

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Mikrobiologická kvalita výrobků z jedlého hmyzu

Diplomová práce

Bc. Alice Andrllová

Výživa a potraviny

Ing. Roman Švejtil, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Mikrobiologická kvalita výrobků z jedlého hmyzu" 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 14.4.2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu Ing. Romanu Švejtilovi, Ph.D. za pomoc v laboratoři i cenné rady při zpracování celé diplomové práce a veškerý čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat všem blízkým za podporu během celého studia.

Mikrobiologická kvalita výrobků z jedlého hmyzu

Souhrn

Tato diplomová práce se věnuje kvalitě a bezpečnosti jedlého hmyzu z mikrobiologického hlediska, jako možné ekonomické a ekologické alternativě jiných živočišných bílkovin. Nejprve je zmíněna současná legislativa hmyzu a hmyzích výrobků s následným popisem nutričního složení a obsahem makroživin i mikroživin cvrčka domácího (*Acheta domestica*) a larev potměšáka moučného (*Tenebrio molitor*). V návaznosti na složení nutrientů jsou popsána rizika konzumace, a to z hlediska chemického, biologického a především mikrobiologického. Mikrobiologii jedlého hmyzu je věnována samostatná kapitola, v které jsou popsány nejčastěji se objevující bakterie, které hmyz může obsahovat přirozeně, nebo jimi být kontaminován, s navazujícím problémem zajištění potravinové bezpečnosti potravin z jedlého hmyzu a eliminace rizikových bakterií pomocí zpracovatelských technologií.

V praktické části bylo cílem potvrdit výskyt často se objevujících bakterií jedlého hmyzu v potravinách s přídavkem cvrččí mouky či celých cvrčků domácích. Celkem bylo testováno 20 vzorků ze 7 kategorií výrobků, přičemž byly v první části použity klasické kultivační metody podle standardních postupů a platných technických norem a ve druhé části proběhla po kultivačním stanovení identifikace pomocí konfirmačních testů a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie u vybraných parametrů.

Výsledkem mikrobiologické analýzy je potvrzení přítomnosti 5 z 9 mikrobiologických ukazatelů. Nejčetnější skupinou jsou mezofilní aerobní bakterie, které byly detekovány ve všech výrobcích, vyjma jednoho vzorku, v rozmezí 3,60–8,43 log KTJ/g, nejvíce jich obsahovala kategorie celí pražení cvrčci s průměrnou hodnotou $7,45 \pm 0,43$ log KTJ/g. Dalšími detekovanými skupinami mikroorganismů jsou kvasinky a plísňe, které se objevily u 9 z 20 vzorků v rozmezí 1,00–3,68 log KTJ/g a největší zastoupení měly u proteinových kreků s přídavkem cvrččí mouky ($2,50 \pm 1,29$ log KTJ/g). V polovině analyzovaných výrobků se objevily i aerobní sporulující bakterie s nejvyšší hodnotou 4,58 log KTJ/g u pražených cvrčků, u kterých rovněž byl detekován nejvyšší nárůst *Bacillus cereus* s hodnotou 4,18 log KTJ/g. Mezi zbylými 4 druhy či skupinami mikroorganismů, jež byly naměřeny pod limitem detekce nebo vyšly negativní, jsou *Enterobacteriaceae*, bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella* spp.

Z provedených mikrobiologických analýz lze usoudit, že ne všechny analyzované výrobky jedlého hmyzu vyhovují hodnotám vyžadovaným legislativou a je třeba se více zaměřit na jejich mikrobiologickou kvalitu.

Klíčová slova: mikrobiota, nové potraviny, bakterie, potraviny nového typu

Microbiological quality of edible insect products

Summary

This thesis studies quality and safety of edible insect from microbiological point of view, as a possible economic and ecological alternative to other animal protein. Firstly the current legislation on edible insect and edible insect's products is mentioned, followed by description of the nutritional composition included macronutrient and micronutrient content of the house cricket (*Acheta domesticus*) and mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). In addition of the nutrient content the risks of consumption, by biological, chemical and mostly microbiological point of view are described.

For microbiology of edible insect, the separate chapter is dedicated, in which the most frequently occurring bacteria that insect may contain naturally or be contaminated with are described. Also, the issues of ensuring the food safety from edible insects and the elimination of hazardous bacteria using processing technologies are listed.

Aim of the practical part of this thesis was to confirm the occurrence of frequently appearing bacteria of edible insect in foods with the addition of cricket flour or whole cricket bodies. A total of 20 samples from 7 product categories were tested. The classic cultivation methods according to standard procedures and valid technical standards were used and for the confirmation of taxonomic identification, the biochemical tests or MALDI-TOF mass spectrometry was used.

The results of the microbiological analysis confirmed the presence of 5 out of 9 microbiological parameters. The most numerous group is mesophilic aerobic bacteria, which were detected in all products, except one sample, in the range of 3,60–8,43 log CFU/g, the most of them detected in the category of whole roasted crickets with an average value of $7,45 \pm 0,43$ log CFU/g. Other detected groups of microorganisms are yeasts and molds, which appeared in 9 out of 20 tested samples in the range 1,00–3,68 log CFU/g, and were mostly in protein crackers with the addition of cricket flour ($2,50 \pm 1,29$ log CFU/g). Aerobic spore forming bacteria appeared in half of the analyzed products with the highest value of 4,58 log CFU/g in whole roasted crickets, in which the highest counts of *Bacillus cereus* with a value 4,18 log CFU/g was also detected. *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp were not detected in tested samples.

From the results it out can be concluded, that not all analyzed products comply with the values required by food safety legislation and thus more attention should be paid to their microbiological quality.

Keywords: microbiota, novel food, bacteria, new food

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše.....	11
3.1 Konzumace hmyzu.....	11
3.1.1 Historie.....	11
3.1.2 Legislativa.....	12
3.2 Výživové vlastnosti	13
3.2.1 Makronutrienty.....	13
3.2.1.1 Bílkoviny.....	13
3.2.1.2 Tuky	15
3.2.1.3 Sacharidy	16
3.2.2 Mikronutrienty.....	16
3.2.2.1 Minerální látky.....	16
3.2.2.2 Vitaminy.....	17
3.2.3 Antinutriční látky	18
3.3 Bezpečnost.....	18
3.3.1 Toxiny a chemické látky	19
3.3.2 Alergeny	20
3.3.3 Mikrobiologické hledisko	20
3.4 Mikrobiologie.....	21
3.4.1 Mikrobiota jedlého hmyzu.....	22
3.4.2 Bakterie.....	22
3.5 Jedlý hmyz jako potravina a jeho zpracování.....	25
3.5.1 Technologie zpracování	27
3.5.2 Produkty z jedlého hmyzu	29
4 Metodika.....	29
4.1 Příprava vzorků	29
4.2 Kultivace	31
4.2.1 Kultivační média a metody kultivace jednotlivých mikroorganismů.....	32

4.3	Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie	37
4.4	Statistické vyhodnocení	39
5	Výsledky	40
5.1	Kultivace vzorků.....	40
5.2	Identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.....	42
6	Diskuze	43
6.1	Mikroorganismy.....	44
6.1.1	Celkové počty mezofilních aerobních mikroorganismů	44
6.1.2	Aerobní sporující mikroorganismy	44
6.1.3	<i>Escherichia coli</i>	45
6.1.4	<i>Bacillus cereus</i>	45
6.1.5	<i>Enterobacteriaceae</i>	45
6.1.6	Koagulázapozitivní stafylokoky a <i>Staphylococcus aureus</i>	46
6.1.7	<i>Salmonella</i> spp.....	46
6.1.8	Kvasinky a plísňe	46
6.2	Tepelné zpracování	47
7	Závěr	48
8	Seznam použité literatury	49
9	Elektronické zdroje.....	61
10	Seznam tabulek.....	62
11	Seznam obrázků	63
12	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	64
13	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Celosvětový nárůst poptávky po mase, jako hlavním zdroji bílkovin, se neustále zvyšuje v přímé korelaci se vzrůstajícím zalidněním na planetě Zemi. To vzhledem k omezené ploše půdy využitelné pro chov a pastviny všech hospodářských zvířat představuje v blízké budoucnosti problém, i s ohledem na udržitelnost produkce a ochranu životního prostředí. Na přelomu tisíciletí se začalo zintenzivňovat hledání vhodných alternativních zdrojů, které by zajistily dostatek energie a dostatek plnohodnotných bílkovin pro lidi na celém světě. Jedním z velmi efektivních, ekologických a ekonomických zdrojů se jeví právě jedlý hmyz.

Ten je v některých, především východních zemích a kulturách, konzumován již po tisíce let, postupně však o tuto alternativu vzrůstá zájem i v západním světě a Evropě. I když v poslední době popularita jedlého hmyzu stoupá, není některými konzumenty přijímán hlavně kvůli vizuálnímu dojmu z celých hmyzích těl, a proto se zavádění jedlého hmyzu do jídelníčku provádí spíše ve formách rozemletého hmyzu do mouček a jako ingredience do běžně konzumovaných potravin jako jsou pečivo, sušenky, slané snacky a další.

Jedlý hmyz tedy představuje potravinu s obrovským potenciálem, jelikož má přibližně stejný obsah bílkovin a složení aminokyselin jako konvenční maso. Navíc je nenáročný na využití půdy a má schopnost transformovat nízko hodnotné organické sloučeniny na vysoce hodnotné bílkoviny. Je však třeba brát v potaz i bezpečnost potravin spojenou s konzumací jedlého hmyzu, který může být kontaminován nežádoucími chemickými a biologickými látkami, z nichž největší problém představují patogenní mikroorganismy, či toxické látky.

V této diplomové práci je popsána historie konzumace hmyzu a jeho nutriční složení, následuje otázka bezpečnosti konzumace jedlého hmyzu a jeho mikrobiologické hledisko včetně postupu zpracování hmyzích těl. Praktická část je zaměřena na mikrobiologický rozbor různých druhů potravin s přídavkem hmyzí mouky, hmyzího proteinu či o celá hmyzí těla určená k přímé konzumaci.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bude testování výrobků obsahujících přídavek jedlého hmyzu z hlediska mikrobiologické kvality. Testovány budou hlavně tyčinky a těstoviny s přídavkem hmyzí moučky a samotná hmyzí moučka.

Hypotézou je, že výrobky budou obsahovat v určitém množství nežádoucí mikroorganismy, které byly předtím pozorovány v jedlém hmyzu, a to v závislosti na stupni opracování, což bude v práci náležitě diskutováno

3 Literární rešerše

3.1 Konzumace hmyzu

Jedním z nejstarších spojení člověka s hmyzem je právě jeho využití jako zdroje potravy, obecně známé jako entomofágie, která má původ z řečtiny ze slov “éntomon” (hmyz) a “phagein” (k jídlu). Ta dříve byla definována jako konzumace hmyzu jakýmkoli organismy, dnes už se používá především k označení lidské spotřeby hmyzu, konkrétněji jako antropeentomofágie. Ačkoli pro evropskou populaci se jedná o doposud ne příliš známou a běžnou součást jídelníčku, na celém světě hmyz konzumuje více než 2 miliardy lidí ve více než 130 zemích. Kulinářská úprava a využití jedlého hmyzu se liší na základě různých sociálně kulturních preferencí, společně ale mají to, že se jedná o výborný zdroj makronutrientů i mikronutrientů (Costa-Neto & Dunkel 2016).

Kromě dobrých nutričních hodnot upoutal jedlý hmyz pozornost také díky ekologickým a ekonomickým výhodám. Výzkumné a regulační orgány považují hmyz za potravinu budoucnosti nejen z hlediska levnější náhrady živočišných bílkovin, ale i z hlediska nízkého dopadu na životní prostředí. Chov hmyzu za účelem získání potravy může pomoci snížení emisí skleníkových plynů, zlepšení stavu znečištěné vody a k poklesu využití půdy pro pastviny (Raheem et al. 2019). Vzhledem k tomu, že některé druhy jsou zároveň zemědělskými škůdci, pomohla by jejich likvidace za potravinářskými účely ke snížení použití pesticidů, které mohou mít v mnoha případech špatný dopad na lidské zdraví. To celé se může zdát jako ideální, přesto jsou zde stále překážky v podobě možné přítomnosti patogenních mikroorganismů, antinutričních faktorů, alergenicity a odmítáním hmyzu a hmyzích výrobků mnoha spotřebiteli (Patel et al. 2019).

3.1.1 Historie

Důkazy o konzumaci hmyzu sahají až do dávného pravěku, kdy lidé ještě neznali nástroje pro lov a sběr potravy, byl převážnou součástí základní obživy. Tyto pravěké důkazy se uchovaly na základě lidských koprolitů, tedy zkamenělých exkrementů obsahující zbytky těl mravenců, larev brouků a dalších druhů hmyzu (Govorushko 2019). Yi a kolektiv (2010) ve své studii uvádějí, že hmyz byl běžně konzumován již 3200 let před naším letopočtem ve starověké Číně, konkrétně se jednalo o chov bource morušového a následnou konzumaci jejich kukel.

