorizace pro zbavení se reziduí pigmentů. Během let bylo objeveno několik možných postupů izolace, ale žádná nebyla standardizována. Deproteinizace i demineralizace mohou být zajištěny chemicky či enzymaticky, a to v různém pořadí. U mikrobiální fermentace dochází k těmto krokům zároveň (Younes & Rinaudo 2015).

Během deproteinizace dochází k narušení chemických vazeb mezi chitinem a proteiny. Chemická deproteinizace se dosahuje pomocí chemických sloučenin. Nejvíce preferovaný je zejména NaOH, který se aplikuje v koncentraci 0,125 až 5 M při různé teplotě a různé délce procesu. Dále se využívá např. Na_2CO_3 , NaHCO_3 , KOH, K_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, Na_2SO_3 aj. Použití chemické deproteinizace pomocí NaOH má za následek částečnou deacetylaci chitinu a hydrolýzu biopolymeru, kdy je snižována jeho molekulová hmotnost, a celkově jsou narušeny fyzikálně-chemické vlastnosti chitinu. Zejména z tohoto důvodu se začalo usilovat o jiný způsob izolace. Velká pozornost se zaměřila na biologickou deproteinizaci, kdy se využívají proteolytické enzymy či procesy fermentace. Proteolytické enzymy jsou především z rostlinných, mikrobiálních a živočišných zdrojů. Mnoho proteas (alkalasa, pepsin, papain, pankreatin, devolvasa, trypsin) odstraňuje proteiny a zároveň je minimalizován proces deacetylace a depolymerizace (Younes & Rinaudo 2015).

Manni et al. (2010) srovnávali izolaci chitinu z krunýřů krevet prostřednictvím alkalických proteas *Bacillus cereus* SV1 a využitím roztoku NaOH o koncentraci 1,25 M. Krunýře byly následně demineralizovány roztokem HCl. Obsah reziduálních proteinů byl značně vyšší u chitinu izolovaného pomocí enzymů oproti úpravě NaOH (10 % resp. 6 %). Younes et al. (2012) porovnávali proteasy napříč mikroorganismy. Byly použity mikrobiální proteasy *Bacillus mojavensis* A21, *Bacillus subtilis* 126, *B. licheniformis* NH1, *B. licheniformis* MP1, *Vibrio metschnikovii* J1 a *Aspergillus clavatus* ES1. Nejvyššího stupně deproteinizace bylo dosaženo proteasou *B. mojavensis* A21, která dosáhla až 76 %. Pokud je aplikována enzymatická deproteinizace, minerální látky v kutikule mohou snižovat přístupnost pro proteasy a tím i ovlivnit účinnost celkové deproteinizace. Z toho důvodu je výhodné nejdříve provést demineralizaci a až následně deproteinizaci.

Chitosan

Neznámější derivát, chitosan, vzniká enzymatickou nebo chemickou deacetylací chitinu, která probíhá v alkalických podmínkách (Elieh-Ali-Komi & Hamblin 2016). Stupeň deacetylace chitinu musí dosáhnout okolo 50 % a tím je dosaženo i rozpustnosti ve vodním kyselém prostředí. V pevném stavu se jedná o semikrystalický polymer. Jeho vlastnosti se ve značné míře prolínají s vlastnostmi chitinu – je biokompatibilní, netoxický, nealergenní,

hydrofilní a biodegradabilní v lidském těle. Chitosan se používá v mnoha odvětvích. Jeho použití k výrobě nanonosičů a zajištění mikroenkapsulace se stále zkoumá zvláště v oblasti podávání léků, biologických látek a vakcín (Younes & Rinaudo 2015).

Chitosan s jeho deriváty působí v organismu jako antioxidant. Zachycují kyslíkové radikály, jako jsou hydroxylové, superoxidové, alkylové. Chitosan a jeho deriváty prokazují protinádorovou aktivitu zkoumané metodou *in vitro* i *in vivo*. Studie zkoumající účinky chitosanu *in vivo* ukazuje, že chitosan inhibuje růst nádorových buněk pomocí účinků posilujících imunitu. Došli k závěru, že pozorovaná protinádorová aktivita nebyla způsobena přímým usmrcením, nýbrž zvýšením produkce lymfokinů vedoucí k proliferaci cytolytických T-lymfocytů (Dass & Choong 2008).

Ukazuje se ale, že chitosan může působit na organismus i negativně. Dle Queiroz et al. (2014) chitosan stimuluje tvorbu ledvinových kamenů. *In vitro* působil chitosan jako induktor hlavně tvorby krystalů z kalciumoxalát monohydrátu. Zároveň chitosan modifikoval morfologii a velikost těchto krystalů a měnil jejich povrchový náboj, čímž se stával pozitivnější, což může usnadnit interakci těchto krystalů s ledvinovými buňkami.

3.2.3 Metabolismus chitinu

Chitin může být degradován chitinázami, které patří mezi hydrolytické enzymy a štěpí β -(1 \rightarrow 4)-glykosidickou vazbu chitinu (Madan et al. 2020). V přírodě jsou zdrojem chitináz zejména bakterie, viry, plísně, hmyz, rostliny a savci. I když lidský organismus není schopen sám syntetizovat chitin, jeho genom exprimuje určité chitinázy, které mohou specificky degradovat chitin při setkání během inhalace nebo požití, čímž vykazují antipatogenní funkce v rámci dýchací soustavy a gastrointestinálního traktu (Di Rosa et al. 2016).

Chitinázy mohou být dále klasifikovány na endochitinázy a exochitinázy dle jejich mechanismu účinku, tj. jestli jsou endolytické nebo exolytické. Endochitinázy zahrnují chitotriosidázu, chitinázu 1 a kyselou savčí chitinázu. Je pro ně specifické štěpení polymeru na náhodných vnitřních místech. Mezi zástupce exochitináz patří chitobiosidáza. Rovněž také byly identifikovány soubory enzymů, které částečně nebo úplně postrádají katalytické místo (Madan et al. 2020). V posledních letech se vědci mimo jiné zaměřují i na roli chitináz jako biomarkerů pro zánětlivá, autoimunitní, zubní, neurologická, metabolická onemocnění či syndromu polycystických ovárií (PCOS), endometriózy nebo nádorových onemocnění (Nagpure et al. 2014).

Chitinázy mají široké spektrum využití. Používají se na přípravu farmaceuticky významných chitooligosacharidů (COS) a N-acetyl-D-glukosaminů, izolaci protoplastů z hub a kvasinek, kontrolu patogenních hub či při hubení komárů (Javed et al. 2013).

3.2.4 Využití chitinu

Díky jeho unikátním biochemickým vlastnostem (biokompatibilita, biologická rozložitelnost, netoxicity, schopnost vytvářet filmy apod.) našel své využití v biomedicíně. V rámci nanotechnologie se také čím dál tím častěji využívají materiály na bázi chitinu nebo chitosanu (Elieh-Ali-Komi & Hamblin 2016). Své využití nachází jako biodegradabilní obal či enzymový imobilizér v potravinářském průmyslu. Dále se používá v papírenském průmyslu (Song et al. 2018) či lékařství, kde se využíval jako vakcínové adjuvans nebo pro výrobu vstřebatelných stehů (Pokhrel et al. 2016).

3.2.5 Chitin jako prebiotikum

Chitin je považován za nerozpustnou vlákninu a může mít antinutriční povahu. Váže na sebe lipidy, lipofilní vitaminy a minerální látky. Chitin disponuje nízkou toxicitou a je inertním v gastrointestinálním traktu savců (Köhler et al. 2019).

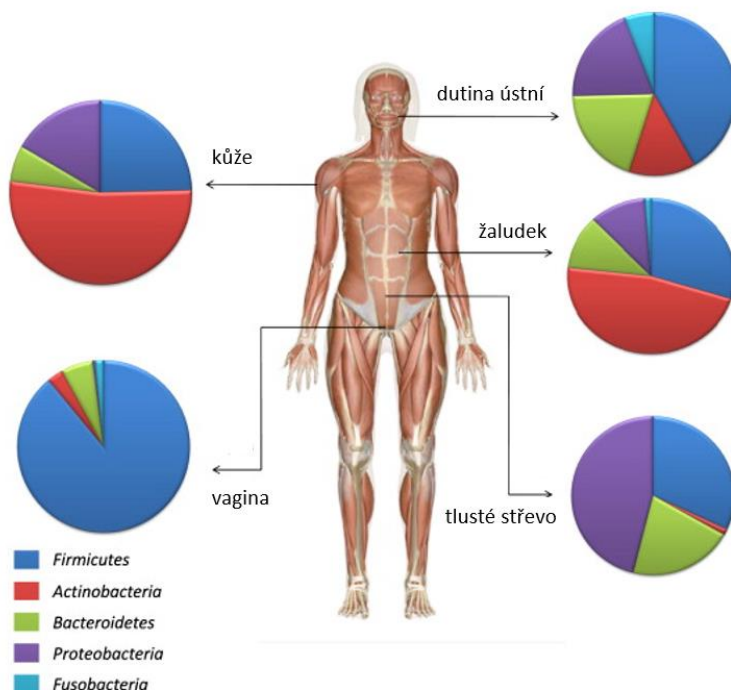
Za vlákninu se považují poly- či oligosacharidy, které nejsou tráveny ani absorbovány v tenkém střevě, ale k jejich rozkladu slouží bakterie ve střevě tlustém. Vlákna se vyskytuje zejména v potravinách rostlinného původu (ovoce, zelenina, celozrnné výrobky apod.). Dělí se na rozpustnou a nerozpustnou. Mezi rozpustnou vlákninu se řadí pektin, gumy, slizy, fruktany a některé odolné škroby. Na druhé straně nerozpustnou vlákninu zastupuje hlavně lignin, celulóza, hemicelulóza či již zmíněný chitin. Nerozpustná vlákna je obsažena především v celozrnných potravinách, otrubách, ořechách či semenech. Mezi její pozitivní účinky patří její laxativní efekt, kdy snižuje dobu průchodu střevem a zvyšuje objem stolice, čímž podporuje pravidelnost trávení (Soliman 2019).

Ačkoli jsou všechna prebiotika považována za vlákninu, ne všechna vlákna může sloužit jako prebiotikum (Slavin 2013). Prebiotika jsou definována jako selektivně fermentovaná složka stravy, která vede ke specifickým změnám ve složení a/nebo aktivitě gastrointestinální mikrobioty, čímž přináší výhody pro zdraví svého hostitele (Gibson et al. 2010). Pro klasifikaci vlákniny jako prebiotika musí být rezistentní hydrolyze lidskými enzymy, měla by být odolná vůči žaludeční kyselosti, fermentovatelná střevní mikrobiotou a zároveň musí selektivně stimulovat střevní mikrobiotu (Soliman 2019). Hlavní skupiny prebiotik jsou především fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy (Davani-Davari et al. 2019).