První písemné záznamy o entomofágii pochází ze Středního Východu přibližně 800 let před naším letopočtem, kde sluhové na královských hostinách podávali kobyly nabodnuté na špejlích. Z evropské historie existují první zmínky z Řecka, kdy filozof Aristoteles kolem roku 350 před naším letopočtem v jednom ze svých děl popisuje, jak lidé považují cikády za pochoutku a detailně popsal, za jakých podmínek chutnají nejlépe (van Huis et al. 2013). Ze starověkého Říma pochází záznam od přírodovědce Plinia staršího, který popsal pokrm zvaný “cossus”, představující s největší pravděpodobností zpracované larvy tesaříka

Cerambyx cerdo, který v té době považovali za potravinu srovnatelnou s jinak běžně konzumovaným masem. Plinius ve svém spisu dokonce uvádí, že tesařici byli vykrmováni moukou a vínem, za účelem zdokonalení jejich chuti (Costa-Neto & Dunkel 2016).

Za zakladatele moderního studia hmyzu je považován italský přírodovědec Ulisse Aldrovandi, který se ve svém díle „De Animalibus Insectis Libri Septem“ z roku 1602 věnuje historii entomofágie a zároveň pozorování hmyzu jako potenciálním zdroji pro lidskou výživu (van Huis et al. 2013). Novodobý vědecký výzkum se od 80. let minulého století rozšířil především o správnou identifikaci druhů, nutričního složení jednotlivých druhů a efektivní hospodaření za účelem zabezpečení potravinové bezpečnosti. V posledních letech se konzumace hmyzu zkoumá především jako potenciálně ekologičtější a udržitelnější zdroj pro lidskou výživu (Feng et al. 2018).

3.1.2 Legislativa

Jak již bylo zmíněno, hmyz a výrobky z hmyzu nejsou doposud v Evropě běžnou součástí jídelníčku, a proto spadají pod nařízení vztahující se pro tzv. nové potraviny (novel foods), což jsou takové, které nebyly před datem 15. 5. 1997 ve významné míře konzumovány v zemích Evropské unie (EFSA, 2018). Každý druh hmyzu před uvedením na trh prochází hodnocením bezpečnosti a schvalovacími procesy a na evropské úrovni se řídí podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 2015/2283 o nových potravinách a nových složkách potravin vydaného 25. listopadu 2015, které bylo speciálně upraveno s cílem nově definovat postupy pro posuzování a uvádění nových potravin na trh. Rovněž stejné nařízení stanovilo ve článku 35 odstavce 2 tzv. „přechodné období“, umožňující legalizovat všechny potraviny, které nebyly obsahem původního nařízení (Nařízení ES č. 258/1997), ačkoli byly na trh uvedeny v souladu s právními předpisy. Na základě národních výjimek se dostaly některé druhy hmyzu na vnitřní trh Evropské unie a byly podle článku 35 nařízení (EU) č. 2015/2283 od 1.1.2018 legalizovány pro trh některých členských států. Momentálně je v rámci tohoto přechodného opatření Nařízení (EU) č. 2015/2283 možné v České republice uvádět na trh celá či mletá těla jako potraviny u druhů v Tabulce č. 1. Konkrétní druhy, které byly s platnými předpisy uvedeny na trh před 1.1.2018 tak mohou být uváděny na trh do doby, než budou Komisí přijaté všechny žádosti o povolení nové potraviny daného druhu. Z toho vyplývá, že možnost uvádění daných druhů hmyzu v rámci přechodného opatření je omezená, jelikož po schválení všech podaných žádostí přechodné období daného druhu ztrácí platnost.

Tabulka č. 1: Druhy hmyzu možné uvádět na trh v České republice podle přechodného opatření Nařízení (EU) č. 2015/2283

Druh hmyzu	Latinský název	Vývojové stadium
Cvrček domácí	<i>Acheta domesticus</i>	imago, larva
Potemník stájový	<i>Alphitobius diaperinus</i>	larva
Saranče stěhovavá	<i>Locusta migratoria</i>	imago, larva
Potemník moučný	<i>Tenebrio molitor</i>	larva

(Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) 2015/2283)

K tomu v roce 2018 Ministerstvo zemědělství zpracovalo příručku o zásadách správné zemědělské a výrobní praxe pro produkci hmyzu, kde se zabývá chovem, požadavky na chov hmyzu a následné zpracování včetně hygieny, schvalovacích procesů a registraci výroby (Ministerstvo zemědělství 2018).

Podle novely Zákona č. 166/1999 Sb. o veterinární péči je v České republice možné provozovat hmyzí farmy za účelem lidské spotřeby nebo k výrobě zpracované živočišné bílkoviny. Roku 2015 vydal Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) vědecké stanovisko k rizikovému profilu související s produkcí a spotřebou hmyzu jako potravin a krmiva, které se zabývá potenciálními problémy spojenými s chovaným, zpracovaným a nezpracovaným hmyzem v celém výrobním procesu. Závěrem je, že bezpečnost jedlého hmyzu může ovlivnit mnoho faktorů: způsob chovu, substrát, fáze sklizně, druh hmyzu, vývojová fáze a zpracování hmyzu (EFSA Scientific Committee 2015).

3.2 Výživové vlastnosti

Co se týče výživových vlastností, má jedlý hmyz velmi variabilní nutriční hodnotu, a to hlavně z důvodu velké rozmanitosti a množství konzumovaných druhů. Hodnoty jednotlivých nutrientů se mohou lišit i o desítky procentních bodů, a to dokonce v rámci jednoho druhu. To je dáno především vývojovým stádiem, vlivem krmiva a podmínkách prostředí, ve kterém žijí, ale i v laboratorních metodách měření jednotlivých nutrientů (de Castro et al. 2018). I přes tyto rozdílnosti lze hmyz hodnotit jako vysoce kvalitní zdroj bílkovin, tuků a zdraví prospěšných mastných kyselin, vitaminů a minerálních látek (Borges et al. 2022), které jsou v této kapitole blíže rozepsány.

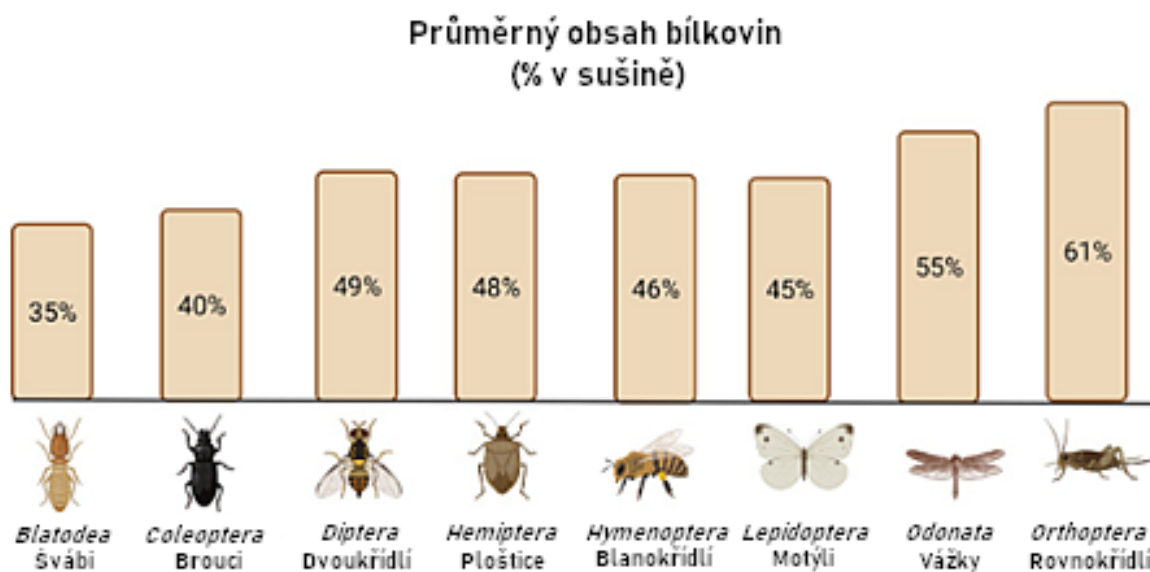
3.2.1 Makronutrienty

3.2.1.1 Bílkoviny

Hlavní dominantou jedlého hmyzu je především bohaté zastoupení bílkovin, ačkoli se, jak již bylo zmíněno, jejich obsah může velmi lišit. Bylo zjištěno, že průměrný obsah bílkovin v sušině

hmyzu bez tepelných úprav se pohybuje v rozmezí od 35 % do 61 % u různých druhů (Liceaga 2022), jak je zobrazeno na Obrázku č. 1. Köhler a kolektiv (2019) zkoumali především profil jednotlivých aminokyselin, jež jsou základními stavebními prvky bílkovin. Ve své studii uvádějí, že ve vzorcích běžně konzumovaných druhů hmyzu se nachází až 18 z celkových 20 existujících proteinogenních aminokyselin. Výsledný profil aminokyselin navíc z 10–30 % obsahuje všechny esenciální aminokyseliny, tedy takové, které si lidské tělo neumí samo syntetizovat. Jedná se o histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan a valin (Lange & Nakamura 2021).

Obrázek č. 1: Průměrný obsah bílkovin jedlého hmyzu v sušině.



Upraveno podle Liceaga (2022)

Lze říct, že potenciál hmyzu je v této oblasti velmi vysoký. Co se týká celosvětové spotřeby bílkovin na osobu, v rozvinutých zemích se pohybuje okolo 96 g/den, zatímco v rozvojových zemích 56 g/den a v nejchudších zemích ještě méně. Zastoupení příjmu živočišných bílkovin je v bohatších zemích 65 % celkové spotřeby a v chudších pouze 15 % (Belluco et al. 2013). Jelikož některé legislativně schválené druhy jedlého hmyzu mohou převyšovat obsah bílkovin v porovnání s běžně konzumovanými masnými výrobky (Raheem et al. 2019), mohly by poskytnout i cenný a levný zdroj vysoce stravitelných bílkovin a výrazně tak zlepšit nutriční kvalitu lidské stravy po celém světě (Lange & Nakamura 2021). Pro představu je v Tabulce č. 2 uvedeno průměrné množství bílkovin u 2 druhů hmyzu potměníka moučného a cvrčka domácího v porovnání s jinými živočišnými druhy.

Tabulka č.2: Srovnání obsahu bílkovin u hmyzu a jiných konzumovaných živočišných druhů.

Druh	Název	Fáze vývoje	Obsah bílkovin (g/100 g čisté bílkoviny)
hmyz	potemník moučný (<i>Tenebrio molitor</i>)	larva	14–25
hmyz	cvrček domácí (<i>Acheta domesticus</i>)	dospělec	8–25
savci	tur domácí (<i>Bos primigenius</i>)	-	19–26
ryby	makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	-	16–28
korýši	humr evropský (<i>Homarus gammarus</i>)	-	17–19

van Huis et al. (2013)

Měření hodnot bílkovin a aminokyselin u jednotlivých druhů se provádí z hmyzí moučky. Jedná se o vysušená a rozemletá těla dále resuspendovaná ve vodném roztoku. Nejpoužívanější metodou pro získání bílkovinné frakce je alkalická extrakce s kyselým vysrážením bílkovin při jejich hodnotě izoelektrického bodu. Výsledky jsou však velmi variabilní druh od druhu, důležitou roli hraje i poměr pevné látky a vody, hodnota pH nebo teplota při přípravě moučky. Například u larev potemníka moučného se obsah dusíkatých látek při hodnotě pH = 4 zvýšil o 14,4 % oproti výchozímu extraktu (Jantzen da Silva Lucas et al. 2020). Naměřená množství dusíkatých látek však mohou být vyšší než jejich skutečný obsah, jelikož je část dusíku vázána i v exoskeletu (Kouřimská & Adámková 2016).

3.2.1.2 Tuky

Hned po bílkovinách má tuk druhý nejvýznamnější podíl v nutričním složení jedlého hmyzu, a to od 10 do 50 % celkového obsahu. Jedná se o životně důležité, energeticky bohaté makromolekuly, které ve strukturním a biologickém fungování buněk pomáhají při transportu nutričně nezbytných komponentů. Uchovávají a dodávají energii a chrání různé orgány (Xiaoming et al. 2010) a jsou rovněž součástí buněčných membrán. Nejnížší obsah tuků v jedlém hmyzu (přibližně 13,5 % v sušině) zastupuje rod *Orthoptera* (cvrčci, kobylky, sarančata), naopak brouci a termiti obsahují průměrně až 33 % tuků v sušině (van Huis et al. 2021). Stěžejním faktorem je pohlaví a vývojové stádium, obecně u všech druhů platí, že více tuku obsahují samičky než samci, a více tuku najdeme v larvách a kuklách oproti dospělcům (Mlček et al. 2014).

Složení tuku jedlého hmyzu představuje cca 80 % triacylglycerolů a 20 % fosfolipidů, přičemž v larvální fázi může být zastoupení triacylglycerolů ještě vyšší. Profil triacylglycerolů (a tedy mastných kyselin) může být selektivně zvýšen prostřednictvím krmiva, ale obecně platí, že

nenasyčené mastné kyseliny výrazně převyšují ty nasycené (de Castro et al. 2018). Z nasycených mastných kyselin jsou to nejvíce kyseliny palmitová (C16) a stearová (C18), z mononenasyčených kyseliny palmitoolejová (C16:1n7) a olejová (C18:1n9) (van Huis et al. 2021). Z polynenasycených mastných kyselin jsou významné n-3 mastné kyseliny s dlouhým řetězcem jako je kyselina α -linolenová, kyselina eikosapentaenová (EPA) a kyselina dokosaheptaenová (DHA) (Mlček et al. 2014).

3.2.1.3 Sacharidy

Sacharidy jsou u hmyzu zastoupeny především chitinem, jako hlavní součástí jejich exoskeletu, a to především ve fázi dospělců (Finke 2007). Chitin je všeobecně považován za vlákninu, jelikož jako polysacharid není v trávicím traktu stravitelný a dochází k jeho rozkladu až za pomoci střevních bakterií kolonizujících tlusté střevo, které polysacharidy využívají jako zdroj energie (Flint 2012). Navíc je přítomen při stanovení acido-detergentní vlákniny (ADF) a svojí strukturou se podobá celulóze (lineární polymery jednotek N-acetyl-D-glukopyranózy spojené 1,4- β -glykosidickou vazbou vs. lineární polymery jednotek N-acetyl-D-glukosaminu spojené 1,4- β -glykosidickou vazbou) (Finke 2007).

Ačkoli chitin vykazuje u monogastrických živočichů (včetně člověka) značné problémy se stravitelností a asimilací s jeho deriváty, má vlastnosti, o které vzrůstá zájem především v lékařství, průmyslu i zemědělství. V lékařství je využitelný jako hemostatický prostředek pro obnovu tkání, antikoagulant, dále zlepšuje hojení popálenin a ran a významně snižuje hladinu cholesterolu v krevním séru. V průmyslu se dá využít jako biologicky odbouratelný plast použitelný pro klasické spotřební zboží s vysokou pevností v tahu a v zemědělství inhibuje růst půdních patogenů a nežádoucích organismů a pomáhá tak zvyšovat výnosy plodin. Pokud se v budoucnu rozvine zpracování hmyzu (například na proteinové koncentráty), lze chitin využívat jako vedlejší produkt pro všechny již zmíněné účely (Mlček et al. 2014).

3.2.2 Mikronutrienty

3.2.2.1 Minerální látky

Více než sacharidy, je u jedlého hmyzu zajímavější bohaté zastoupení mikroelementů a stopových prvků. Většina druhů obsahuje značné množství vápníku, chromu, mědi, železa, draslíku, hořčíku, manganu, sodíku, fosforu a zinku. Všechny tyto prvky jsou nezbytné pro správné fungování fyziologických systémů vyskytujících se v lidském těle, včetně hormonální, nervosvalové a reprodukční soustavy (Mabelebele et al. 2022). Podle hodnot Společnosti pro výživu (2019) mají dokonce některé naměřené hodnoty potenciál dosáhnout referenčních hodnot pro příjem živin dle Referenčních hodnot pro příjem živin (DACH) ve 100 gramové porci na den pro dospělého člověka, jak je uvedeno v Tabulce č. 3. Je ale třeba brát hmyz jako zpestření běžného jídelníčku, neboť sníst za den 100 g porci hmyzu není příliš reálné. Největší konzumenti hmyzu, tedy obyvatelé thajské provincie Ubon, průměrně spotřebují 20–60 g hmyzu na osobu na den (Tae-Kyung et al. 2019).

Tabulka č. 3: Obsah prvků ve vzorcích jedlého hmyzu (v mg/100 g sušiny) a porovnání s referenčními hodnotami příjmu živin (DACH) (v mg/den pro dospělého člověka)

Prvek	Cvrček domácí <i>Acheta domesticus</i> (mg/100 g sušiny)	Potemník moučný <i>Tenebrio molitor</i> (mg/100 g sušiny)	Doporučení DACH v mg/den
Ca	176-265	66-142	1200
Cr	0,013-0,018	0,008-0,023	0,03-0,1
Cu	1,8-2,9	2,1-2,4	1-1,5
Fe	4,2-5,1	4,5-5	12
K	1075-1154	994-1187	2000
Mg	84-125	263-335	400
Mn	2,5-2,8	0,5-0,9	2-5
Na	331-413	159-208	550
P	741-896	798-1054	1250
Zn	16-16,9	11,2-14,1	10

Kosečková et al. (2022); Společnost pro výživu (2019)

Předmětem zkoumání však stále zůstává míra dostupnosti těchto minerálních látek, jelikož během zpracování mezi nimi může docházet k interakcím s jinými obsaženými látkami, mezi které patří chitin, bílkoviny, či fytochemikálie. Tyto vzniklé sloučeniny mohou snižovat jejich biologickou dostupnost a vstřebatelnost pro člověka (Kosečková et al. 2022). Latunde-Dada a kolektiv (2016) zkoumali několik druhů hmyzu se zaměřením na železo jako biologicky dostupného zdroje a ukázalo se, že jeho rozpustnost je dokonce vyšší než u hovězího masa. Mimo jiné také zjistili, že kromě železa je u cvrčků a moučných červů také výrazně vyšší biologická dostupnost vápníku, mědi, hořčíku, manganu a zinku.

3.2.2.2 Vitaminy

Stejně jako u ostatních nutrientů, je složení vitaminů velmi variabilní na základě druhové rozdílnosti (Ordoñez-Araque & Egas-Montenegro 2021). Z dosavadně provedených analýz se v jedlém hmyzu mohou objevovat značná množství karotenů, vitaminů B₁, B₂, B₆, D, E, K a C (Xiaoming et al. 2010).

Z dosavadních studií lze obecně hmyz považovat za dobrý zdroj vitamínu B, zejména kobalaminu (B₁₂), což představuje zajímavou alternativu příjmu pro některé vegetariány, kteří musí kobalamin doplňovat uměle vlivem jeho nedostatku z pestré stravy z živočišných výrobků (Ordoñez-Araque & Egas-Montenegro 2021). Douglas (2017) ale ve své studii zmiňuje, že některé vitaminy skupiny B jsou relativně nestabilní při vystavení světlu, teplu, nebo kyslíku a

vznikají tak rozdílné výsledky analýz, způsobené i rozdílnými přípravami vzorků k analýze a použitím různých analytických metod.

Vitamin A (retinol) dosahuje v chovaném hmyzu relativně nízkých hodnot, obvykle méně než 300 µg/kg sušiny, a v tomto případě nepomáhá ani zvýšený příjem retinolu v krmném substrátu. Naproti tomu hmyz obsahuje značná množství karotenoidů, které mohou být v lidském těle na vitamin A přeměněny v játrech. Na obsah vitaminu E byly provedeny studie u cvrčka domácího a larev potemníka moučného, které měly velmi různorodé výsledky. Zatímco u cvrčka domácího bylo v průměru změřeno od 5 do 79 mg/kg sušiny, u larev potemníka moučného hodnoty nedosahovaly více než 15 mg/kg sušiny (Finke & Oonincx 2014). Obecně platí, že u analýzy všech vitaminů v jedlém hmyzu závisí na tom, jestli je pozorován čerstvý, nebo už tepelně zpracovaný hmyz (Douglas 2017).

3.2.3 Antinutriční látky

Některé druhy hmyzu obsahují mimo základních makro a mikroživin i látky antinutriční, které mohou u člověka ovlivňovat stravitelnost bílkovin, vstřebávání minerálů a mají schopnost snížit jejich biologickou dostupnost, čímž přispívají ke zhoršené gastrointestinální a metabolické výkonnosti (Aguilar-Toalá et al. 2022). Řadí se sem například oxaláty, třísloviny, kyanogenní glykosidy, alkaloidy, fytáty nebo saponiny. Weru a kolektiv (2021) ve své studii mezi nejčastější antinutriční látky v jedlém hmyzu zařazují právě oxaláty a fytáty. Oxaláty v lidském organismu snižují vstřebávání vápníku a hořčíku a také vytváří komplexy s bílkovinami (uvádějí jejich průměrnou hodnotu na $3,07 \pm 3,54$ mg/100 g). Fytáty se vážou na bílkoviny a minerály, čímž snižují jejich biologickou dostupnost.

Antinutriční látky však mohou mít i příznivé účinky, které závisí na jejich chemické struktuře a člověkem požitá dávce (Raheem et al. 2019). Panel EFSA pro výživu, nové potraviny a potravinové alergenů prohlásil, že kupříkladu moučka z cvrčka domácího má srovnatelné koncentrace antinutričních faktorů s koncentracemi přítomnými v jiných běžných potravinách a potraviny vyrobené z jedlého hmyzu nejsou nutričně nevýhodné (EFSA NDA 2021). Aguilar-Toalá a kolektiv (2022) tvrdí, že některé metody zpracování, jako je vaření a sušení, pomáhají snižovat koncentraci antinutričních látek.

3.3 Bezpečnost

Rostoucí popularita zavádění hmyzu do lidské stravy dává stále větší pozornost otázkám týkajícím se jeho bezpečnosti. Ať se jedná o celá těla, nebo o již zpracované výrobky, zahrnuje hodnocení bezpečnosti sledováním škodlivých mikroorganismů, parazitů, toxinů, těžkých kovů, veterinárních léčiv, hormonů a reziduí pesticidů (Baiano 2020). EFSA (2015) ve své studii o riziku spojeném s využíváním hmyzu (jako součást potravin pro lidskou stravu a jako krmivo pro zvířata) dospěl k závěru, že největší riziko závisí na podmínkách chovu včetně použitého krmného substrátu a následném zpracování.

V některých zemích a kulturách je hmyz běžnou součástí jídelníčku (Yen 2009). Například v Číně a Thajsku je konzumace hmyzu součástí kultury přes 2000 let a připravují zde asi 324 druhů hmyzu. Dlouhou tradici mají i africké země, kde je konzumováno až 470 druhů (Tae-Kyung et al. 2019). Ačkoli tyto populace znají původ hmyzu, může být odchyt z volné přírody jisté riziko, vzhledem k obsahu potenciálně škodlivých mikroorganismů nebo toxických látek divokých rostlin či z kontaminovaných půd (Murefu et al. 2019). Souhrnně lze říct, že stále nejsou příliš objasněna všechna potenciální rizika související s chovem a využitím hmyzu při výrobě potravin. Ty lze seskupit do tří kategorií: chemická hlediska, mikrobiologická hlediska a obsah alergenů (Imathiu 2020).

3.3.1 Toxiny a chemické látky

Všechny chemické a toxikologické obavy týkající se zavádění hmyzu jako běžné složky potravy, jsou spojené především s toxiny z prostředí, toxiny z potravy a s používáním insekticidů. Ty jsou pro spotřebitele potenciálně nebezpečné, zejména pokud hmyz nepochází z kontrolovaných podmínek a neodpovídá platným předpisům o bezpečném chovu (Schlüter et al. 2017). Se správným chovem souvisí i minimalizace výskytu těžkých kovů jako jsou arsen a kadmium, které se mohou hromadit v larvách potměníka moučného i v larvách dalších druhů a rovněž způsobují nepříznivé zdravotní problémy (Lange & Nakamura 2021). V současné vědecké literatuře se studie zaměřené na hmyz věnují spíše eliminaci hmyzu pomocí pesticidů, než obsahu toxinů kumulujících se v hmyzích tělech a s tím souvisejícími problémy pro lidské zdraví jako jsou otravy a hromadění karcinogenních látek především v játrech a dalších orgánech (Alrifai & Marcone 2019).

Výzkum o bezpečnosti hmyzu a obsahu škodlivých látek, by tak stejně jako u jiných zvířat či rostlin, měl zahrnovat všechny toxické látky, které může hmyz přijmout z krmiva a také ty syntetizované samotným hmyzem (Belluco et al. 2013). Konkrétně lze dle tohoto kritéria hmyz rozdělit do tří kategorií: hmyz z toxikologického hlediska potenciálně bezpečný, který se živí pouze jedlými rostlinami, dále hmyz fanerotoxický a kryptotoxický. Fanerotoxický hmyz je takový, který v případě nebezpečí využívá speciální orgán pro syntézu jedu, jako je tomu u včel a mravenců. Takto vzniklé jedy se řadí mezi biogenní aminy a v lidském těle jsou inaktivovány v trávicím traktu, ale v případě bodnutí do úst či jícnu mohou být ve vysoké míře velmi nebezpečné a způsobovat anafylaktický šok. Kryptotoxický hmyz je mnohem problematičtější, jelikož tvoří toxiny jako produkty metabolismu, lokalizované ve specifických strukturách, nebo rozptýlené v různých částech těla (Raheem et al. 2019).