Vzhledem k nestravitelnosti chitinu může být považován za vlákninu, jeho prebiotické predispozice ale nejsou tolik jednoznačné. Funkční schopnosti byly spíše zkoumány na jeho derivátech, chitosanu či COS (Mateos-Aparicio et al. 2016; Selenius et al. 2018). Chitin a především jeho deriváty pomáhají udržovat vyvážené a zdravé složení střevní mikrobioty, čímž mohou ovlivnit průběh střevních chorob a poruch trávení (Carroll et al. 2012; Quigley 2013). Vyvážené složení udržuje nízké množství potenciálně škodlivých bakterií a tím se snižuje riziko vzniku střevních onemocnění (Macfarlane & Macfarlane 2012). Účinky prospěšných střevních bakterií na zdraví se obecně připisují vyloučení konkurenčních nežádoucích bakterií. Bylo zjištěno, že chitin a jeho deriváty disponují antibakteriální aktivitou, která se výrazně projevuje vůči nežádoucím rodům (Fernandes et al. 2008). Jedná se zejména o *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae* a *Salmonella typhimurium* (Raut et al. 2016). Chitin a jeho deriváty inhibují růst těchto nežádoucích a neprospěšných bakterií, čímž umožňují množení prospěšných druhů střevních bakterií rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Selenius et al. 2018). Studií Mateos-Aparicio et al. (2016) bylo zjištěno, že COS mají přímé prebiotické účinky na kmeny laktobacilů a bifidobakterií. Jejich účinky jsou závislé na molekulární hmotnosti a stupni acetylace. Mimo jiné také COS vykazují funkci návnadových molekul, které zabraňují adhezi *E. coli* nebo jiných škodlivějších bakterií k epitelu GIT (Shoaf et al. 2006).

3.3 Mikrobiota

Mikroorganismy se vyskytují v různých částech lidského těla, jedná se zejména o gastrointestinální trakt (GIT), kůži, vaginu, sliny a zubní plak, kde v každé části má jiné zastoupení bakterií (Obrázek 3) (Sender et al. 2016).

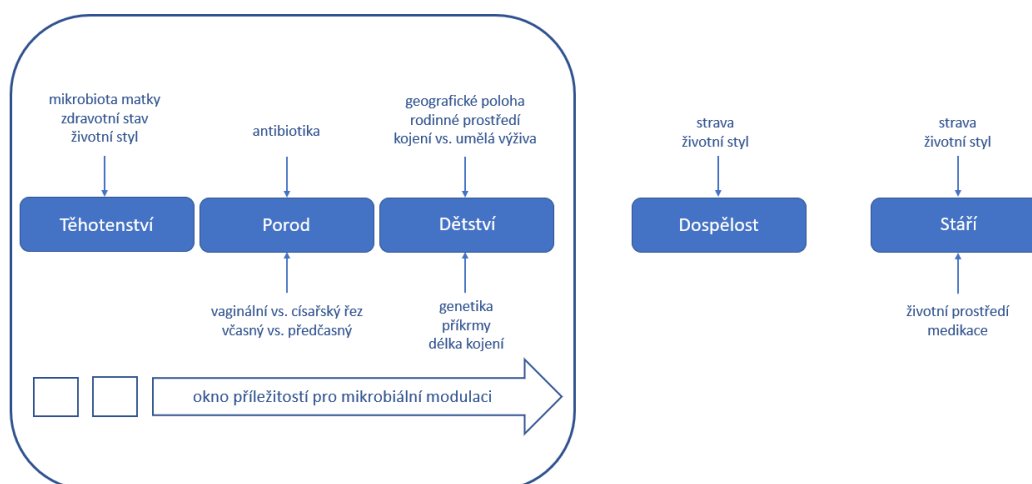


Obrázek 3: Zastoupení kmenů v různých částech lidského těla (Sankar et al. 2015).

Lidský GIT obsahuje složitou a dynamickou populaci mikroorganismů, označovanou jako střevní mikrobiota, která má významný vliv na hostitele během homeostáze a nemoci. Počet mikroorganismů osidlující GIT se odhaduje na 10^{14} buněk, což je zhruba $10\times$ více bakteriálních buněk, než je počet buněk lidských (Thursby & Juge 2017). Nedávná studie Sender et al. (2016) ale ukazuje, že poměr lidských a bakteriálních buněk je ve skutečnosti blíže poměru 1:1.

3.3.1 Vývoj mikrobioty během života

Založení lidské mikrobioty začíná již při porodu. Jedná se o první faktor, který ovlivňuje následné složení mikrobioty (Obrázek 4). Pokud se jedná o přirozený vaginální porod, GIT novorozence nejprve osidlují rody *Lactobacillus* a *Prevotella*, které jsou typické pro vaginální prostředí, a převládají v mikrobiotě první dny života (Rodríguez et al. 2015). Naopak u novorozenců rozených císařským řezem je mikrobiota zpožděna v kolonizaci rodu *Bacteroides*, ale je kolonizována fakultativními anaeroby, např. druh *Clostridium* (Jakobsson et al. 2014). V raných stádiích vývoje má mikrobiota obecně nízkou rozmanitost a dominují hlavně dva kmeny – *Actinobacteria* a *Proteobacteria*. Během prvního roku života se zvyšuje mikrobiální diverzita a složení mikrobioty se postupně formuje mikrobiota podobná profilu té dospělé. Okolo 2,5 roku věku se složení, rozmanitost a funkční schopnosti dětské mikrobioty vyrovná dospělé (Rodríguez et al. 2015).



Obrázek 4: Vlivy na formování mikrobioty v průběhu života (Rodríguez et al. 2015).

Další vliv podílející se na formování mikrobioty je typ stravy kojence, zda je plně kojen či je krmen umělou výživou. U kojených dětí v mikrobiotě převládají rody *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. U kojenců krmenných umělou výživou dominují ve střevě *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridia* a *Streptococcus*. Mateřské mléko obsahuje nestravitelné oligosacharidy mateřského mléka, které právě bifidobakterie a laktobacily snadno rozkládají (Jandhyala et al. 2015).

Strava zůstává nejdůležitějším určujícím činitelem při formování složení a rozmanitosti i po celou dobu dospělosti. Obecně se příjem stravy bohaté na ovoce, zeleninu a vlákninu spojuje s vyšším bohatstvím a rozmanitostí střevní mikrobioty. Jedinci konzumující převážně rostlinnou stravu mají vyšší výskyt mikroorganismů metabolizujících nerozpustné sacharidy. Jedná se zejména o kmen *Firmicutes* a pod něj patřící *Ruminococcus bromii*, *Roseburia* a *Eubacterium rectale* (Walker et al. 2011). Dle David et al. (2014) bylo prokázáno, že již čtyřdenní zařazení živočišné stravy vede ke snížení množství zástupců *Firmicutes* a zároveň zvýšení organismů tolerantních vůči žluči, jako je *Alistipes* spp. a *Bacteroides* spp. z kmene *Bacteroidetes* a *Bilophila* spp. z kmene *Proteobacteria*. Tím se nabízí, že i velmi krátkodobé dietní změny mohou mít podstatný vliv na střevní mikrobiotu.

Podstatný vliv na složení mikrobioty má také věk. S postupem času se v životě skladba mikrobioty značně mění. Ve věku jednoho roku je dětská mikrobiota bohatá na bakterie *Akkermansia muciphila*, *Bacteroides*, *Veillonella* či *Clostridium coccooides* a *Clostridium botulinum*. Diverzita mikrobioty se s věkem zvyšuje, až se z ní stane stabilní složení mikrobioty dospělé, které dominují tři hlavní bakteriální kmény: *Firmicutes* (čeledě *Lactobacillaceae* a *Ruminococcaceae*), *Bacteroidetes* (čeledě *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* a *Rikenellaceae*) a *Actinobacteria* (čeleď *Bifidobacteriaceae*) (Tidjani Alou et al. 2016). U lidí starších 70 let může být složení střevní mikrobioty ovlivněno změnami trávení a vstřebávání živin či slabší imunitní aktivitou. Vzhledem k roli *Bifidobacterium* spp. při stimulaci imunitního systému a metabolických procesů může pokles bifidobakterií u starších jedinců částečně vysvětlit podvýživu a nízký stupeň zánětlivého stavu, který může vést k závažnějším patologickým stavům (zánětlivé onemocnění střev, karcinom kolorekta) (Magrone & Jirillo 2013).

V dospělosti mikrobiotu formuje také případná léčba pomocí antibiotik, díky jejich bakteriostatickým či bakteriocidním účinkům se používají především proti patogenním

bakteriím. Nicméně užívání antibiotik má krátkodobé i dlouhodobé účinky na mikrobiální rovnováhu. Bylo prokázáno, že klindamycin (Jernberg et al. 2007), klarithromycin a metronidazol (Jakobsson et al. 2010), a ciproflaxin (Dethlefsen & Relman 2011) ovlivňují strukturu mikrobioty po různou dobu. Narušením rovnováhy mikrobioty vzniká dysbióza, která může paradoxně zvýšit riziko následných infekcí (Taur et al. 2018).

Při utváření mikrobioty byly v různých studiích také zahrnuty jiné faktory prostředí, včetně zeměpisné polohy (Moeller & Ochman 2013), kouření (Biedermann et al. 2013), deprese (Dinan & Cryan 2013) či prostředí bydliště (město vs. venkov) (Tyakht et al. 2013).

3.3.2 Vliv na zdraví

Složení střevní mikrobioty je velmi variabilní a samotná variace je považována za fyziologickou v kontextu zdravé střevní mikrobioty dle již zmiňovaných faktorů (věk, strava atd.). Tyto fyziologické variace střevní mikrobioty však mají obrovské důsledky pro intestinální a extraintestinální poruchy. Dysbióza může být příčinou nebo důsledkem různých poruch (Tabulka 8) (Rinninella et al. 2019). Mikrobiota má mnoho benefitů vůči svému hostiteli. Jednou z nejdůležitějších rolí těchto mikroorganismů je pomáhat udržovat integritu slizniční bariéry, poskytovat živiny, jako jsou vitaminy (zejména vitamin B₁₂), nebo chránit před patogeny. Kromě toho je interakce mezi komenzálními mikroorganismy a slizničním imunitním systémem zásadní pro správnou imunitní funkci (Thursby & Juge 2017).

Tabulka 8: Komunikace intestinální mikrobioty s periferními orgány a vliv na procesy ve zdraví a nemoci (Schroeder & Bäckhed 2016).

Orgán	Ovlivněný proces	Nemoc spojována s dysbiózou	Zdroj
tuková tkáň	velikost adipocytů	obezita	(Alard et al. 2016)
	termogeneze	inzulinová rezistence	(Chevalier et al. 2015)
	zánět		(Caesar et al. 2015)
játra	metabolismus žlučových kyselin		
	lipogeneze	NAFLD	(Sayin et al. 2013)
pankreas	energetický výdej		
	sekrece inzulinu	DM2	(Perry et al. 2016)
celé tělo	tělesný vývoj	malnutrice	(Schwarzer et al. 2016)
		infarkt	(Benakis et al. 2016)
		ateroskleróza	(Koeth et al. 2013)
kardiovaskulární systém		trombóza	(Reinhardt 2019)
	chování	stresová odpověď	(De Vadder et al. 2014)
mozek	hematoencefalická bariéra	metabolické poruchy	(Braniste et al. 2014)
plíce	genová exprese	astma	(Thorburn et al. 2015)

NAFLD – nealkoholické tučnění jater, DM2 – diabetes mellitus 2. typu

Bakterie tlustého střeva exprimují enzymy štěpící sacharidy, což jim dává schopnost fermentovat složité sacharidy a generovat metabolity, jako jsou SCFA (short-chain fatty acids, mastné kyseliny s krátkým řetězcem) (Musso et al. 2010). Z produkce SCFA převládají především propionát, butyrát a acetát, které se nacházejí v GIT v poměru 1:1:3 (Louis et al. 2014). Tyto SCFA jsou rychle absorbovány epiteliálními buňkami GIT, kde se podílejí na regulaci buněčných procesů, jako je genová exprese, chemotaxe, diferenciacce, proliferace a apoptóza (Corrêa-Oliveira et al. 2016). Acetát je produkován většinou střevních anaerobů, zatímco propionát a butyrát jsou produkovány různými podskupinami střevních bakterií po odlišných molekulárních drahách. Butyrát se vyrábí ze sacharidů glykolýzou a acetoacetyl-

CoA, zatímco pro tvorbu propionátu jsou známy dvě cesty, sukcinátu nebo propandiolu, v závislosti na povaze cukru (Louis & Flint 2017). V lidském střevě propionát produkují hlavně zástupci kmenu *Bacteroides*, produkci butyrátu dominuje kmen *Firmicutes* (Morrison & Preston 2016). Propionát je primárně absorbován játry a acétát se uvolňuje do periferní tkáni. Svými účinky je známý především butyrát, který vykazuje protizánětlivé a antikancerogenní účinky. Také je důležitým zdrojem energie pro kolonocyty (Corrêa-Oliveira et al. 2016). Dle Morrison & Preston (2016) SCFA regulují homeostázu lipidů a glukózy v játrech prostřednictvím doplňkových mechanismů. V játrech může propionát indukovat glukoneogenezi, acétát a butyrát jsou lipogenní.

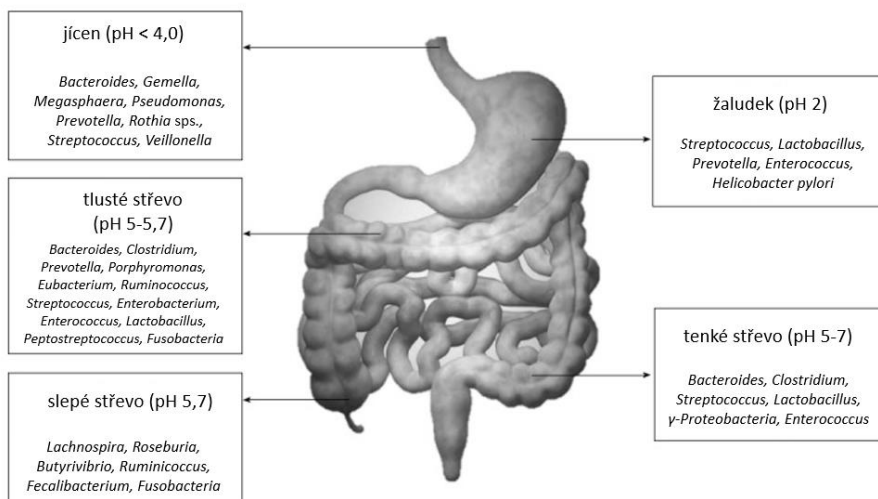
Mikrobiota je rovněž zásadní pro *de novo* syntézu esenciálních vitaminů, které není hostitel schopen sám produkovat. Bakterie mléčného kvašení jsou klíčovými organismy při produkci vitamínu B₁₂, který nemohou syntetizovat zvířata, rostliny ani houby (LeBlanc et al. 2013). Bifidobakterie jsou hlavními producenty folátu (vitamin B₉), který se podílí na životně důležitých metabolických procesech, včetně syntézy a opravy DNA (Pompei et al. 2007). Střevní mikrobiota může také metabolizovat žlučové kyseliny, které nejsou následně reabsorbovány pro biotransformaci na sekundární žlučové kyseliny (Staley et al. 2017).

Přítomnost mikrobioty v GIT také ovlivňuje kolonizaci patogeny, například soutěžení o místa přichycení a zdroje živin či produkci antimikrobiálních látek (Bäumler & Sperandio 2016). Mikrobiota prostřednictvím svých strukturních složek a metabolitů stimuluje hostitele k produkci různých antimikrobiálních sloučenin. Patří mezi ně antimikrobiální proteiny, mezi které se řadí katalicidin, lektin typu C a prodefensiny (Hooper & Macpherson 2010).

3.3.3 Složení střevní mikrobioty

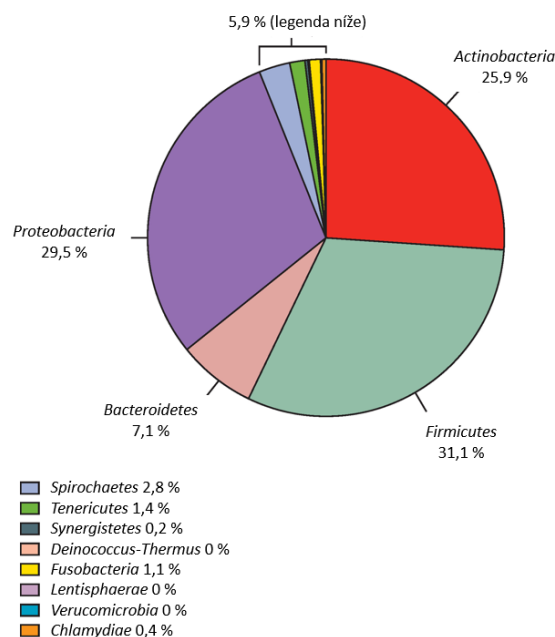
Přibližně před 10 lety většina znalostí o střevní mikrobiotě dospělého člověka vycházela z metod založených na kultivaci, které jsou náročné na pracovní sílu. V posledních letech se možnosti ohledně zkoumání lidské mikrobioty značně zlepšily díky novým přístupům bez nutnosti kultivace. Populárním přístupem se stalo cílení na prokaryotickou 16S ribozomální RNA (rRNA), která je přítomná ve všech bakteriích a zástupcích domény *Archea*. Zahrnuje 9 vysoce variabilních oblastí (V1-V9), jež umožňují snadné rozlišení druhů. Dřívější techniky se soustředily na sekvenování celého genu 16S rRNA, později se zaměření sekvenování přesunulo na analýzu kratších podoblastí genu ve větší hloubce, což však může způsobit chyby. Spolehlivější odhady složení a rozmanitosti mikrobioty mohou spíše poskytnout celogenomové shotgun metagenomiky kvůli vyššímu rozlišení a citlivosti těchto technik (Poretzky et al. 2014).

Části lidského těla typické výskytem mikroorganismů mají své specifické mikrobiální zastoupení a celý GIT tomu není výjimkou (Obrázek 5). Střevní mikrobiota se liší podle anatomických oblastí střeva, které se liší z hlediska fyziologie, pH a parciálním tlakem O₂, rychlosti trávení (rychlé od úst po slepé střevo, později výrazně pomaleji), dostupnosti substrátu a i sekrecí trávicích šťáv (Flint et al. 2012).



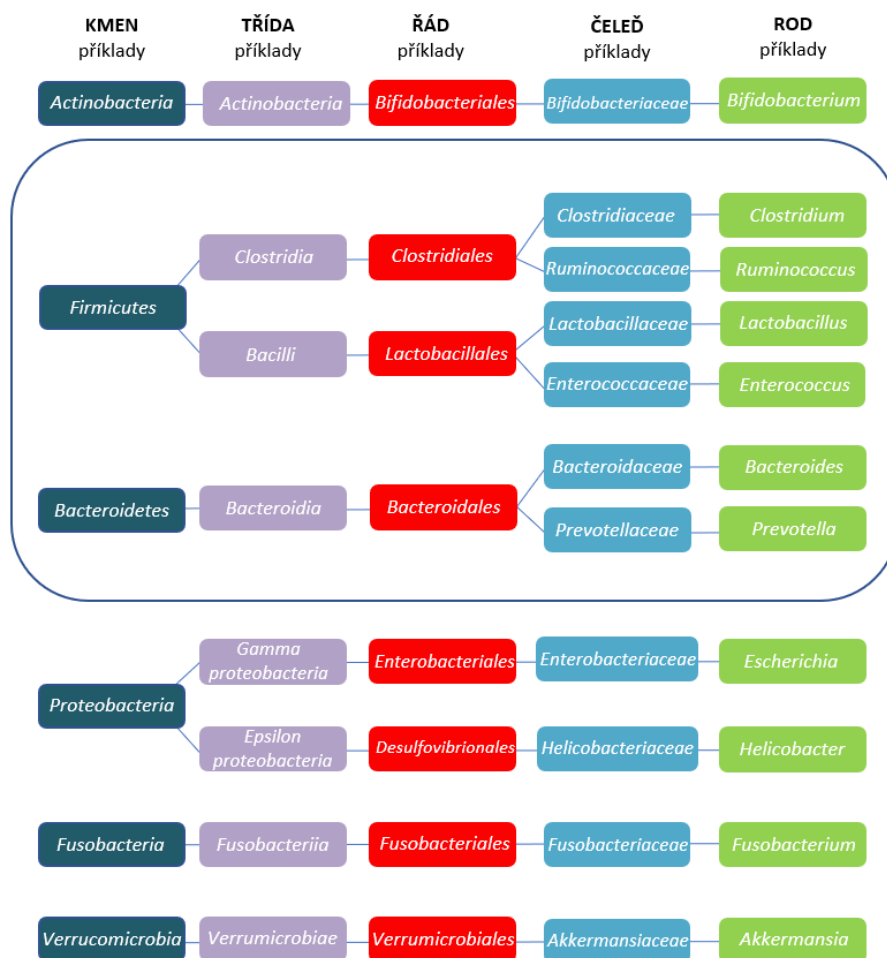
Obrázek 5: Mikrobiální zastoupení v GIT (Jandhyala et al. 2015).

Studie Hugon et al. (2015) poskytla zřejmě dosud nejkomplexnější pohled na složení lidské mikrobioty. Bylo identifikováno 2172 druhů izolovaných z lidských střev a byly klasifikovány do 12 různých kmenů, přičemž 93,5 % patřilo k *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* a *Bacteroidetes* (Obrázek 6). U lidí je 386 identifikovaných druhů striktně anaerobních, a proto se obvykle nacházejí v slizničních oblastech, jako je dutina ústní a GIT.



Obrázek 6: Zastoupení kmenů v lidské mikrobiotě (Hugon et al. 2015).

Kmen *Firmicutes* sestává z více než 200 různých rodů, jako jsou například *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Ruminococcus* (Obrázek 7). Rod *Clostridium* představuje 95 % kmene *Firmicutes*. *Bacteroidetes* se skládá z převládajících rodů *Bacteroides* a *Prevotella*. Kmen *Actinobacteria* je méně hojný úměrně ostatním a je zastoupen především rodem *Bifidobacterium* (Arumugam et al. 2011).