Události, ke kterým v minulosti došlo, veškeré tyto obavy jenom potvrzují. Příkladem může být Thajsko, kde došlo vlivem celostátního zemědělského programu na desinsekcii polí k rozsáhlým zdravotním problémům po prodeji a konzumaci hmyzu na trzích po celé zemi. Dále Kuvajt, kde výsledky získané studie o toxicitě hmyzu uvádí, že v odchycených sarančatech z pole ošetřeného pesticidy našli vysoké množství organofosforových pesticidů, zejména sumithion a malathion, které jsou pro člověka považovány za mírně až středně toxické (Belluco

et al. 2013). Raheem a kolektiv (2019) popisují nálezy metabolických steroidů u brouků čeledi *Dytiscidae*, konkrétně dihydrotestosterony a testosterony, které by při pravidelné konzumaci mohly způsobit hypofertilitu, zpomalení růstu, otoky, a dokonce i rakovinu jater.

3.3.2 Alergeny

Při práci s novými zdroji potravy, včetně jedlého hmyzu, je nutné vyhodnotit i možná rizika jejich alergenního potenciálu včetně jejich taxonomických vztahů se známými alergenními zdroji (Ribeiro et al. 2018), jelikož potravinové alergie jsou relativně nově se objevující problém veřejného zdraví a představují velkou výzvu pro potravinářský průmysl i medicínu v celém vyspělém světě. Tyto alergie lze definovat jako nepříznivé imunitní odpovědi těla na bílkovinnou část potravy zprostředkované IgE (Imathiu 2020).

Citliví jedinci se po požití, či jiné expozici s tělem (inhalace, kontakt s kůží) stávají senzibilní na dané bílkoviny z potravy. To vede k produkci specifického IgE, který si tělo zapamatuje a při následujícím vystavení stejného alergenu buněčně vázaný IgE alergen rozpozná a spustí alergickou reakci (Verhoeckx et al. 2016). U alergiků tedy může v podstatě jakákoli potravina obsahující bílkoviny vyvolat alergickou reakci, která se může projevit mírnými přechodnými účinky v podobě ekzému, dermatitidy, svědění, otoků, senné rýmy, či horšími dlouhodobými projevy jako je bronchiální astma. V některých případech mohou vést k fatálnějších následkům a v nejhorších případech až k smrti (Imathiu 2020).

Hlavními alergenními strukturami u hmyzu jsou glykoproteiny. U členovců je registrováno až 239 jednotlivých látek potenciálně způsobujících alergické reakce a většinou se jedná o takzvané panalergenní bílkoviny, které lze kategorizovat do 3 skupin. První jsou svalové bílkoviny (tropomyosin, myosin), druhé buněčné proteiny (tubulin) a poslední enzymy (argininkináza, α -amyláza) (Schlüter et al. 2017). Pokud jde o konzumaci hmyzu, alergenní riziko vzniká především v důsledku možné zkřížené reakce s jinými členovci, zejména korýši a domácími roztoči, kteří patří do nejčastěji se vyskytujících alergenů na světě (de Gier & Verhoeckx 2018).

Verhoeckx a kolektiv (2014) ve své studii prokázali v 6 ze 7 případů citlivost na potměšila moučného, kde byly identifikovány 2 proteiny vázající IgE: arginkináza a tropomyosin. Ten je pro alergiky nebezpečný u zkřížených alergií, ale ukázalo se, že při primární alergii zůstává silnějším alergenem bílkovina z larvální kutikuly (de Gier & Verhoeckx 2018).

3.3.3 Mikrobiologické hledisko

Podobně jako jiné živočišné druhy, obsahuje hmyz velmi rozmanitá mikrobiální společenství jenž jsou: bakterie, viry, prvoci, houby a archea, které mezi sebou mají různé symbiotické vztahy od mutualismu až po patogenismus (Raheem et al. 2019). Všechny tyto mikroby souhrnně označujeme jako mikrobiotu daného organismu a nachází se jak u hmyzu v přírodě, tak v kontrolovaném prostředí. Většina druhů mikrobů přítomných v hmyzu (na povrchu i uvnitř těla) je při tepelném zpracování považována za neškodné pro lidské spotřebitele

a pravděpodobně ani nezpůsobují výrazné kažení potravin (Garofalo et al. 2019). Marshall a kolektiv (2016) popisují, že se s mnoha stejnými mikroby setkáváme jako s běžnou složkou potravin, ale přesto považují přezkoumání aspektů vnitřního mikrobiomu hmyzu za důležité, z hlediska velké variability každého jedince a možného výskytu patogenů. Studie odhalily, že rozmanitost střevní mikrobioty je výrazně vyšší u všežravého hmyzu, než u hmyzu býložravého (Grabowski & Klein 2017), ale obecně lze shrnout, že syrový jedlý hmyz obsahuje vysoký počet mezofilních aerobů, sporotvorných bakterií, psychrotrofních aerobů a případně i dalších škodlivých druhů (Garofalo et al. 2019).

Mimo bakteriální kontaminace mohou jedlý hmyz napadat i plísně a kvasinky s mykotoxigenními účinky zastoupenými rody *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, *Penicillium* a mnoha dalšími. Mykotoxiny produkované těmito houbami jsou produkty sekundárního metabolismu a jsou pro člověka vysoce toxické již v malých dávkách. Rovněž jako sporulující bakterie přežívají mykotoxiny tepelné opracování a mohou v potravinách přetrvávat i po odstranění plísní (Ordoñez-Araque & Egas-Montenegro 2021). Konkrétním druhům a podrobnějšímu popisu mikrobioty hmyzu je věnována následující kapitola.

3.4 Mikrobiologie

Ačkoli je mikrobiota všech členovců vysoce komplexní, skládá se v zásadě z druhově specifického základního společenství bakterií a souboru dalších mikroorganismů schopných reagovat na řadu změn během jejich života (Grabowski & Klein 2017). U hmyzu najdeme dvě skupiny bakterií, které je třeba považovat za potenciální nebezpečí pro výrobu potravin či krmiv. První skupinou jsou komenzální bakterie, které mohou být zapojeny do různých pochodů na, nebo uvnitř těla a mají pro hmyz kladné účinky. Druhou skupinu zastupují patogenní bakterie, které je nutné při zpracování hmyzu identifikovat a definovat jejich nebezpečí pro člověka, jelikož jsou schopné vyvolat lidská alimentární onemocnění. Do hmyzu jsou patogenní bakterie zavlečené během chovu a zpracování, či přeneseny z prostředí jiným způsobem (EFSA 2015). Několik studií běžně konzumovaného hmyzu odhalilo, že rozmanitost mikroorganismů z obou skupin bakterií je výrazně vyšší u všežravého hmyzu, než u hmyzu býložravého (Grabowski & Klein 2017), ale obecně lze shrnout, že syrový jedlý hmyz obsahuje vysoký počet mezofilních aerobů, sporotvorných bakterií, psychrotrofních aerobů a případně dalších potenciálně škodlivých skupin (Garofalo et al. 2019). Z dostupných studií vyplývá, že i když každý druh hmyzu hostí naprosto odlišnou skupinu bakterií, rody *Bacteroides*, *Enterobacter*, *Bacillus* a *Citrobacter* najdeme téměř u každého druhu (Belluco et al. 2013).

Jak již bylo zmíněno, pro člověka jsou nejvíce znepokojující takové bakterie, které jsou pro lidský organismus patogenní a jsou schopné vyvolat mimo jiné i alimentární onemocnění. Jejich výskyt je u hmyzu a u potravin vyrobených z hmyzu v zastoupení rodů: *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., nebo bakterie spadající pod čeleď *Enterobacteriaceae*, které jsou: *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp. nebo *Yersinia* spp. (Schlüter et al. 2017). Nejvíce

nebezpečné jsou sporotvorné bakterie, které jsou díky tvorbě spor schopné přežít extrémní podmínky a jsou odolné vůči běžně zavedeným tepelným úpravám potravin, jedná se o *Bacillus* spp. a *Clostridium* spp. (Ordoñez-Araque & Egas-Montenegro 2021).

3.4.1 Mikrobiota jedlého hmyzu

Při hodnocení mikrobiologických aspektů jedlého hmyzu je třeba počítat s tím, že hmyz je, stejně jako jiné organismy, přirozeným přenašečem mikroorganismů složených z bakterií, archea, hub, prvoků a virů (Marshall et al. 2016). Kromě povrchu těla a dutiny ústní jsou pro mikroorganismy hlavním biotopem střeva, jehož osidlování u hmyzu probíhá různými způsoby: přes vaječníky a pouzdro vajíčka, stěrem během kladení vajíček či prostřednictvím stravy a prostředí. Objem střevního traktu hmyzu se pohybuje od 0,05 do 2 ml, o hustotě 10^6 – 10^{12} bakterií na 1 ml v závislosti na analyzovaném segmentu střeva (Schlüter et al. 2017). Při zpracování hmyzu za účelem produkce je tedy nutné předpokládat, že existuje vysoká mikrobiální kontaminace, kterou je potřeba zredukovat vhodnými zpracovatelskými procesy, například tepelným ošetřením. Mimo to lze kontaminaci, pro člověka patogenními a toxinotvornými druhy, částečně snížit i kontrolovanými podmínkami chovu (Eilenberg et al. 2015), na což zareagoval Evropský úřad pro bezpečnost potravin a na základě toho navrhl možnou klasifikaci krmných substrátů pro chov hmyzu s různou úrovní potenciálního nebezpečí (EFSA 2015).

3.4.2 Bakterie

***Enterococcus* spp.**

Enterococcus spp. jsou grampozitivní bakterie nevytvářející spory. Jedná se o chemoorganotrofní fakultativní anaeroby s homofermentativním metabolismem, jejichž převládajícím konečným produktem v metabolismu sacharidů je kyselina mléčná. Celý rod bakterií *Enterococcus* čítá 62 popsáných druhů a jsou považovány za komenzální organismy lidského gastrointestinálního traktu, i přesto mohou být patogenní a způsobovat močové a gynekologické záněty, či jiné infekce břišní dutiny. To souvisí i s jejich teplotou růstu, která se v optimu pohybuje od 35 °C do 37 °C. Mimo to jsou *Enterococcus* spp. velmi odolné k vysokým teplotám a pH a jsou vysoce rezistentní k některým antibiotikům (García-Solache & Rice 2019; [Online 1]).

***Streptococcus* spp.**

Rod *Streptococcus* zahrnuje více než 114 druhů grampozitivních bakterií ve formě organizovaných párů nebo řetězců koků. Některé druhy jsou komenzální, žijící na kůži a v zažívacím traktu, existují však i druhy patogenní či oportunně patogenní pro lidi i zvířata. Hlavním streptokokovým patogenem u lidí je *Streptococcus pneumoniae*, který je odpovědný za závažné infekce jako je pneumonie a meningitida (Haenni et al. 2018; [Online 2]).

Identifikace streptokoků je založena na hemolytické reakci s krevním agarem. Pod tímto kritériem rozlišujeme tři skupina: alfa, beta a gama hemolytické streptokoky. Mezi alfa-hemolytické bakterie se řadí například *Streptococcus pyogenes*, mezi beta-hemolytické *Streptococcus agalactiae*. Oba tyto druhy jsou lidské patogeny způsobující faryngitidu, kožní problémy, novorozeneckou meningitidu a zápal plic (Spickler 2020).

Staphylococcus spp.

Do rodu *Staphylococcus* se řadí více než 50 druhů grampozitivních bakterií, osidlující kůži a sliznice člověka i mnoha zvířecích druhů. Z toho vyplývá že většina z nich jsou neškodné, ale při špatné manipulaci s potravinami mohou některé druhy způsobovat otravy z jídla. Jedním z nich je *Staphylococcus aureus*, jehož toxiny jsou odolné vůči velkému rozmezí teplot a mohou přetrvávat v potravinách i po běžné tepelné úpravě. Jedná se tak o hlavní příčinu alimentárních onemocnění (gastroenteritid) na celém světě. Další stafylokokové infekce mohou způsobit nevolnost až silné křeče břicha s následným průjem či zvracením (Fetsch & Johler 2018).

Pseudomonas spp.