Obrázek 8: Příklady taxonomického složení střevní mikrobioty. V rámečku jsou uvedeny zástupci bakterií patřící do kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*, které představují 90 % střevní mikrobioty. Upraveno podle Rinninella et al. (2019).

Střevní mikrobiota každého jedince je specificky charakterizována shluky bakterií zvaných enterotypy. Dělí se na základní 3 enterotypy, které jsou charakterizovány dominantními bakteriemi – *Bacteroides* (enterotyp I), *Prevotella* (enterotyp II) a *Ruminococcus* (enterotyp III). Enterotyp je ve skutečnosti spíše funkční harmonické sdružení několika druhů bakterií než systematické sdružení. Každý enterotyp není jednoznačnou identitou, jako tomu jsou krevní skupiny, ale charakterizují jednotlivce a zůstávají stabilní po celou dobu dospělosti. V případě jejich narušení jsou obnoveny. Enterotypy se svou charakteristickou skladbou bakterií a funkčními vlastnostmi definuje svůj typický způsob výroby energie z fermentovatelných substrátů dostupných v tlustém střevě. Bakteriální enterotyp I získává energii primárně ze sacharidů pomocí hlavně glykolýzy a pentózo-fosfátových drah. Zatímco enterotypy II a III jsou schopné degradovat mucinové glykoproteiny střevní slizniční vrstvy. Předpokládá se, že enterotypy jsou v zásadě definovány podle stravovacích návyků (Rinninella et al. 2019).

3.3.4 *Lactobacillus* spp.

Laktobacily se řadí do kmene *Firmicutes*, který má v rámci mikrobioty významné postavení. Rod *Lactobacillus* zahrnuje více než 200 kmenů a jedná se o největší a nejrozmanitější rod v rámci bakterií mléčného kvašení (BMK). Jsou součástí mikrobioty lidí

a zvířat, kde kolonizují GIT a urogenitální trakt (Parolin et al. 2015). Díky své schopnosti štěpit jednoduché sacharidy na kyselinu mléčnou se využívají v potravinářských výrobcích od ovoce a zeleniny až po řadu fermentovaných produktů, vč. mléčných výrobků (Savino et al. 2012). Díky svému komerčnímu, průmyslovému a zdravotnímu potenciálu patří mezi nejvíce studované druhy (Hill et al. 2018).

Rod *Lactobacillus* je považován za hlavní skupinu probiotik, která jsou definována jako životaschopné mikroorganismy, jež při požití ve vhodné koncentraci mají různé příznivé účinky na hostitele. Musí splňovat různé parametry vč. odolnosti proti stresu spojeného s hostitelem, adhezni schopnosti a antimikrobiální aktivita. Tyto aspekty se požadují k zajištění toho, aby kandidátské mikroorganismy na probiotikum dokázaly odolat stresujícím podmínkám lidského GIT a uplatnit své funkční vlastnosti (de Melo Pereira et al. 2018). V rámci své probiotické funkce patří laktobacily jak mezi lumenální flóru, tak jsou laktobacily spojovány se sliznicí a hlenem (detekované ve vrstvě hlenu a epiteliálních kryptách tenkého střeva) (Jandhyala et al. 2015).

Lactobacillus casei je nejvíce prozkoumaným a aplikovaným probiotickým kmenem z rodu *Lactobacillus*. Je velmi blízce příbuzný *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus rhamnosus*, se kterými tvoří skupinu, jež je v průmyslu s probiotiky velmi rozšířená (Hill et al. 2018). Dietrich et al. (2014) zjistili, že konzumace této skupiny laktobacilů má pozitivní účinky v rámci prevence průjemových stavů během léčby antibiotiky. Větší význam nabývá zejména u geriatrických pacientů, kteří užívají antibiotika, trpí renální insuficiencí a mají nižší hodnoty albuminu. U kmenu *L. rhamnosus* byla objevena schopnost pozitivně ovlivnit funkci mozku, také byla vyzdvihnuta důležitost bloudivého nervu (*nervus vagus*) v obousměrné komunikaci mezi střevními bakteriemi a mozkiem. Podávání kmenu přímo ovlivnilo expresi GABA receptorů v mozku, což vedlo ke snížení úzkosti a depresivního chování u myši (Bravo et al. 2011). *L. rhamnosus* se také efektivně projevil v rámci léčby akutní gastroenteritidy u dětí, kdy zkracuje dobu průjmu. Největší benefit byl pozorován u skupiny, která zahrnovala hospitalizované i ambulantní pacienty léčené vysokou denní dávkou ($\geq 10^{10}$ KTJ/den) (Szajewska et al. 2013). Další laktobacily s probiotickým efektem jsou *L. johnsonii* a *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. plantarum* či *L. mesenteroides* (de Melo Pereira et al. 2018). Mezi probiotika se dále řadí *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* a *L. acidophilus*, které se používají především ve fermentovaných mléčných výrobcích (Cremon et al. 2018).

Lactobacillus plantarum, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* společně s kmeny *Bifidobacterium longum* spp. *infantis*, *B. longum* a *B. breve* se doporučují ve skladbě probiotik, která jsou doporučována jako udržovací léčba pacientů v remisi s diagnózou idiopatických střevních zánětů (Singh et al. 2015).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Pro experiment bylo použito 6 kmenů z rodu *Lactobacillus*: *Lactobacillus reuteri* (DSMZ 20 016), *Lactobacillus acidophilus* (DSMZ 20 079), *Lactobacillus fermentum* (CCM 91), *Lactobacillus gasseri* (DSMZ 20 243), *Lactobacillus rhamnosus* (MILCOM 598) a *Lactobacillus plantarum* (MILCOM 195). Co se týče hmyzu, byly použity 3 druhy – cvrček domácí (*Acheta domestica*), šváb obecný (*Blatta orientalis*) a larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Všechny druhy byly poskytnuty Ing. Martinem Kulmou z Katedry zoologie a rybářství na České zemědělské univerzitě. Jako médium bylo použito médium pro ředící řadu (Tabulka 9) a médium pro růstové křivky obohacené o přídavek samotného hmyzu či kombinaci hmyzu a glukózy jako jediných zdrojů uhlíku (Tabulka 10). Směs pro MRS agar o daném složení (Tabulka 11) smíchaná s 1 litrem destilované vody a přídavek 1 ml Tween 80 sloužila pro stanovení počtu laktobacilů narostlých na médiích s obsahem hmyzu.

Z laboratorního vybavení byly použity Erlenmayerovy baňky, zkumavky, vialky, malé Petriho misky, centrifuga, laboratorní míchačka Vortex, kolona, CO₂ a H₂, denzitometr McFarland (typ DEN-1B), autokláv, spektrofotometr Spekol 1300, anaerostat, počítačka kolonií.

Tabulka 9: Složení média na ředící řadu.

látka	množství
trypton	5 g
nutrient broth n.2	5 g
yeast extract	2,5 g
cystein	0,25 g
Tween 80	0,5 ml
destilovaná voda	1000 ml

Tabulka 10: Složení média.

látka	množství
trypton	10 g
nutrient broth n.2	10 g
yeast extract	5 g
cystein	0,5 g
Tween 80	1 ml
destilovaná voda	1000 ml
zdroj uhlíku (hmyz/glukóza/hmyz + glukóza)	1 g/1 g/0,5 g + 0,5 g

Tabulka 11: Složení MRS agaru.

látká	množství
pepton	10 g
masový extrakt	5 g
kvasničný extrakt	5 g
D-glukóza	20 g
hydrogenfosforečnan draselný	2 g
hydrogencitrát dvojamonný	2 g
octan sodný	5 g
sulfát hořečnatý	0,1 g
síran manganitý	0,025 g
agar	12 g

4.2 Metodika

4.2.1 Stanovení čistoty kmenů

Před započítím práce s mikroorganismy byla nejdříve u kmenů po 24 hodinové kultivaci při teplotě 37 °C mikroskopicky zkontrolována morfologie a čistota. Druhová příslušnost byla potvrzena pomocí MALDI-TOF. Pro stanovení se převedl 1 ml narostlé kultury do ependorfky. Na každý vzorek byla použita samostatná jehla, kterou se propíchllo septum na zkumavce a bylo odebráno požadované množství. Ependorfka byla poté vložena do centrifugy a zcentrifugována po dobu 2 minut na 14 000 otáček. Supernatant byl odebrán a k sedimentu bylo přidáno 500 µl 70% ethanolu. Sediment s alkoholem se zcentrifugoval za stejných podmínek jako v předchozím kroku (2 min, 14 000 ot.). Ethanol se z ependorfky slil a zbylé množství se nechalo vytékat (popř. bylo odebráno pipetou, kterou ale nesměl být narušen sediment). K sedimentu se poté přidalo 15 µl kyseliny mravenčí a 15 µl acetonitrilu. Následně se ependorfka nechala 30 vteřin vortexovat a centrifugovat (2 min, 14 000 ot.). Na závěr byl odebrán 1 µl supernatantu, který se nanášel na MALDI destičku do dvou terčíků. Po zaschnutí vzorku byl přidán 1 µl matrice, který se také nechal zaschnout. Samotná analýza proběhla na MALDI-TOF Autoflex Speed Bruker a výsledná spektra byla vyhodnocena softwarem Bruker MALDI Biotyper.

4.2.2 Příprava hmyzu

Pro zkoumání růstu laktobacilů na živném médiu s přísávkem hmyzu jako jediného zdroje uhlíku byly použity 3 druhy hmyzu – cvrček domácí (*A. domesticus* – AD), šváb obecný (*B. orientalis* – BO) a larvy potměníka moučného (*T. mollitor* – TM). Každý druh byl samostatně lyofilizován pro následnou lepší manipulaci. Nejdříve došlo ke zmrazení při -80 °C a následně byl hmyz sušen ve vakuu. Jednotlivé druhy byly samostatně mixovány v Grindomix GM200 po dobu zhruba 2 minut na 2.0×1000 rpm s cílem zajistit jemnou sypkou strukturu.

4.2.3 Sledování růstu laktobacilů v médiu s obsahem hmyzu jako jediného zdroje uhlíku

Schopnost laktobacilů využívat hmyzí moučku, jejíž hlavní součástí je chitin, jako zdroj uhlíku byla testována pomocí stanovení růstových křivek, stanovení optické denzity média a kultivačním stanovením počtu bakteriálních buněk.

Růstová křivka

Pro stanovení růstových křivek byly připraveny zkumavky, které byly naplněny různými typy média. Každý kmen laktobacilů byl inokulován na médium obsahující jen hmyz (1 g/l média), médium s přídatkem hmyzu i glukózy (obojí v množství 0,5 g/l) a kontrolní médium, které obsahovalo pouze základní ingredience (Tabulka 10). Pro každý kmen byla vytvořena 3 opakování. Navážené složky média byly rozpuštěny a rozvařeny v destilované vodě. Médium bylo následně rozděleno do zkumavek po 10 ml a bylo vytvořeno anaerobní prostředí. Zkumavky byly zavíčkované a sterilovány v autoklávu (121°C, 1 hod).

Po vychladnutí bylo do zkumavek inokulováno 0,3 ml narostlé kultury daných kmenů a následně byla měřena denzita pomocí denzitometru McFarland (typ DEN-1B). V prvních 4 hodinách se denzita měřila každých 30 minut, poté každou hodinu. Mezi měřeními byly stojany se zkumavkami ukládány do lázně temperované na 37 °C. Výsledky byly zaznamenávány do tabulek a ze zlogaritmovaných hodnot byly sestaveny grafy růstové křivky.

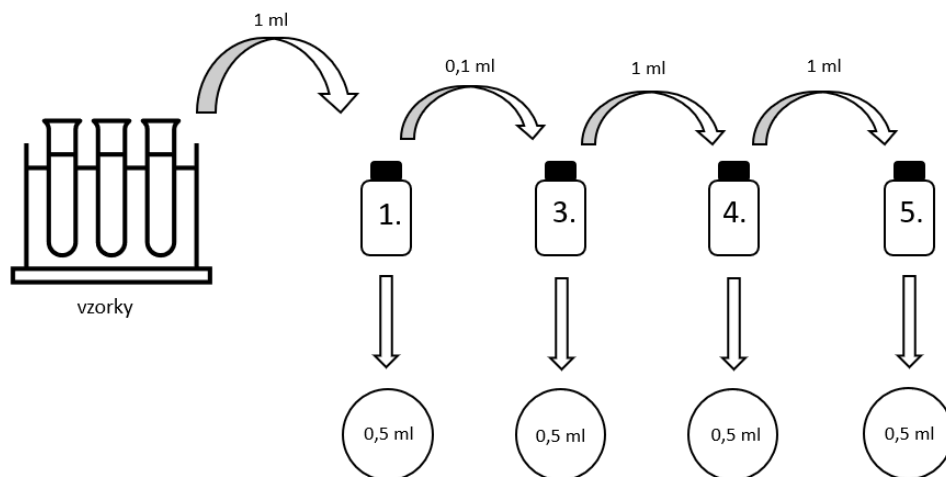
Stanovení absorbance vzorků pomocí Spekolu

Po 24hodinové kultivaci v médiích popsanych výše byla měřena optická denzita kultury pomocí Spekolu. Z narostlé kultury bylo odpipetováno 1,5 ml do kyvety, ve které se měřila absorbance při vlnové délce 620 nm. Naměřené hodnoty z různých druhů hmyzu byly porovnány s MRS médiem, což je ideální médium pro kultivaci laktobacilů.

Stanovení počtu laktobacilů po kultivaci

Pro stanovení počtu laktobacilů po jejich kultivaci na médiích s obsahem hmyzu byl proveden mikrobiologický rozbor. Každý kmen byl kultivován na všech typech hmyzích médií a kontrolním MRS médiu, které je pro růst laktobacilů ideální. Nejdříve bylo zaočkováno 0,3 ml narostlé kultury kmenů do připravených médií, ve kterých následně probíhala kultivace po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Následovalo kultivační stanovení bakterií na jednotlivých typech médií.

Dále bylo připraveno médium pro ředící řadu podle základního receptu. Do média nebyla přidávána glukóza ani hmyz. Po smíchání všech komponentů bylo médium rozvařeno a následně bylo pipetou převedeno do vialek po 9 ml. Neuzavřené vialky se nechaly 15 minut v lázni, poté se pomocí kolony eliminoval vzdušný kyslík a vialky byly rychle zavíčkované. Uzavřené vialky byly sterilovány v autoklávu na program Liquids (121 °C, 1 hod). Pro aseptickou práci byl stůl vyčištěn ethanolem, práce probíhala v ochranných pomůckách a u ohně. Po vychladnutí vialek se rozmístily na stole společně s Petriho miskami a byly popsány podle příslušného ředění. Před odebráním narostlé kultury byla zkumavka vortexována pro homogenizaci a následně ožehuta nad plamenem. Pro vytvoření ředící řady byl odebrán 1 ml vzorku kultury na příslušném substrátu a pomocí sterilní stříkačky byl vpraven přes septum do vialky pro první ředění. Mezi každým ředěním byla injekční stříkačka vyměněna za novou, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Celá ředící řada byla vytvořena podle obrázku 9. Pro kontrolní MRS médium bylo přidáno 6., 7. a 8. ředění.



Obrázek 9: Ředící řada.

Z ředící řady bylo následně převedeno 0,5 ml na Petriho misku. Postupovalo se od nejmenší koncentrace (5. ředění) bez nutnosti výměny jehly, tzn. jedna jehla byla použita na celý kmen. Pracovalo se u ohně a před každou manipulací byly vialky ožahnuty nad plamenem. Poté byly vzorky na miskách zality připraveným MRS agarem, opatrně zamíchány a následně vloženy do anaerostatu. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 48 hodin.

Po vyjmutí z anaerostatu byly kolonie laktobacilů spočítány na laboratorních počítačkách. Dále byly dvakrát násobeny kvůli aplikaci 0,5 ml na misky (vyjádření ve vzorci na 1 ml). Celkové množství bakterií ve vzorku bylo vypočítáno podle vzorce:

$$P = [(P1 + P2) / 11] * F$$

P1, P2 = počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných Petriho miskách,
 F = převrácená hodnota vyššího ředění.

4.2.4 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí STATISTIKA 12. Významnost rozdílu využitelnosti médií s obsahem 4 různých zdrojů uhlíku laktobacily byla vyhodnocena pomocí *t*-testu. Následně byla porovnávána média s hmyzem s kontrolním MRS médiem, které má ideální složení živného média a bylo sestaveno tak, aby v něm laktobacily rostly co nejlépe.

5 Výsledky

Růstové křivky ukázaly, že složení média s hmyzem jako jediným zdrojem uhlíku je pro růst laktobacilů nepříznivé. Je také pravděpodobné, že došlo k lehkému zkreslení v důsledku nemožnosti lepšího rozmělnění hmyzu na menší části, čímž i samotné stanovení denzity bylo náročnější. Pokud by byl naměřen klasický průběh růstové křivky, byla by spočítána specifická růstová rychlost, což kvůli minimálnímu růstu bakterií na médiích nebylo možné. Pro ilustraci bylo vybráno několik křivek, které byly porovnány s růstem kultury na kontrolním MRS médiu (Přílohy).

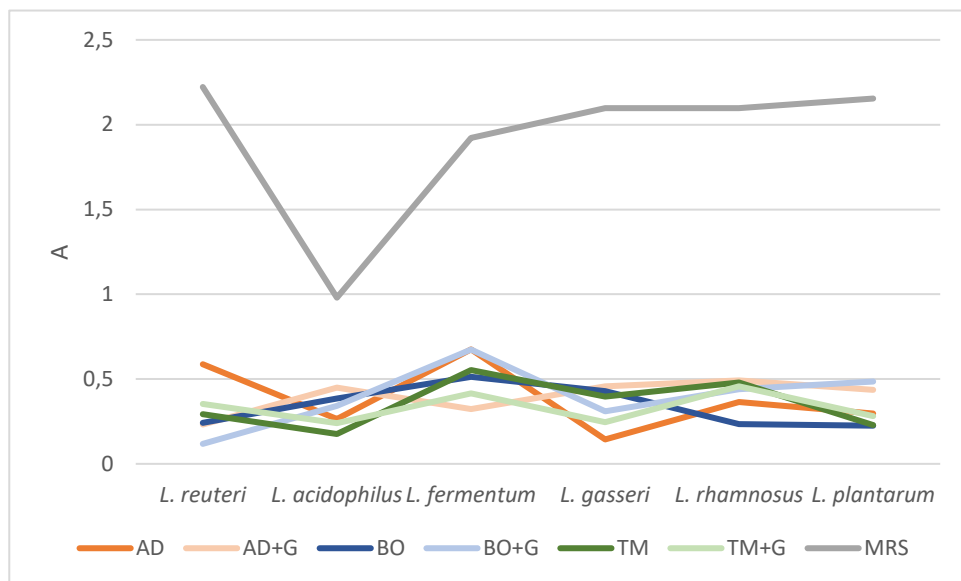
Při měření absorbance byly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p < 0,01$) celkově mezi hmyzími médii a kontrolním MRS médiem. U médií s hmyzem byla naměřena maximální absorbance s hodnotou okolo 0,5. Průměry absorbance se pohybovaly v rozmezí 0,3 a 0,4. Oproti tomu absorbance u kontrolního MRS média byla skoro čtyřnásobná (Obrázek 10).

Následný mikrobiologický rozbor potvrdil předchozí výsledky absorbance. U hmyzích médií s přidavkem glukózy už z naměřených hodnot absorbance bylo zřejmé, že přidavek glukózy nijak nepodpořil růst laktobacilů, proto nebylo kultivační stanovení u těchto médií provedeno. Všechny kmeny laktobacilů vykazovaly větší růst na plotnách s kontrolním MRS médiem než na plotnách s médii hmyzu (Obrázek 11). Rozdíly byly zaznamenány celkově mezi hmyzem a kontrolou. Mezi jednotlivými druhy hmyzu nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

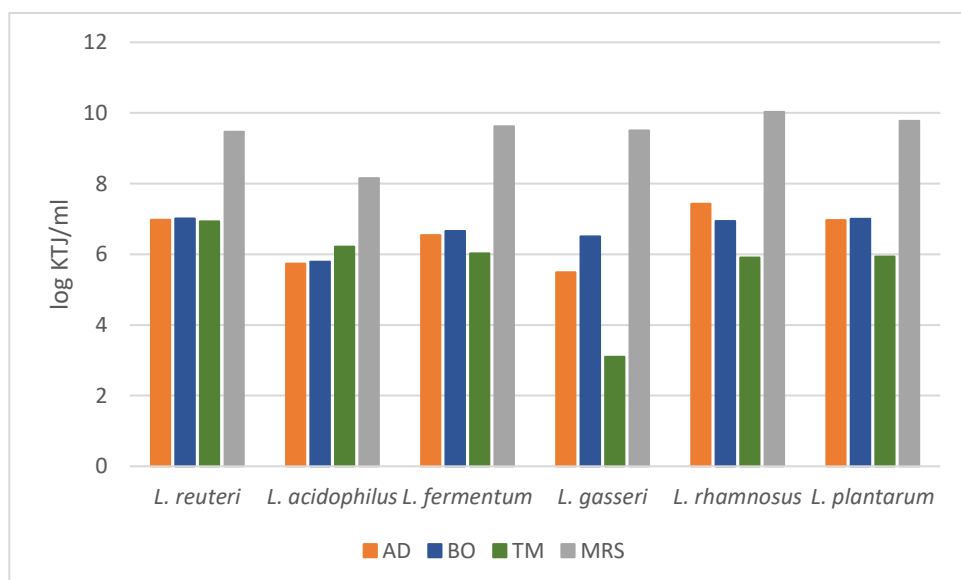
Tabulka 12: Výsledky měření absorbance a kultivace kmenů na různém hmyzím médiu

	absorbance (A)	log KTJ/ml
	průměr ± SD	průměr ± SD
AD	0,39 ± 0,19 ^A	5,69 ± 1,21 ^A
AD + G	0,40 ± 0,09 ^A	-
BO	0,34 ± 0,12 ^A	6,65 ± 0,43 ^A
BO + G	0,39 ± 0,17 ^A	-
TM	0,35 ± 0,14 ^A	6,53 ± 0,69 ^A
TM + G	0,33 ± 0,10 ^A	-
MRS	1,91 ± 0,43 ^B	9,43 ± 0,60 ^B

Absorbance je vyjádřena jako optická densita měřena při 620 nm. Všechna data jsou průměrem tří hmyzích médií ± směrodatná odchylka (SD). AD, BO, TM = druhy přidaného hmyzu; G = přidavek glukózy; MRS = kontrolní médium; ^{A,B} hodnoty ve sloupcích s rozdílnými indexy se statisticky významně liší ($p < 0,01$)



Obrázek 10: Srovnání absorbance kmenů na různých médiích.