Rod *Pseudomonas* zahrnuje velmi komplexní druhy gramnegativních bakterií s metabolickou všestranností, které umí využívat širokou škálu organických i anorganických sloučenin, žít v různých podmínkách prostředí a rychle se množit (Sampedro et al. 2014). V důsledku toho jsou všudypřítomné a jsou tak patogenními pro rostliny, zvířata i člověka. Téměř všechny druhy *Pseudomonas*, včetně nejčastěji uváděného patogenu *Pseudomonas aeruginosa*, jsou odolné vůči některým antibiotikům, dezinfekčním prostředkům, detergentům i organickým rozpouštědlům (Moore et al. 2006).

Bacillus spp.

Bakterie *Bacillus spp.* jsou tyčinkovité grampozitivní aerobní (některé fakultativně anaerobní) bakterie, které produkují spory při vyčerpání živin a při reakci na nepříznivé vnější podmínky. Tyto spory zůstávají v klidovém stavu a umožňují perzistenci v prostředí a potravinách, navíc jsou odolné vůči technologickým úpravám potravin jako je tepelný záhřev, chemická úprava nebo UV záření. Všechny zmíněné vlastnosti dělají z *Bacillus spp.* všudypřítomné bakterie v přirozeném prostředí a běžné kontaminanty potravin (Carlin 2016).

V potravinách přežívají vegetativní buňky vznikající po klíčení spor kvůli velké přizpůsobivosti na široké rozmezí teplot, pH i aktivity vody, kde se mohou snadno množit a způsobují tím kažení. Jako příčiny otrav z kontaminovaných potravin bakteriemi *Bacillus* jsou hlášeny druhy *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* a *Bacillus pumilus* (Carlin 2016). Nejzávažnější obavy o veřejné zdraví a bezpečnost potravin představuje bakterie *Bacillus cereus*, která je zodpovědná za dva typy gastrointestinálních onemocnění – emetický a průjmový. První je intoxikace jídlem, způsobená požitím toxinu cereulidu projevující se

nevolností a zvracením, druhé onemocnění vzniká po požití bakteriálních buněk a následné produkci enterotoxinu v tenkém střevě, který způsobuje infekci střeva následné průjmy a bolesti břicha (Dietrich et al. 2021).

***Clostridium* spp.**

Rod *Clostridium* zahrnuje více než 200 známých grampozitivních, anaerobních a sporotvorných bakterií (Parte 2013). Ačkoli je většina zástupců saprofytických a neúčastní se chorobných procesů, je zbylým patogenním druhům *Clostridium* věnována velká pozornost, a to proto, že jsou původci závažných lidských onemocnění jako je botulismus a tetanus. Botulismus a další závažná onemocnění, způsobují dva nejběžnější alimentární patogeny: *Clostridium botulinum* a *Clostridium perfringens*. Navzdory škodlivým účinkům některých druhů se v rodu *Clostridium* nachází i specifické kmeny s prospěšnými účinky. Příkladem mohou být určité kmeny *Clostridium butyricum*, které mají ochranné účinky proti některým patogenům a jsou komercializovány jako probiotika (Palahagedara et al. 2020).

***Escherichia* spp.**

Rod *Escherichia* se skládá z gramnegativních anaerobních bakterií osidlujících tlusté střevo lidí a teplokrevných zvířat. Nejrozšířenějším druhem je *Escherichia coli*, pod kterou spadají množství kmenů s různými vlastnostmi. Většina z nich jsou ve střevech neškodné a jen zřídka způsobují onemocnění u zdravých jedinců, za to existuje i řada patogenních kmenů vyvolávající průjmová onemocnění i u zdravých jedinců. Tyto patogenní kmeny se dále dělí dle mechanismu virulence a následných klinických příznaků na několik patotypů (Gomes et al. 2016).

***Enterobacter* spp.**

Do rodu *Enterobacter* se řadí doposud 22 nalezených druhů gramnegativních, fakultativně anaerobních bakterií. Ačkoli se většinou jedná o nepatogenní komenzální bakterie našeho mikrobiomu, mohou způsobovat například záněty močových cest či dokonce dětskou meningitidu. Nejčastěji objevené druhy u klinických infekcí představují *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* a *Enterobacter hormaechei*, a to díky jejich adaptaci na antimikrobiální látky a jejich oportunisticky patogenní chování. Největší hrozbou tak představuje jejich přirozená rezistence na řadu antibiotik (Davin-Regli et al. 2019).

***Salmonella* spp.**

Salmonella spp. jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní bakterie spojené s onemocněním přenášeném z potravin způsobující salmonelózu (Jajere 2019). Nejvíce prozkoumanými druhy jsou *Salmonella bongori* a *Salmonella enterica*, která je velmi silným patogenem zvířat i lidí (Alenazy 2022).

I přes to, že jsou v potravinách zjišťovány nové patogeny, *Salmonella* spp. zůstávají největší hrozbou, a to kvůli narůstající antibiotické rezistenci vedoucí k závažnému onemocnění

zvanému salmonelóza (Mařka & Popowska 2016). Klinickým obrazem salmonelózy je břišní tyfus, gastroenteritida a bakteriémie s nejčastějšími příznaky bolesti břicha, horečkou či zvracením a průjmem. Jelikož jsou *Salmonella* spp. v přírodě široce rozšířeny a dobře přežívají v různých potravinách, dochází k infekci nejčastěji právě přes kontaminované potraviny a jejich následnou špatnou úpravu. Nejvíce hlášené zdroje salmonelózy jsou z kuřecího maso, vepřového maso, mléčných výrobků, vajec, a vlivem kontaminované půdy i z ovoce a zeleniny (Pui et al. 2011).

***Klebsiella* spp.**

Klebsiella spp. jsou gramnegativní bakterie, které se běžně vyskytují ve zdravém lidském těle, ale mohou způsobovat i řadu infekcí měkkých tkání, močových cest, krevního řečiště způsobovat zápal plic. Celý rod zahrnuje rozmanité zastoupení patogenů s nejznámějším zástupcem *Klebsiella pneumoniae*, způsobující zmíněné potíže. V posledních letech se *Klebsiella* spp. staly celosvětovou hrozbou, jelikož se mohou uplatňovat i při sepsi, především jako nozokomiální nákaza, tedy nákaza šířící se v nemocnicích (Dong et al. 2022).

***Shigella* spp.**

Bakterie *Shigella* spp. jsou gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky, jejichž přirozeným prostředím je střevo hostitele, a to buď opic, nebo lidí. Navíc jsou životaschopné v potravinách, vodě a nápojích, z kterých se na člověka mohou přenášet. Hlavní patogenní vlastností *Shigella* spp. je buněčná invaze probíhající v tlustém střevě, způsobující nemoc známou pod názvem úplavice, jejíž příznaky jsou horečka, střevní křeče a vylučování krvavé až hlenové stolice vedoucí k dehydrataci. Tyto těžké infekce způsobují druhy *Shigella dysenteriae* a *Shigella flexeneri* (Ballesté et al. 2022).

***Yersinia* spp.**

Bakterie rodu *Yersinia* jsou gramnegativní, fakultativně anaerobní tyčinky. Nejlépe charakterizované jsou tři, pro člověka patogenní, druhy. První dvě *Yersinia enterocolitica* a *Yersinia pseudotuberculosis* jsou zoonotické patogeny, které způsobují gastroenteritidu a třetí *Yersinia pestis* je původce moru, tedy patogen hlodavců a blech, které se mohou přenášet na člověka (McNally et al. 2016). Všechny zmíněné bakterie mohou být přenášeny konzumací kontaminovaných potravin. *Yersinie* spp. přežívají v relativně širokém rozmezí teplot s optimem 28–30 °C, ale UV záření, nebo intenzivní vysoušení je zabíjí (Ditchburn & Hodgkins 2019).

3.5 Jedlý hmyz jako potravina a jeho zpracování

S rostoucí populací je stále častěji diskutován problém potravinové bezpečnosti. Pro rok 2050 se předpokládá až o 50 % větší poptávka po potravinách a zvýšení potřeby využití půdy o 593 milionů hektarů. Jelikož v současné době na celém světě hladoví okolo 1 miliardy lidí, je potřeba zajistit udržitelnější způsob přísunu potravin, a především přísunu bílkovin

(Searchinger et al. 2014). Zkoumáním a vývojem udržitelnějších zdrojů bílkovin by se mohl zmírnit zvyšující se tlak na náročnou produkci hospodářských zvířat, a právě proto se jeví jako nejvhodnější alternativou jedlý hmyz, který má nižší dopad na životní prostředí a tím představuje ekonomickou i ekologickou příležitost na trhu. Ve srovnání s jinými domestikovanými zvířaty nevyžaduje hmyz velké množství půdy díky krátkému životnímu cyklu, potřebuje podstatně méně vody a energie, a navíc produkuje nižší emise skleníkových plynů a amoniaku (Liceaga 2022). Srovnání náročnosti chovu dobytka a sarančete stěhovavé na 1 kg bílkovin je zobrazen na Obrázku č. 2.

Obrázek č. 2: Porovnání odhadovaných zdrojů k produkci 1 kg bílkovin z krávy domácí a saranče stěhovavé



Upraveno podle Liceaga (2022)

V současném potravinářském průmyslu je hlavním účelem při zpracování a přípravě potravin především poskytnout spotřebitelům bezpečný, výživný a zdravý produkt. Odpovědnost za dosažení tohoto výsledku záleží na každém kroku výrobního řetězce, od produkce přes skladování, distribuci, prodej a spotřebu. Producenti jedlého hmyzu, a všech souvisejících výrobků, mají v každé výrobní fázi povinnost eliminovat mikrobiální a jiné zdraví ohrožující kontaminace (Marshall et al. 2016). Je potřeba rozlišit, zda k přenosu mikroorganismů dochází mechanicky kontaktem s povrchem těla, nebo zda jsou mikroorganismy schopny přetrvávat a množit se uvnitř hmyzu (Schlüter et al. 2017). Jenom všemi těmito podmínkami a správným dodržováním zpracovatelských postupů se docílí správné kvality výsledného produktu (Frigerio et al. 2020).

3.5.1 Technologie zpracování

V dnešní době je hmyz dostupný ve 3 formách: jako celý hmyz, ve zpracované formě, nebo ve formě extraktů (Liceaga et al. 2022). Přestože počet existujících procesů v potravinářském průmyslu je obrovský a liší se v závislosti na použitém druhu a konečném produktu, většinu z nich lze seskupit do základních zpracovatelských operací se stejnými principy, které jsou popsány níže (Melgar-Lalanne et al. 2019).

Blanšírování

Blanšírování je proces, při kterém je hmyz vložen na krátkou dobu do vroucí vody, vyjmut a poté ponořen do ledové vody, nebo umístěn pod proud studené tekoucí vody, aby došlo k šokovému zastavení tepelného procesu (Melgar-Lalanne et al. 2019). Používá se jako předpříprava pro většinu komerčně využívaného jedlého hmyzu hlavně za účelem snížení degradačních enzymů a snížení počtu mikrobů zodpovědných za kažení potravin. Blanšírování výrazně snižuje celkový počet mezofilních i některých psychrotrofních bakterií, kvasinek a plísní, ale je neúčinné při eliminaci bakteriálních spor (Vandeweyer et al. 2017). Po blanšírování dochází i k mírnému navýšení vlhkosti, způsobené absorpcí vody pod chitinózním exoskeletem. S nárůstem vlhkosti ale zůstává konstantní aktivita vody a nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v nutričním složení. Možné změny však mohou nastat ze sensorického hlediska, a to změnou barvy, konkrétně tmavnutí, které je způsobeno rozpouštěním některých živin způsobující sekundární reakce jako je neenzymatické hnědnutí (Azzollini et al. 2016).

Sušení

Jelikož mikrobiální růst při kažení potravin závisí přímo na aktivitě vody, je sušení nejpoužívanější technologií pro prodloužení jejich trvanlivosti. Techniky sušení sahají od tradičních metod sušení na slunci, pražení či smažení až po moderní metody lyofilizace nebo sušení pomocí mikrovln. Princip sušení je založen na snížení celkového obsahu vody a její dostupnosti pro degradační reakce včetně enzymatických reakcí a reakcí iniciovaných znehodnocujícími mikroorganismy. Mikrobiální růst závisí přímo na aktivitě vody (a_w) a naprostá většina mikroorganismů přestává růst při $a_w < 0,65$ (Grabowski & Klein 2017). Snížení volné vody významně zvyšuje koncentraci sušiny bez poškození struktur nebo fyzického vzhledu potravin a je důležitým krokem pro následnou extrakci potravinových složek (Melgar-Lalanne et al. 2019).