Obrázek 11: Kultivační růst na 4 typech médií.

Pomocí všech tří metod jsme zjistily, že médium s hmyzem jako jediným zdrojem uhlíku není ideální pro kultivaci laktobacilů. Případný přídavek glukózy neměl vliv na využití chitinu. Dá se očekávat, že hmyz nemá významný vliv na mikrobiotu a chitin nemá prebiotické účinky.

6 Diskuze

V posledních letech se na lidský mikrobiom zaměřuje čím dál větší pozornost. Je důležitým faktorem nejen v onemocnění GIT, ale i u mnoha extraintestinálních chorob. Vzhledem k tomu, že jedlý hmyz byl mnohokrát zkoumán z hlediska nutričního složení, jeho ostatní efekty, jako je například vliv na lidskou mikrobiotu, tolik prozkoumané dosud nejsou (Stull et al. 2018).

Chitin jako polysacharid má funkci vlákniny, jeho prebiotický efekt na laktobacily ale našim zkoumáním nebyl prokázán. Využití hmyzí moučky jako jediného zdroje uhlíku bylo dle našich výsledků neefektivní. V porovnání s dále zmíněnými studii je rozdíl především ve formě chitinu. Někteří používají samotný chitin, popř. COS, ve formě prášku. Funkce celého jedlého hmyzu v minimálně upravené formě jako prebiotika zatím není dostatečně popsána.

K velmi podobným výsledkům došli ve studii Stull et al. (2018). V rámci dvojité zaslepené crossover studie jednotlivé subjekty konzumovaly denně 25 g 100% prášku z cvrčka *Grylloides sigillatus* a během sledování došlo k různorodým účinkům na jednotlivé druhy v mikrobiotě. Na probiotický kmen *Bifidobacterium animalis* měla konzumace hmyzího prášku pozitivní vliv a jejich počet se navýšil. Naopak bylo prokázáno, že počty probiotického kmenu *L. reuteri* a dvou dalších bakterií produkující kyselinu mléčnou byly po dvou týdnech konzumace cvrčků redukovány 3-4×. Kromě snížení počtu laktobacilů byl snížen i výskyt bakterií rodu *Acidaminococcus* (*Firmicutes*), a to více než 3×. Naše výsledky získané *in vitro* jsou ve srovnání se zkoumáním *in vivo* studie velmi podobné a vykazují stejný negativní trend, alespoň co se týká rodu *Lactobacillus*.

K opačným výsledkům došli v *in vivo* studii, kteří se zabývali vlivem moučky z moučných červů (larvy *T. molitor*) na mikrobiotu myši (Kwon et al. 2020). Pozorování trvalo 8 týdnů a rozbor mikrobioty se zaměřoval na skupiny: všechny bakterie, všechny koliformní bakterie, *E. coli* a *Lactobacillales*. Vyšší počty právě druhu *Lactobacillales*, pod který patří čeleď *Lactobacillaceae*, byly pozorovány u myši krmených červí moučkou. Nárůst hodnot *Lactobacillales* se projevil oproti kontrolní skupině jak po 4, tak po 8 týdnech.

Účinkům a trávení moučky z larev *T. molitor* se také věnovali v rámci studie de Carvalho et al. (2019). Výsledky *in vitro* natrávené a nestrávené moučky v počtu celkových bakterií se výrazně nelišily. Výsledky pro *Lactobacillus* spp. vykazovaly podobný růstový profil jako tomu bylo u *Bifidobacterium* spp. Výsledky byly podobné našemu zkoumání. Obecně byl větší nárůst u kontroly obsahující sacharidy než u vzorků s larví moučkou, která dle autorů byla převážně proteinová. Přítomnost hmyzí moučky nebyla inhibiční, ale ani nestimulovala laktobacily k růstu.

Oproti našim výsledkům ve studii Selenius et al. (2018) došli ke značně odlišným závěrům. Zkoumali účinek práškové formy chitinu a jeho oligosacharidů jak na *L. rhamnosus* GG, tak na *E. coli* TG. K roztokům také byl přidán NaOH s cílem lepšího rozpuštění chitinu ve vodném roztoku. Měřili optickou denzitu růstu bakterií v roztocích s různou koncentrací chitinu a COS, ze které následně vypracovali růstovou křivku. Chitin a COS měli stimulační efekt na *L. rhamnosus* a naopak inhibiční účinek na *E. coli*. Zároveň platilo, že čím vyšší koncentrace chitinu a COS (0,5% roztoky), tím větší nárůst laktobacilů a výraznější potlačení růstu *E. coli*. Rozdíly oproti předchozí studii mohly vzniknout díky formě chitinu a její využitelnosti. Z pohledu oligosacharidů byl prozkoumán i vliv na adhezi k epiteliálním buňkám (Altamimi et

al. 2016). Společně s *L. casei* byly zkoumány *Bifidobacterium bifidum*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium leptum*, *Blautia coccooides*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis* a *Clostridium defficile*. Laktobacily byl nejméně ovlivněnou skupinou s rozsahem 13-59% inhibice adheze ve srovnání s kontrolou. COS měly podobný efekt jako ostatní oligosacharidy (laktulosa, rafinosa, stachyosa, cellobiosa) a nebyl mezi jejich účinky výrazný rozdíl.

Postupem nejvíce podobný rozbor provedli Lee et al. (2002), kde měřili absorbanci při 600 nm po 24hodinové kultivaci při 37 °C. Pro testování účinků COS na maximální růst a specifickou rychlost růstu *L. brevis* byly buňky kultivovány v bazálním médiu doplněném o 0,1 % COS. Poté byl měřen růst bakterií v čase, kdy po 9 hodinách kultivace dosáhli svého maximálního růstu. Měřená absorbance u *L. brevis* dosáhla absorbance hodnoty $0,42 \pm 0,012$, u *L. casei* a *L. acidophilus* byly hodnoty absorbance vyšší ($0,607 \pm 0,006$ resp. $0,578 \pm 0,066$). V porovnání s fruktooligosacharidy měly COS podstatný růstový stimulační účinek na *L. brevis*, ale jen mírně stimulační na *L. casei*. Vzhledem k našim výsledkům je průměr absorbance ve studii vyšší, což může být zapříčiněno předchozím naštěpením chitinu na oligosacharidy, které se tím staly využitelnější pro bakterie.

Celkově zmíněné studie neposkytují konzistentní výsledky, které by hypotézu podpořily či vyvrátily. Různých výsledků bylo dosaženo zřejmě z důvodu různé úpravy hmyzu, či použití čistého chitinu a jeho derivátů. Vzhledem ke kultivaci bylo dosaženo pozitivnějších výsledků především ve studiích, kde byly použity COS. Dá se předpokládat, že právě naštěpení chitinu mělo zásadní vliv na jeho využití mikroorganismy. Tato problematika je ale stále nová a je žádoucí, aby průzkum vlivu jedlého hmyzu či přímo extrahovaného hmyzího chitinu na lidskou mikrobiotu intenzivně pokračoval.

7 Závěr

Cílem této práce bylo zjistit, jak chitin obsažený v těle jelého hmyzu může ovlivnit *in vitro* růst laktobacilů jako významného rodu lidské střevní mikrobioty. Hypotéza byla testována pomocí tří metod – měření denzity za účelem vytvoření růstových křivek, měření absorbance při 620 nm a samotná kultivace laktobacilů na médiu s hmyzem jako jediným zdrojem uhlíku. Všemi třemi metodami bylo prokázáno, že médium s jedlým hmyzem nemá stimulační účinek na vybrané kmeny laktobacilů.

Z vlastních výsledků je patrné, že před samotným testováním by mělo dojít k lepší přípravě hmyzí moučky. Mělo by se docílit lepšího rozmělnění hmyzu a popř. i natrávení trávicími enzymy, což v této práci neproběhlo. Ukázalo se, že pouhé rozvaření hmyzu v kultivačních médiích je nedostatečné pro dokonalé zpřístupnění živin laktobacilům.

8 Literatura

- Alard J et al. 2016. Beneficial metabolic effects of selected probiotics on diet-induced obesity and insulin resistance in mice are associated with improvement of dysbiotic gut microbiota. *Environmental Microbiology* **18**:1484–1497. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.13181>.
- Altamimi M, Abdelhay O, Rastall RA. 2016. Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cells. *Anaerobe* **39**:136–142. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996416300245>.
- Arumugam M et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180. Available from <http://www.nature.com/articles/nature09944>.
- Bäumler AJ, Sperandio V. 2016. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* **535**:85–93. Available from <http://www.nature.com/articles/nature18849>.
- Benakis C et al. 2016. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nature Medicine* **22**:516–523. Available from <http://www.nature.com/articles/nm.4068>.
- Biedermann L et al. 2013. Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLoS ONE* **8**:e59260. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0059260>.
- Blásquez JR, Manuel J, Moreno P, Hugo V, Camacho M. 2012. Could Grasshoppers Be a Nutritive Meal? *Food and Nutrition Sciences* **3**:164–175.
- Braniste V et al. 2014. The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science Translational Medicine* **6**:263ra158–263ra158. Available from <https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.3009759>.
- Bravo JA, Forsythe P, Chew M V., Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, Bienenstock J, Cryan JF. 2011. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:16050–16055. Available from <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1102999108>.
- Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. 2015. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metabolism* **22**:658–668. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413115003897>.
- Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Ringel Y. 2012. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility* **24**:521–e248. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2982.2012.01891.x>.
- Chevalier C et al. 2015. Gut Microbiota Orchestrates Energy Homeostasis during Cold. *Cell* **163**:1360–1374. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415014841>.
- Churchward-Venne TA, Pinckaers PJM, van Loon JJA, van Loon LJC. 2017. Consideration of insects as a source of dietary protein for human consumption. *Nutrition Reviews* **75**:1035–1045. Available from <http://academic.oup.com/nutritionreviews/article/75/12/1035/4675267>.
- Cohen E. 2001. Chitin synthesis and inhibition: A revisit. Pages 946–950 *Pest Management Science*. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.363> (accessed December 8, 2020).
- Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. 2016. Regulation of immune cell

- function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology* **5**:e73. Available from <http://doi.wiley.com/10.1038/cti.2016.17>.
- Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. 2018. Pre- and probiotic overview. *Current Opinion in Pharmacology* **43**:87–92. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489218300833>.
- Dass CR, Choong PFM. 2008. The use of chitosan formulations in cancer therapy. *Journal of Microencapsulation* **25**:275–279. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652040801970461>.
- Davani-Davari D, Negahdaripour M, Karimzadeh I, Seifan M, Mohkam M, Masoumi S, Berenjhan A, Ghasemi Y. 2019. Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods* **8**:92. Available from <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/3/92>.
- David LA et al. 2014. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **505**:559–563. Available from <http://www.nature.com/articles/nature12820>.
- de Carvalho NM, Walton GE, Poveda CG, Silva SN, Amorim M, Madureira AR, Pintado ME, Gibson GR, Jauregi P. 2019. Study of in vitro digestion of *Tenebrio molitor* flour for evaluation of its impact on the human gut microbiota. *Journal of Functional Foods* **59**:101–109. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464619302804>.
- de Melo Pereira GV, de Oliveira Coelho B, Magalhães Júnior AI, Thomaz-Soccol V, Soccol CR. 2018. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology Advances* **36**:2060–2076. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018301605>.
- De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, Vinera J, Zitoun C, Duchampt A, Bäckhed F, Mithieux G. 2014. Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell* **156**:84–96. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S009286741301550X>.
- Demain JG, Minaei AA, Tracy JM. 2010. Anaphylaxis and insect allergy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **10**:318–322. Available from <http://journals.lww.com/00130832-201008000-00010>.
- Dethlefsen L, Relman DA. 2011. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**:4554–4561. Available from <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1000087107>.
- Di Rosa M, Distefano G, Zorena K, Malaguarnera L. 2016. Chitinases and immunity: Ancestral molecules with new functions. *Immunobiology* **221**:399–411. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298515301005>.
- Dietrich CG, Kottmann T, Alavi M. 2014. Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea **20**:15837–15844.
- Dinan TG, Cryan JF. 2013. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterology & Motility* **25**:713–719. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/nmo.12198>.
- Durst PB, Johnson D V, Leslie RN, Shono K. 2010. Forest insects as food: humans bite back. RAP publication.
- EFSA Scientific Committee. 2015. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal* **13**.
- Ekop EA., Udoh AI., Akpan PE. 2010. Proximate and anti-nutrient composition of four edible insects in Akwa Ibom State, Nigeria. *World Journal of Applied Science and Technology* **2**:224–31.
- Elieh-Ali-Komi D, Hamblin MR. 2016. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International journal of advanced research* **4**:411–

427. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27819009>.
- Elieh Ali Komi D, Sharma L, Dela Cruz CS. 2018. Chitin and Its Effects on Inflammatory and Immune Responses. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* **54**:213–223. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s12016-017-8600-0>.
- Fernandes JC, Tavora FK, Soares JC, Ramos ÓS, João Monteiro M, Pintado ME, Xavier Malcata F. 2008. Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology* **25**:922–928. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002008000889>.
- Finke MD. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology* **21**:269–285. Available from <http://doi.wiley.com/10.1002/zoo.10031>.
- Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* **9**:577–589. Available from <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.156>.
- Francis F, Doyen V, Debaugnies F, Mazzucchelli G, Caparros R, Alabi T, Blecker C, Haubruge E, Corazza F. 2019. Limited cross reactivity among arginine kinase allergens from mealworm and cricket edible insects. *Food Chemistry* **276**:714–718. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618318570>.
- Garino C, Zagon J, Braeuning A. 2019. Insects in food and feed – allergenicity risk assessment and analytical detection. *EFSA Journal* **17**. Available from <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2019.e170907>.
- Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Taccari M, Cardinali F, Aquilanti L, Riolo P, Ruschioni S, Isidoro N, Clementi F. 2017. The microbiota of marketed processed edible insects as revealed by high-throughput sequencing. *Food Microbiology* **62**:15–22. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002016300867>.
- Ghosh S, Lee S-M, Jung C, Meyer-Rochow VB. 2017. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**:686–694. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226861517300924>.
- Gibson GR et al. 2010. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods* **7**:1–19. Available from <http://www.atypon-link.com/IFIS/doi/abs/10.1616/1476-2137.15880>.
- Gopalakannan A, Arul V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. *Aquaculture* **255**:179–187. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848606000512>.
- Gravel A, Doyen A. 2020, January 1. The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. Elsevier Ltd.
- Hill D, Sugrue I, Tobin C, Hill C, Stanton C, Ross RP. 2018. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology* **9**. Available from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.02107/full>.
- Hooper LV., Macpherson AJ. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* **10**:159–169. Available from <http://www.nature.com/articles/nri2710>.
- Hugon P, Dufour JC, Colson P, Fournier PE, Sallah K, Raoult D. 2015, October 1. A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings. *Lancet Publishing Group*.
- Imathiu S. 2020. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal* **18**:1–11. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2019.11.002>.

- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, Jernberg C, Björkstén B, Engstrand L, Andersson AF. 2014. Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut* **63**:559–566. Available from <https://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-303249>.
- Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjölund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. 2010. Short-Term Antibiotic Treatment Has Differing Long-Term Impacts on the Human Throat and Gut Microbiome. *PLoS ONE* **5**:e9836. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009836>.
- Jan A, Azam M, Siddiqui K, Ali A, Choi I, Haq Q. 2015. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences* **16**:29592–29630. Available from <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/12/26183>.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* **21**:8787–8803. Available from <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm>.
- Jantzen A, Menegon L, Oliveira D, Prentice C. 2020. Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry* **311**:126022. Elsevier. Available from <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126022>.
- Javed S, Ahmad M, Ahmad M, Abdin M, Hamid R, Khan M, Musarrat J. 2013. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **5**:21. Available from <http://www.jpbonline.org/text.asp?2013/5/1/21/106559>.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME Journal* **1**:56–66. Available from <http://www.nature.com/articles/ismej20073>.
- Jones M, Kujundzic M, John S, Bismarck A. 2020. Crab vs. Mushroom: A Review of Crustacean and Fungal Chitin in Wound Treatment. *Marine Drugs* **18**:64. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- Jung W-J, Park R-D. 2014. Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. *Marine Drugs* **12**:5328–5356. Available from <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/11/5328>.
- Kachapulula PW, Akello J, Bandyopadhyay R, Cotty PJ. 2018. Aflatoxin Contamination of Dried Insects and Fish in Zambia. *Journal of Food Protection* **81**:1508–1518. Available from <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/81/9/1508/175112/Aflatoxin-Contamination-of-Dried-Insects-and-Fish>.
- Kaya M, Mujtaba M, Ehrlich H, Salaberria AM, Baran T, Amemiya CT, Galli R, Akyuz L, Sargin I, Labidi J. 2017. On chemistry of γ -chitin. *Carbohydrate Polymers* **176**:177–186. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861717309529>.
- Koeth RA et al. 2013. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine* **19**:576–585. Available from <http://www.nature.com/articles/nm.3145>.
- Köhler R, Kariuki L, Lambert C, Biesalski HK. 2019. Protein, amino acid and mineral composition of some edible insects from Thailand. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **22**:372–378. Elsevier.
- Kwon GT, Yuk H-G, Lee SJ, Chung YH, Jang HS, Yoo J-S, Cho K-H, Kong H, Shin D. 2020. Mealworm larvae (*Tenebrio molitor* L.) exuviae as a novel prebiotic material for BALB/c mouse gut microbiota. *Food Science and Biotechnology* **29**:531–537. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s10068-019-00699-1>.
- Latunde-Dada GO, Yang W, Vera Aviles M. 2016. In Vitro Iron Availability from Insects and Sirloin Beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **64**:8420–8424. Available from

- <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b03286>.
- LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **24**:160–168. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095816691200119X>.
- Lee CG, Da Silva CA, Lee J-Y, Hartl D, Elias JA. 2008. Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Current Opinion in Immunology* **20**:684–689. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791508001854>.
- Lee HW, Park YS, Jung JS, Shin WS. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe* **8**:319–324.
- Louis P, Flint HJ. 2017. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental Microbiology* **19**:29–41. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1462-2920.13589>.
- Louis P, Hold GL, Flint HJ. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology* **12**:661–672. Available from <http://www.nature.com/articles/nrmicro3344>.
- Macfarlane GT, Macfarlane S. 2012. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **95**:50–60. Available from <https://academic.oup.com/jaoac/article/95/1/50-60/5655139>.
- Madan K, Madan M, Sharma S, Paliwal S. 2020. Chitinases: Therapeutic Scaffolds for Allergy and Inflammation. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* **14**:46–57. Available from <http://www.eurekaselect.com/178311/article>.
- Magrone T, Jirillo E. 2013. The interaction between gut microbiota and age-related changes in immune function and inflammation. *Immunity & Ageing* **10**:31. Available from <https://immunityageing.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4933-10-31>.
- Manditsera FA, Luning PA, Fogliano V, Lakemond CMM. 2019. Effect of domestic cooking methods on protein digestibility and mineral bioaccessibility of wild harvested adult edible insects. *Food Research International* **121**:404–411. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919302030>.
- Manni L, Ghorbel-Bellaaj O, Jellouli K, Younes I, Nasri M. 2010. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **162**:345–357. Springer. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-009-8846-y> (accessed December 8, 2020).
- Mateos-Aparicio I, Mengíbar M, Heras A. 2016. Effect of chito-oligosaccharides over human faecal microbiota during fermentation in batch cultures. *Carbohydrate Polymers* **137**:617–624. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861715011005>.
- Melgar-Lalanne G, Hernández-Álvarez A, Salinas-Castro A. 2019. Edible Insects Processing: Traditional and Innovative Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18**:1166–1191. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12463>.
- Mézes M. 2018. Food safety aspect of insects: A review. *Acta Alimentaria* **47**:513–522. Akadémiai Kiadó.
- Ministerstvo zemědělství. 2018. *Zásady správné zemědělské a výrobní praxe produkce hmyzu určeného pro lidskou spotřebu*. Praha. Available at http://eagri.cz/public/web/file/576458/Zasady_produkce_hmyzu_4__2_.pdf.
- Moeller AH, Ochman H. 2013. Factors that drive variation among gut microbial communities. *Gut Microbes* **4**:403–408. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/gmic.26039>.