Nejstarší technologií je sušení na slunci, které se využívá jen pro domácí potřeby, jelikož zde může docházet ke zhoršené hygienické kvalitě procesu i konečného produktu vlivem kontaminace z prostředí. Posouzení dokončení sušení je pouze na základě vzhledu a obsah vody se neurčuje, zůstává zde tedy riziko přetrvání nežádoucích mikroorganismů (Caparros Megido et al. 2018). Pro laboratorní analýzu je nejrozšířenější metoda lyofilizace, tedy sušení mrazem. Vzhledem k použití šokově nízké teploty a výsledné sublimaci vody se

mikrobiologická a oxidační degradace hmyzu do značné míry zastaví. Tím se získá vysoce kvalitní produkt s vynikající nutriční hodnotou a dlouhou skladovatelností, který je ideální pro výzkum. Nevýhodou lyofilizace je ale její ekonomická náročnost, a proto může být v širším měřítku nahrazována například sušením teplem v troubě, které je z finančního hlediska mnohonásobně výhodnější (Melgar-Lalanne et al. 2019). Velmi účinným způsobem ošetření je i mikrovlnné sušení, při kterém lze teoreticky snížit aktivitu vody po 15 minutách až na hodnotu $a_w < 0,30$. To bylo testováno na larvách potměníka moučného, kde byly získány výsledné produkty s $a_w < 0,6$. Je však třeba metodu mikrovlnného sušení lépe prozkoumat zejména kvůli sensorické kvalitě (Melgar-Lalanne et al. 2019). Vandeweyer a kolektiv (2017) ve své studii použití mikrovlnného sušení uvádějí největší problém v nežádoucím tmavnutí.

Extrakce

Pomocí extrakce můžeme z hmyzu získat jednotlivé složky sloužící jako přídavky do pokrmů nebo produktů na bázi hmyzu (Sun-Waterhouse et al. 2016). Ve většině případů jsou z hmyzu extrahovány bílkoviny, ale můžeme se setkat i s extrakcí tuků, chitinu a minerálních látek. Doposud byly extrakční procesy pro jednotlivé složky příliš nákladné, ale v současné době se již pracuje na vývoji nákladově efektivnějších a praktičtějších metod komerčního použití (Govorushko 2019). Využití extrakce je preferovaná metoda v zemích, kde konzumace jedlého hmyzu nemá dlouhodobou tradici, tedy v severní Americe a Evropě. To vyplývá zejména z toho, že ačkoli se zvyšuje povědomí o výborné nutriční hodnotě hmyzu, jsou lidé stále skeptičtí k jejich konzumaci, především v celém stavu (Mlček et al. 2014).

K získání čistého proteinu lze obecně koncentráty a izoláty bílkovin zpracovat různými metodami a technologickými postupy v závislosti na surovině a jejím přibližném složení. Pro všechna zpracování existuje univerzální 5krokový postup, který zahrnuje předběžnou úpravu, odtučnění, solubilizaci a regeneraci bílkovin, čištění bílkovin a jejich sušení. Předběžná úprava u hmyzu obnáší proces lyofilizace či pečení a následného mletí a prosévání (Gravel & Doyen 2020). Protože hmyz obsahuje velké množství tuků, je odtučnění klíčovým krokem, jelikož přímo ovlivňuje výtěžnost a čistotu bílkovin v konečném produktu. Prozatím se vyvíjí ideální metody pro výrobu ve větším měřítku, ale pro laboratorní podmínky extrakce tuků dobře funguje odtučnění organickým rozpouštědlem (hexanem) za pomoci Soxhletova aparátu (Bußler et al. 2016). Z takto odtučněné hmyzí moučky se následně izolují bílkoviny pomocí regulace pH a iontové síly. Ta vzniká pomocí izoelektrického bodu, kdy se při extrémních hodnotách pH povrch bílkovin nabíjí a podporuje tak elektrostatické odpuzování mezi bílkovinami a vodou. Po dokončení solubilizace se bílkovinný roztok odstředí nebo dekantuje. Vzniklý supernatant obsahující bílkoviny se izoluje, zatímco zbylá peleta obsahující nerozpustné polysacharidy a další minoritní složky se vyhodí (Boye et al. 2010). Poté následuje čištění bílkovin, například pomocí chromatografie, a finální sušení různými dostupnými metodami (Gravel & Doyen 2020).

3.5.2 Produkty z jedlého hmyzu

Každý zmíněný krok zpracování jedlého hmyzu může ovlivnit sensorické vlastnosti a ovlivnit postoj spotřebitelů pozitivní i negativní cestou. Je třeba vzít v úvahu, že právě sensorické vlastnosti jsou zásadním faktorem pro zlepšení spotřebitelského přijetí potravin vyráběných z hmyzu. Při výrobě nových hmyzích produktů je tak důležité pochopení komplexní chuti jednotlivých druhů a jejich správného využití, aby byly spotřebiteli dobře přijaty (Perez-Santaescolastica et al. 2022).

Nejběžněji je jedlý hmyz používán do pekárenských a pekařských výrobků, a to zejména z nutričního hlediska ke zvýšení obsahu bílkovin a vlákniny, či jako obohacující složku s odlišnými sensorickými vlastnostmi (Mancini et al. 2022). S postupnou inovací potravin získávají v pekárenském odvětví pozornost hmyzí mouky, s různými možnostmi začlenění do lidské stravy. Přidávky hmyzích mouk tak v současné době můžeme najít u běžného, jemného i trvanlivého pečiva, extrudovaných snacků i sušenek a tyčinek. Speciálně u běžného pečiva způsobuje hmyzí mouka zřetelný zápach a ovlivňuje jeho texturu a soudružnost, což negativně ovlivňuje postoj konzumentů k přijatelnosti těchto výrobků. Oproti tomu mohou hmyzí mouky nabídnout částečnou náhradu pšeničné mouky, jelikož neobsahují lepek (Borges et al. 2022), avšak jak uvádí Kowalski a kolektiv (2022), její náhrada by měla být maximálně do 10 % z důvodů již zmíněných negativních technologických a sensorických změn.

Současně také přibývá studií o využití hmyzu v masných výrobcích k náhradě masa a bílkovin, k fortifikaci masných výrobků a k výrobě analogů masa, a to zejména díky funkčním vlastnostem bílkovin schopných emulgačních účinků, tvorby gelu a schopnosti retence vody a oleje (Turck et al. 2021). Ukázalo se, že zahrnutí zpracovaných larev (do 10 % obsahu ve výrobku) vede k vyšší stabilitě masových emulzí a snížení ztrát vařením, což je pro masný průmysl velmi výhodné. Naopak zůstává problémem nevhodná textura výsledného produktu, může se jednat například o menší pevnost a obtížnější žvýkavost párků (Borges et al. 2022).

4 Metodika

4.1 Příprava vzorků

Pro praktickou část diplomové práce bylo analyzováno 7 druhů výrobků obsahující buď cvrččí mouku, cvrččí proteinový prášek, nebo se jednalo o celé pražené cvrčky domácí. V Tabulce č. 4 jsou výrobky detailněji popsány. Všechny výrobky byly typu „dummy“, tedy určené pro testování výrobní kvality, nikoli pro přímé uvádění na trh.

Tabulka č. 4: Seznam analyzovaných výrobků včetně jejich popisu

Název výrobku	Vzorek č.	Příchuť	Obsah cvrččí mouky
Cvrččí proteinový prášek na vaření a pečení	1, 2, 3	Bez příchutě	
Proteinový shake	4	Čokoláda	10 %
	5		
Hrachové chipsy s cvrččím proteinem	6	Pálivá paprika	10 %
Proteinová tyčinka typ 1	7	Ananas a kokos	10 %
	8	Čokoláda a pomeranč	
Proteinová tyčinka typ 2	9	Arašídové máslo a skořice	20 %
	10	Kakao a sezam	
Celí pražení cvrčci	11	Slaný karamel	
	12	BBQ a paprika	
	13	Chilli a limetka	
	14	Rajčata a oregano	
Proteinové krekry	15, 16	Oregano a tymián	8 %
	17	Černé olivy	
	18, 19	Rajčata a bazalka	
Těstoviny s cvrččím proteinem	20	Červená čočka	20 %

Pro všechny zmíněné výrobky byli použiti dospělci cvrčka domácího ze soukromé farmy, kde jsou cvrčci chováni v optimálních podmínkách a krmeni různými druhy obilovin a ovocem. Výrobce rovněž deklaruje třístupňové ošetření pomocí UV paprsků a filtrované vody s následným převařením a sušením. Podrobnější hygienická opatření, včetně časů a teplot, jednotlivých ošetření nejsou v rámci zachování výrobního tajemství zveřejněna.

Při naší analýze byl každý vzorek výrobku homogenizován v třecí misce a ± 1 gram z každého vzorku byl převeden do zkumavek s 9 ml ředícího média (jehož složení je uvedeno v Tabulce č. 5). Následovalo vytvoření decimální ředící řady až do hodnoty 10^{-6} , kde byl z každého ředění

po dostatečné homogenizaci odebrán vzorek podle množství inokula buď 1 ml pro metodu přelití, nebo pro metodu roztěrem, kde se 1 ml vzorku rozdělí do tří 9 mm Petriho misek. Všechna stanovení mikroorganismů proběhla standartními postupy dle platných norem, popsanych v podkapitole o kultivaci.

Tabulka č. 5: Složení ředícího média

Složka	Množství g/l
Trypton	5
Nutrient broth no. 2	5
Kvasničný extrakt	2,5
Tween 80	0,5
L-cystein	0,25

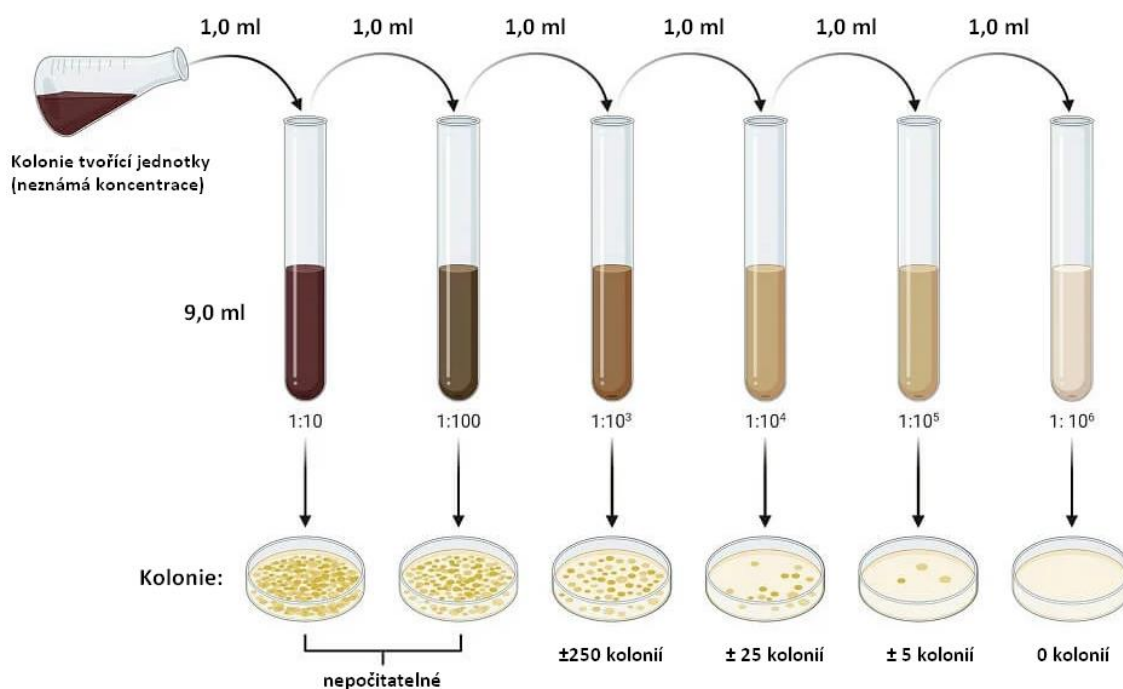
4.2 Kultivace

Pro udržení či pomnožení mikroorganismů při vhodných podmínkách byla využita kultivace, která proběhla dvěma metodami. První metoda je metoda kvantitativní, kde se snažíme o co nejpřesnější stanovení počtu životaschopných buněk, druhá metoda je kvalitativní, kde nejde o množství, ale o průkaz přítomnosti či absence mikroorganismu (Bursíková et al. 2014). Schéma přípravy ředící řady je zobrazeno na Obrázku č. 3 a příprava medií ke kultivaci na Obrázku č. 4.