- Morrison DJ, Preston T. 2016. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**:189–200. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19490976.2015.1134082>.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. 2010. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota: The hygiene hypothesis expanded? *Diabetes Care* **33**:2277–2284. Available from <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc10-0556>.
- Musundire R, Osuga IM, Cheseto X, Irungu J, Torto B. 2016. Aflatoxin Contamination Detected in Nutrient and Anti-Oxidant Rich Edible Stink Bug Stored in Recycled Grain Containers. *PLOS ONE* **11**:1–16. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145914>.
- Musundire R, Zvidzai CJ, Chidewe C, Samende BK, Manditsera FA. 2014. Nutrient and anti-nutrient composition of *Henicus whellani* (Orthoptera: Stenopelmatidae), an edible ground cricket, in south-eastern Zimbabwe. *International Journal of Tropical Insect Science* **34**:223–231. Available from http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1742758414000484.
- Nagpure A, Choudhary B, Gupta RK. 2014. Chitinases: in agriculture and human healthcare. *Critical Reviews in Biotechnology* **34**:215–232. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2013.790874>.
- Osimani A, Garofalo C, Milanović V, Taccari M, Cardinali F, Aquilanti L, Pasquini M, Mozzon M, Raffaelli N, Ruschioni S. 2017. Insight into the proximate composition and microbial diversity of edible insects marketed in the European Union. *European Food Research and Technology* **243**:1157–1171. Springer.
- Otero P, Gutierrez-Docio A, Navarro del Hierro J, Reglero G, Martin D. 2020. Extracts from the edible insects *Acheta domesticus* and *Tenebrio molitor* with improved fatty acid profile due to ultrasound assisted or pressurized liquid extraction. *Food Chemistry* **314**:126200. Elsevier Ltd.
- Parolin C, Marangoni A, Laghi L, Foschi C, Ñahui Palomino RA, Calonghi N, Cevenini R, Vitali B. 2015. Isolation of Vaginal Lactobacilli and Characterization of Anti-Candida Activity. *PLOS ONE* **10**:e0131220. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131220>.
- Payne CLR, Scarborough P, Rayner M, Nonaka K. 2016. A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. *Trends in Food Science and Technology* **47**:69–77. Elsevier Ltd. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.012>.
- Perry RJ, Peng L, Barry NA, Cline GW, Zhang D, Cardone RL, Petersen KF, Kibbey RG, Goodman AL, Shulman GI. 2016. Acetate mediates a microbiome–brain– β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature* **534**:213–217. Available from <http://www.nature.com/articles/nature18309>.
- Poelaert C, Francis F, Alabi T, Megido RC, Crahay B, Bindelle J, Beckers Y. 2018. Protein value of two insects, subjected to various heat treatments, using growing rats and the protein digestibility-corrected amino acid score. *Journal of Insects as Food and Feed* **4**:77–87. Available from <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/JIFF2017.0003>.
- Pokhrel S, Yadav PN, Adhikari R. 2016. Applications of Chitin and Chitosan in Industry and Medical Science: A Review. *Nepal Journal of Science and Technology* **16**:99–104. Available from <https://www.nepjol.info/index.php/NJST/article/view/14363>.
- Pompei A, Cordisco L, Amaretti A, Zanoni S, Matteuzzi D, Rossi M. 2007. Folate Production by Bifidobacteria as a Potential Probiotic Property. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:179–185. Available from <https://aem.asm.org/content/73/1/179>.
- Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. 2014. Strengths and Limitations of 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing in Revealing Temporal Microbial

- Community Dynamics. *PLoS ONE* **9**:e93827. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0093827>.
- Purushotham P, Arun PVPS, Prakash JSS, Podile AR. 2012. Chitin Binding Proteins Act Synergistically with Chitinases in *Serratia proteamaculans* 568. *PLoS ONE* **7**:e36714. Public Library of Science. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0036714> (accessed December 8, 2020).
- Queiroz MF, Melo K, Sabry D, Sasaki G, Rocha H. 2014. Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Marine Drugs* **13**:141–158. Available from <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/1/141>.
- Quigley EMM. 2013. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & hepatology* **9**:560–9. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24729765>.
- Ramos-Bueno RP, González-Fernández MJ, Sánchez-Muros-Lozano MJ, García-Barroso F, Guil-Guerrero JL. 2016. Fatty acid profiles and cholesterol content of seven insect species assessed by several extraction systems. *European Food Research and Technology* **242**:1471–1477. Springer Verlag. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-016-2647-7> (accessed April 12, 2021).
- Raut A V., Satvekar RK, Rohiwal SS, Tiwari AP, Gnanamani A, Pushpavanam S, Nanaware SG, Pawar SH. 2016. In vitro biocompatibility and antimicrobial activity of chitin monomer obtain from hollow fiber membrane. *Designed Monomers and Polymers* **19**:445–455. Available from <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15685551.2016.1169379>.
- Reinhardt C. 2019. The Gut Microbiota as an Influencing Factor of Arterial Thrombosis. *Hämostaseologie* **39**:173–179. Available from <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0038-1675357>.
- Ribeiro JC, Cunha LM, Sousa-Pinto B, Fonseca J. 2018. Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review. *Molecular Nutrition and Food Research* **62**:1–31.
- Rinaudo M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)* **31**:603–632.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano G, Gasbarrini A, Mele M. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **7**:14. Available from <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/14>.
- Rodríguez JM et al. 2015. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease* **26**. Available from <http://www.microbecolhealthdis.net/index.php/mehd/article/view/26050>.
- Rumpold BA, Schlüter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition and Food Research* **57**:802–823.
- Sankar SA, Lagier J-C, Pontarotti P, Raoult D, Fournier P-E. 2015. The human gut microbiome, a taxonomic conundrum. *Systematic and Applied Microbiology* **38**:276–286. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0723202015000454>.
- Savino MJ, Sánchez LA, Saguir FM, de Nadra MCM. 2012. Lactic acid bacteria isolated from apples are able to catabolise arginine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**:1003–1012. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s11274-011-0898-9>.
- Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall H-U, Bamberg K, Angelin B, Hyötyläinen T, Orešič M, Bäckhed F. 2013. Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metabolism* **17**:225–235. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413113000119>.
- Schroeder BO, Bäckhed F. 2016. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine* **22**:1079–1089. Available from

- <http://www.nature.com/articles/nm.4185>.
- Schwarzer M et al. 2016. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science* **351**:854–857. Available from <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aad8588>.
- Selenius OVO, Korpela J, Salminen S, Gallego CG. 2018. Effect of chitin and chitooligosaccharide on in vitro growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Escherichia coli* TG. *Applied Food Biotechnology* **5**:163–172.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology* **14**:e1002533. Public Library of Science. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1002533> (accessed April 17, 2021).
- Shelomi M. 2015. Why we still don't eat insects: Assessing entomophagy promotion through a diffusion of innovations framework. *Trends in Food Science & Technology* **45**:311–318. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092422441500151X>.
- Shoaf K, Mulvey GL, Armstrong GD, Hutkins RW. 2006. Prebiotic Galactooligosaccharides Reduce Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to Tissue Culture Cells. *Infection and Immunity* **74**:6920–6928. Available from <https://iai.asm.org/content/74/12/6920>.
- Singh S, Stroud AM, Holubar SD, Sandborn WJ, Pardi DS. 2015. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Available from <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD001176.pub3>.
- Slavin J. 2013. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* **5**:1417–1435. Available from <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/4/1417>.
- Soliman GA. 2019. Dietary Fiber, Atherosclerosis, and Cardiovascular Disease. *Nutrients* **11**:1155. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/5/1155>.
- Song Z, Li G, Guan F, Liu W. 2018. Application of Chitin/Chitosan and Their Derivatives in the Papermaking Industry. *Polymers* **10**:389. Available from <http://www.mdpi.com/2073-4360/10/4/389>.
- Sosa DA, Fogliano V. 2017. Insect Physiology and Ecology. Pages 215–231 in V. D. C. Shields, editor. *Insect Physiology and Ecology*. InTech. Available from <http://www.intechopen.com/books/insect-physiology-and-ecology>.
- Ssepuuya G, Wynants E, Verreth C, Crauwels S, Lievens B, Claes J, Nakimbugwe D, Van Campenhout L. 2019. Microbial characterisation of the edible grasshopper *Ruspolia differens* in raw condition after wild-harvesting in Uganda. *Food microbiology* **77**:106–117. Elsevier.
- Staley C, Weingarden AR, Khoruts A, Sadowsky MJ. 2017. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**:47–64. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00253-016-8006-6>.
- Stull VJ, Finer E, Bergmans RS, Febvre HP, Longhurst C, Manter DK, Patz JA, Weir TL. 2018. Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. *Scientific Reports* **8**:10762. Available from <http://www.nature.com/articles/s41598-018-29032-2>.
- Szajewska H, Skórka A, Ruszczyński M, Gieruszczak-Białek D. 2013. Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute gastroenteritis in children - updated analysis of randomised controlled trials. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* **38**:467–476. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.12403>.
- Taur Y et al. 2018. Reconstitution of the gut microbiota of antibiotic-treated patients by autologous fecal microbiota transplant. *Science Translational Medicine* **10**:eaap9489. Available from <https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aap9489>.
- Thorburn AN et al. 2015. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by

- maternal diet and bacterial metabolites. *Nature Communications* **6**:7320. Available from <http://www.nature.com/articles/ncomms8320>.
- Thursby E, Juge N. 2017. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* **474**:1823–1836. Available from <https://portlandpress.com/biochemj/article/474/11/1823/49429/Introduction-to-the-human-gut-microbiota>.
- Tidjani Alou M, Lagier J-C, Raoult D. 2016. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome Journal* **1**:3–11. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452231716300161>.
- Tyakht A V. et al. 2013. Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia. *Nature Communications* **4**:2469. Available from <http://www.nature.com/articles/ncomms3469>.
- van der Fels-Klerx HJ, Camenzuli L, Belluco S, Meijer N, Ricci A. 2018. Food Safety Issues Related to Uses of Insects for Feeds and Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **17**:1172–1183. Available from <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12385>.
- van Huis A. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology* **58**:563–583.
- van Huis A. 2016. Edible insects are the future? *Proceedings of the Nutrition Society* **75**:294–305. Available from https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665116000069/type/journal_article.
- van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Muir G, Vantomme P. 2013. *Edible Insects: Future Prospects for Food and Feed Security*. FAO, Rome.
- Vandeweyer D, Crauwels S, Lievens B, Van Campenhout L. 2017. Metagenetic analysis of the bacterial communities of edible insects from diverse production cycles at industrial rearing companies. *International Journal of Food Microbiology* **261**:11–18. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160517303628>.
- Walker AW et al. 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal* **5**:220–230. Available from <http://www.nature.com/articles/ismej2010118>.
- Williams JP, Williams JR, Kirabo A, Chester D, Peterson M. 2016. Nutrient Content and Health Benefits of Insects. Pages 61–84 *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012802856800003X>.
- Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Nasri R, Chaabouni M, Rinaudo M, Nasri M. 2012. Chitin and chitosan preparation from shrimp shells using optimized enzymatic deproteinization. *Process Biochemistry* **47**:2032–2039. Elsevier.
- Younes I, Rinaudo M. 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs* **13**:1133–1174. Available from <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/3/1133>.
- Zielińska E, Baraniak B, Karaś M, Rybczyńska K, Jakubczyk A. 2015. Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International* **77**:460–466. Elsevier Ltd.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AD	<i>Acheta domesticus</i>
BMK	bakterie mléčného kvašení
BO	<i>Blatta orientalis</i>
COS	chitooligosacharidy
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GIT	gastrointestinální trakt
KTJ	kolonie tvořící jednotku
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease, nealkoholové tučnění jater
NASH	non-alcoholic steatohepatitis, nealkoholová steatohepatitida
PCOS	polycystic ovary syndrome, syndrom polycystických vaječníků
PDCAAS	protein digestability corrected amino acid score, aminokyselinové skóre upravené dle stravitelnosti bílkoviny
rpm	revolutions per minute, otáčky za minutu
SCFA	short-chain fatty acids, mastné kyseliny s krátkým řetězcem
spp.	<i>subspecies</i> , poddruh
TM	<i>Tenebrio molitor</i>

10 Samostatné prílohy

Príloha č. 1 Růstové křivky laktobacilů z hmyzího média v porovnání s kontrolním MRS médiem