Kultivace a volba množství inokula v této práci proběhly dvěma způsoby:

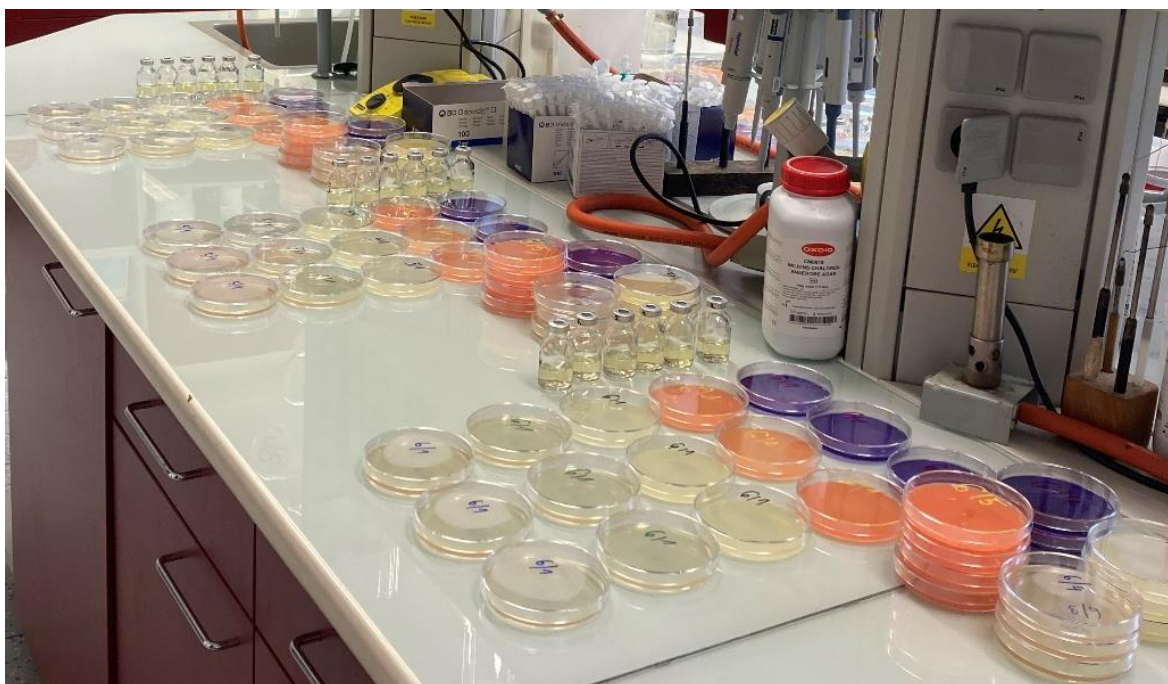
- 1) roztěrem 1 ml na předem připraveném tuhém médiu pomocí sterilní mikrobiologické hokejky do 3 Petriho misek o průměru 90 mm
- 2) přelitím 1 ml do Petriho misky o rozměru 60 mm a zalitím tekutým médiem

Obrázek č. 3: Schéma ředící řady do hodnoty 10^{-6}



Upraveno podle Sapkota (2022)

Obrázek č. 4: Připravená pěstební a ředící média ke kultivaci



Autorka (2022)

4.2.1 Kultivační média a metody kultivace jednotlivých mikroorganismů

Klíčovým faktorem pro úspěšnou kultivaci je vhodně zvolené a pečlivě připravené kultivační médium. Pro celkové hodnocení mikroorganismů se hodí komplexní média ze složek jako jsou

trypton a pepton z rostlinných nebo živočišných tkání, pro konkrétní skupiny mikroorganismů jsou používána selektivní média. Všechna použitá média pro zkoumané mikroorganismy jsou shrnuta v Tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Podmínky kultivace pro jednotlivé mikroorganismy

Mikroorganismy	Kultivační média	Teplota	Čas	Norma
Celkové počty aerobních mikroorganismů	Standart plate count agar (Oxoid, AT)	30 °C	72 h	ČSN EN ISO 4833-1
Celkové počty aerobních sporulujících bakterií	Trypton-sójový agar (TSA), (Carl Roth, DE)	30 °C	24 h	ČSN EN ISO 4833-1
<i>Escherichia coli</i>	Trypton Bile X-Clucoronide agar (TBX agar), (Oxoid, AT)	37 °C	24 h	ČSN ISO 16649-2
<i>Bacillus cereus</i>	Bacillus cereus agar base (Oxoid, AT)	30 °C	24 h	ČSN EN ISO 7932
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet red bile glucose agar (AppliChem, DE)	37 °C	24 h	ČSN EN ISO 21528-2
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird-Parker agar (Oxoid, AT)	37 °C	24–48 h	ČSN EN ISO 6888-1
<i>Salmonella spp.</i>	Rappaport-Vassiliadis bujón (Carl Roth DE), Salmonella Shigella agar (Carl Roth, DE)	37 °C	24–48 h	ČSN EN ISO 6579-1
<i>Clostridium spp.</i>	Cooked Meat Medium (Oxoid), Wilkins Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid)	37 °C	48 h	ČSN EN ISO 7937

Celkové počty mezofilních aerobních mikroorganismů

Celkové počty aerobních mikroorganismů se stanovují za použití normy ČSN EN ISO 4833-1 technikou přelití, kde je využit v tomto případě Standard plate count agar. Ten lze získat smícháním destilované vody s 5 g/l tryptonu, 2,5 g/l kvasničného extraktu, 1 g/l glukózy a 9 g/l agaru. Směs se za častého míchání prohřeje až do úplného rozpuštění všech složek a dá se sterilizovat do autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Před použitím je třeba agar nechat vytemperovat na 45 °C.

Příprava vzorků proběhla naočkováním 1 ml z příslušné ředící řady do prázdné sterilní Petriho misky a zalita připraveným Standard plate count agarem. Poté se vzorky nechaly kultivovat za aerobních podmínek při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin.

Celkové počty aerobních sporulujících mikroorganismů

Pro kultivaci aerobních sporulujících mikroorganismů je rovněž používána technika přelití podle normy ČSN EN ISO 4833-1. Využíván je univerzální trypton-sójový agar (TSA). Jeho příprava probíhala smícháním destilované vody s předpřipravenou směsí TSA, která obsahuje 15 g/l kaseinu natráveného tryptikázou, 5 g/l sójového peptonu, 5 g/l chloridu sodného a 15 g/l agaru. Po důkladném promíchání se směs vložila do autoklávu na teplotu 121 °C po dobu 15 minut.

Zhomogenizované vzorky byly pasterovány po dobu 10 minut při teplotě 85 °C, čímž došlo k inaktivaci mezofilních a snížila se pravděpodobnost přežití termorezistentních nesporulujících bakterií. Z každého ředění bylo převedeno 0,5 ml do sterilní Petriho misky a zalito trypton-sójovým agarem. Kultivace proběhla za aerobních podmínek po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C.

Escherichia coli

Pro důkaz přítomnosti *Escherichia coli* byl jako živné médium použit podle normy ČSN ISO 16649-2 Tryptone Bile X-Glucuronide agar (znám také jako TBX agar), který jsme získali smícháním 20 g/l tryptonu, 1,5 g/l žlučové soli č.3, 0,075 g/l glukuronidu a 15 g/l agaru. Směs byla poté sterilizována v autoklávu 15 minut při teplotě 121 °C. Glukuronid je stěžejní složkou TBX agaru právě proto, že ho *E. coli* jsou schopny rozštěpit syntetizujícím enzymem β -D-glukoronidázou. Jelikož se jedná o dost specifickou reakci, není (na rozdíl od jiných koliformních bakterií) nutné provádět konformační testy.

Nejprve byly připraveny 3 plotny s TBX agarem, na které byl rozdělen 1 ml z příslušného ředění ředící řady a následně byl vzorek asepticky rozestřen očkovací mikrobiologickou hokejkou. Kultivace probíhala za aerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Narostlé kolonie byly hodnoceny podle počtu modrých kolonií, případně podle bílých kolonií s modrým středem.

Bacillus cereus

Bakterie *Bacillus cereus* jsou identifikovány pomocí normy ČSN EN ISO 7932 s využitím Bacillus cereus agar base, jenž je složen z 10 g/l mannitolu, 10 g/l pyruvátu sodného, 2,5 g/l fosforečnanu sodného, 2 g/l chloridu sodného, 1 g/l enzymaticky rozloženého kaseinu, 0,25 g/l fosforečnanu draselného, 0,12 g/l bromthymolové modři, 0,1 g/l síranu hořečnatého a 15 g/l agaru. Vzniklá zamíchaná směs doplněná destilovanou vodou se vloží do autoklávu na teplotu 121 °C. Po 15 minutách je směs ochlazená na 45 °C a obohacena o polymixin a žloutkovou emulzi. Vzniklý agar se ještě jednou pořádně promíchá a nalije se do Petriho misek.

Na Bacillus cereus base agarové plotny byl naočkován 1 ml z prvního ředění, z dalších ředění 0,1 ml vzorku a vše bylo rozetřeno mikrobiologickou hokejkou. Vzorky se dále nechaly kultivovat při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Jelikož bakterie *Bacillus cereus* narůstají ve velkých koloniích obklopených β -hemolýzovou zónou (Muigg et al. 2022), byly použity konformační testy metodou průkazu hemolýzy na agaru s ovčí krví.

Clostridium spp.

Pro kultivaci Clostridium spp. se podle normy ČSN EN ISO 7937 využívají dvě kultivační média. První je Cooked Meat Media, jehož složení je 454 g/l srdeční svaloviny, 10 g/l peptonu, 10 g/l prášku "Lab-Lemco", 5 g/l chloridu sodného a 2 g/l glukózy. Druhé médium je Wilkins Chalgren Anaerobe Agar obsahující 10 g/l tryptonu, 10 g/l želatinového peptonu, 5 g/l výtažku z kvasnic, 1 g/l glukózy, 5 g/l NaCl, 1 g/l L-argininu, 1 g/l pyruvátu sodného, 0,0005 g/l menadionu, 0,005 g/l haeminu a 10 g/l agaru.

Do Cooked Meat Media (Oxoid) bylo naváženo 0,1 g vzorku a následně se vzorek nechal inkubovat 48 hodin při 37 °C. Po 14 dnech stání při pokojové teplotě, za účelem vytvoření endospor, se vzorek pasteroval 10 minut při teplotě 85 °C. Pasterované vzorky byly přelity na Petriho misky s Wilkins Chalgren Anaerobe Agar (Oxoid) a opět kultivovány za stejných podmínek v anaerobní atmosféře. Narostlé kolonie byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS.

Enterobacteriaceae

Pro průkaz bakterií *Enterobacteriaceae* se používá ČSN EN ISO 21528-2 norma s využitím Violet red bile glucose agaru, který se skládá z 10 g/l glukózy, 7 g/l peptonu, 5 g/l chloridu sodného, 3 g/l kvasničného extraktu, 1,5 g/l žlučové soli č. 3, 0,03 g/l neutral red, 0,002 g/l crystal violet a 12 g/l agaru. Po přidavku destilované vody se směs za stálého míchání zahřeje do té doby, než se všechny složky rozpustí. Sterilizace není u tohoto agaru doporučena.

Z prvního ředění byl převeden 1 ml na 3 připravené plotny s Violet red bile glucose agarem. Pro další ředění bylo napipetováno už jen 0,1 ml a rozetřeno mikrobiologickou hokejkou.

Zatuhlé Petriho misky byly obráceny vzhůru nohama a následovala kultivace za aerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Koagulázapozitivní stafylokoky a *Staphylococcus aureus*

Důkaz přítomnosti *Staphylococcus* spp. se provádí podle normy ČSN EN ISO 6888-1 na Baird-Parker agaru, který se skládá z 10/l g tryptonu, 5 g/l masového extraktu, 1 g/l kvasničného extraktu, 5 g/l chloridu lithného, 12 g/l glycinu, 10 g/l pyruvátu sodného a 20 g/l agaru. Všechny složky se smíchaly s 1000 ml destilované vody a směs se nechala sterilovat v autoklávu po dobu 15 minut na 121 °C. Poté bylo třeba směs ochladit na 47 °C, asepticky přidat 50 ml emulze vaječného žloutku s telurickým křemíkem a rozlít na předem připravené a označené plotny.

Na každou plotnu byl napipetován 1 ml vzorku z ředící řady, rozetřen sterilní mikrobiologickou hokejkou a nechal se vsáknout přibližně 15 minut. Důležité bylo plotny otočit vzhůru nohama a nechat aerobně kultivovat při teplotě 37 °C po dobu 24-48 hodin. Pro stanovení počtu byly vybrány buď kolonie s typickým vzhledem, tedy kolonie s mléčným okrajem a černým nebo šedým terčem, nebo atypickým vzhledem, tedy kolonie šedé a černé lesklé bez mléčného okraje. Z počtu suspektních kolonií vyrostlých na zmíněných miskách se vypočetl počet koagulázapozitivních stafylokoků a byl proveden test koagulázové aktivity pomocí Staphylase test kitu (Oxoid), zobrazeným na Obrázku č. 5. Ten funguje na principu detekce přítomnosti srážecího faktoru prostřednictvím srážení fibrinogenem senzibilovaných ovčích červených krvinek. Specifičnost reakce je zajištěna simultánním testem s kontrolním činidlem (nesenzibilní ovčí červené krvinky), kde by ke srážení nemělo dojít [Online 3].

***Salmonella* spp**

Stanovení přítomnosti *Salmonella* spp. bylo provedeno podle normy ČSN EN ISO 6579-1, ke které jsou potřeba tyto média:

- Peptonová voda, tvořená 10 g/l pankreaticky štěpeným kaseinem, 5 g/l chloridem sodným, 9 g/l hydrogenfosforečnanem sodným a 1,5 g/l fosforečnanem draselným.
- Rappaport-Vassiliadis bujón s obsahem 13,58 g/l bezvodého chloridu hořečnatého, 8 g/l chloridu sodného, 4,5 g/l peptonu ze sóji, 0,6 g fosforečnanu draselného, 0,4 g/l hydrogenfosforečnanu draselného a 0,036 g/l malachitové zeleně.
- Salmonella Shigella agar (SS agar) s obsahem 5 g/l masového extraktu, 5 g/l peptonové směsi, 10 g/l laktózy, 8,5 g/l žlučových solí, 10 g/l citrátu sodného, 8,5 g/l thiosíranu sodného, 1 g/l citrátu železitého, 0,00033 g/l brilantně zeleně, 0,025 g/l neutrální červeně a 15 g/l agaru.

Ze vzorku byl odebrán vždy 1 g do zkumavek obsahující peptonovou vodu a celá směs byla kultivována při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Následoval odběr 0,1 ml vzorku a převedení do zkumavek obsahující Rappaport-Vassiliadis bujón, obsah byl promíchán a zkumavky byly opět kultivovány při teplotě 37 °C, tentokrát po dobu 48 hodin. Pro potvrzení narostlých

bakterií bylo třeba vzniklou suspenzi rozetřít na předem připravené plotny s SS agarem a nechat je kultivovat při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin.

Na SS agaru vytvořily bakterie rodu *Salmonella* světlé kolonie s tmavým středem, které byly dále použity pro konformační test. Identifikace *Salmonella* spp. byla provedena pomocí latexového aglutinačního testu in vitro Salmonella Test Kit (Oxoid) na Obrázku č. 5. Nejprve bylo na papírek natřeno kontrolní činidlo, poté byly na jednu část rozetřeny odebrané kolonie společně s kontrolním činidlem.

Obrázek č. 5: Staphylase Test Kit a Salmonella Test Kit (Oxoid)

Staphylase Test Kit



Salmonella Test Kit



[Online 4], [Online 5]

Počet kvasinek a plísní

Stanovení kvasinek a plísní se provádí podle normy ČSN ISO 21527 na dichloran glycerolovém agaru (znám pod zkratkou DG18), jež se skládá z 10 g/l glukózy, 5 g/l peptonu, 1 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, 0,5 g/l síranu hořečnatého, 0,002 g/l dichloranu a 15 g/l agaru.

Metoda proběhla naočkováním 0,1 ml z příslušného ředění na 3 agarové plotny a poté byl vzorek rozetřen sterilní mikrobiologickou hokejkou. Kultivace probíhala za aerobních podmínek při teplotě 25 °C po dobu 7 dní.

4.3 Identifikace pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací v kombinaci s detektorem doby letu: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry) je velmi přesná a rychlá metoda aplikovatelná pro široké spektrum mikroorganismů, které je schopna rozlišit na rodové, druhové a často i kmenové úrovni. Tato přesná stanovení mohou sloužit jako monitoring patogenních mikroorganismů v životním prostředí či při zpracování potravin (Huong et al. 2014). Pro naši identifikaci narostlých mikroorganismů byl konkrétně použit přístroj

MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonik, Německo) s využitím MALDI Biotyper MSP Identification Standard Method 1.1 a knihovny Bruker Taxonomy.

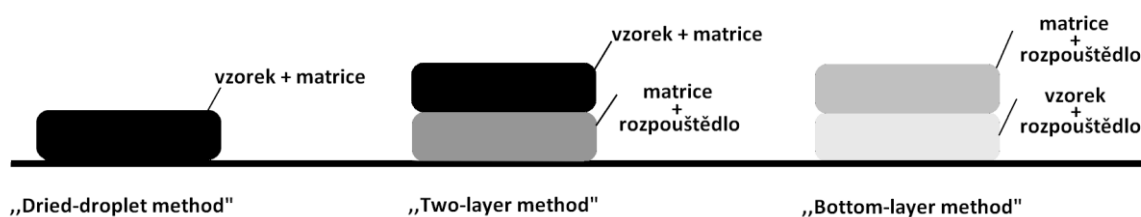
MALDI-TOF MS je spektrofotometrická šetrná ionizační technika, která umožňuje analýzu peptidů a bílkovin, nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních anorganických i organických látek, jak z celých kultivovaných bakterií, tak ze surových bakteriálních extraktů. Jako každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří funkčních jednotek: zdroj pro ionizaci a přenos iontů analytu do plynné fáze, hmotnostní analyzátor pro separaci iontů podle jejich poměru hmotnosti k náboji a detekční zařízení pro monitorování iontů. V praxi je pro použití MALDI-TOF vyžadována jenom minimální příprava (Biswas & Rolain 2013). Nejrychlejším postupem přípravy je přímé nanášení nakultivovaných bakterií na MALDI destičku z nerezové oceli. Důležitým faktorem pro správnost stanovení je vhodné zvolení koncentrací matrice a organických rozpouštědel. Účel matrice je ochrana analytu před přímou ionizací laserem, nejběžněji se jedná o roztoky ve směsích obsahující acetonitril, kyselinu trifluoroctovou, kyselinu mravenčí, aceton, či vodu (Kačalová 2011).

Pro nanášení vzorků na MALDI destičku existují tři metody, jejichž schéma je zobrazeno na Obrázku č. 6:

- „Dried-droplet“ metoda, kde se nanese směs vzorku společně s matricí, umožňující detekci vysokomolekulárních látek.
- „Two-layer“ metoda, kde se nejdřív nanese směs kapky matrice s rozpouštědlem a po jejím zaschnutí se navrství směs vzorku s matricí.
- „Bottom-layer“ metoda, kde je nejprve nanesen rozpuštěný vzorek a po zaschnutí je nanášena rozpuštěná matrice ve stejném objemu (Kačalová 2011).

Pro identifikaci vzorků v této práci byla použita metoda „Bottom layer“.

Obrázek č. 6: Metody nanášení vzorků na MALDI destičku

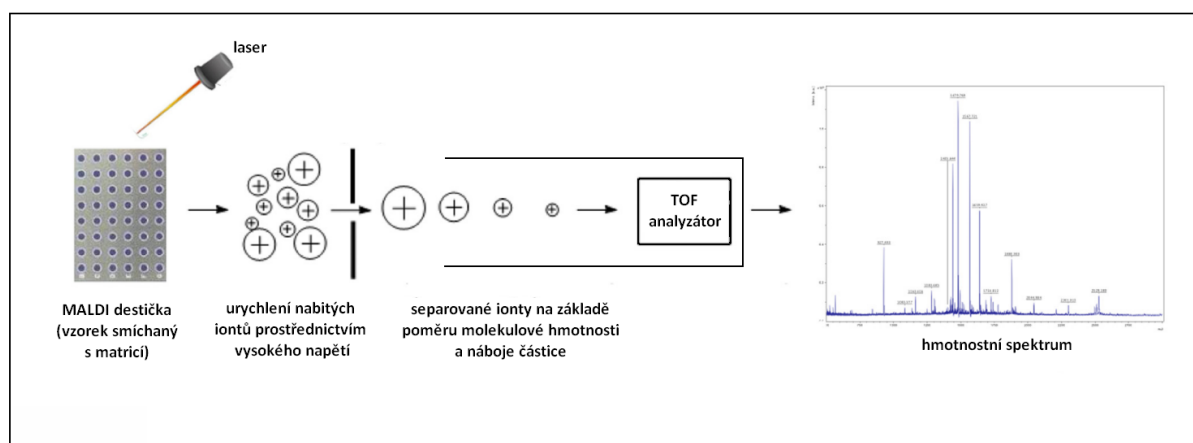


Upraveno podle Williams et al. (2003)

Analyzovaný vzorek se umístí na jednotlivé spoty na destičku z nerezové oceli a překryje se matricí, která po několika minutách vysušení způsobí na destičce rychlou ko-krytalizaci v prostorovém poli (Biswas & Rolain 2013). Po vložení do přístroje je aplikováno laserové záření na krystaly matrice, která absorbuje energii, při jejímž vypařování bere společně i molekuly vzorku a zároveň dochází k ionizaci molekul předáním H^+ od molekul matrice. Mezi destičku a vstupní štěrbinu analyzátoru TOF je aplikováno extrakční napětí, kde dojde

k rozdělení nabitých molekul ve vakuu podle jejich molekulové hmotnosti v elektromagnetickém poli, díky čemuž může docházet k výsledné detekci doby letu iontů. Ty jsou elektronicky měřeny ve spektrálních kanálech a výpočetně se převádějí na výsledné zobrazení v hmotnostních spektrech, která jsou specifická pro každý testovaný mikroorganismus (Singhal et al. 2015). Na základě shody s databází Bruker taxonomy pomocí software MALDI BioTyper RTC (Real Time Classification) je určena identita daného mikroorganismu podle tříd spolehlivosti, uvedených v Tabulce č. 7. Na Obrázku č. 7 je zjednodušené schéma fungování MALDI-TOF MS po nanesení vzorků na MALDI destičku.

Obrázek č. 7: Schéma MALDI-TOF



Upraveno podle Singhal et al. (2015)

Tabulka č. 7: Třídy spolehlivosti v databázi MALDI Biotyper

Rozsah	Charakteristika
0,000 – 1,699	nespolehlivá identifikace
1,700 – 1,999	pravděpodobná identifikace rodu
2,000 – 2,299	bezpečná identifikace rodu, identifikace pravděpodobného druhu
2,300 – 3,000	vysoce pravděpodobné druhové určení

4.4 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení proběhlo pomocí programu Statgraphics Centurion od Statgraphic Technologies Inc. za použití jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) s hladinou významnosti $p = 0,05$, kde byly zjišťovány statisticky významné rozdíly mezi vzorky. Následné porovnávání rozdílů (post-hoc test) proběhlo Schéffého metodou.

5 Výsledky

5.1 Kultivace vzorků

Výsledky počtů kolonií mikroorganismů ze vzorků byly zaznamenány po uplynutí stanovené doby (podle výše zmíněné metodiky). Získané hodnoty jsou uvedeny v Tabulce č. 8 v jednotkách log KTJ/g. Jednotlivé výsledky všech vyskytujících se bakterií ve všech vzorcích jsou uvedeny v samostatných přílohách v Tabulce č. 11.

Tabulka č. 8: Stanovené počty mikroorganismů po skončení kultivace, uvedeno v log KTJ/g. Hodnoty jsou zprůměrované podle počtu opakování a druhu výrobku ± směrodatná odchylka.

	Prášek na pečení	Pražení cvrčci	Krekry	Tyčinky	Proteinový shake	Hrachové chipsy	Těstoviny
Mezofilní aerobní mikroorganismy	5,50 ± 0,56 ^{ab}	7,45 ± 0,43 ^c	7,35 ± 0,60 ^{bc}	5,02 ± 0,69 ^a	6,38	5,88	≤ 1,00
Aerobní sporulující mikroorganismy	2,05 ± 1,58 ^{ab}	3,94 ± 0,34 ^b	1,30 ± 1,58 ^{ab}	≤ 1,00 ^a	≤ 1,00	2,79	3,30
<i>Escherichia coli</i>	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00
<i>Bacillus cereus</i>	1,36 ± 1,57	2,03 ± 2,03	0,20 ± 0,40	≤ 1,00	2,30	≤ 1,00	1,70
<i>Enterobacteriaceae</i>	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00
Koaguláza pozitivní stafylokoky	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00	≤ 1,00
<i>Salmonella spp.</i>	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
Kvasinky a plísňe	≤ 1,00	0,62 ± 1,07	2,50 ± 1,29	0,62 ± 1,07	3,69	≤ 1,00	2,00

Horní indexy (^a, ^b, ^c) značí statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($p < 0,05$); neg. = negativní

Celkové počty mezofilních aerobních mikroorganismů

Celkové počty mezofilních aerobních mikroorganismů v našem případě vykazují nejvíce výrobky celé pražení cvrčci s průměrným obsahem 7,45 ± 0,43 log KTJ/g. Největší obsah byl zaznamenán u příchutě "Rajčata & Oregano" s obsahem 7,94 log KTJ/g výrobku. V těstovinách s cvrččím proteinem, jako v jediném vzorku, nebyly žádné mezofilní aerobní mikroorganismy zaznamenány. Druhý nejmenší počet mezofilních aerobů se vyskytuje

v tyčinkách s průměrným obsahem $5,02 \pm 0,92$ log KTJ/g, nejlépe pak vyšla tyčinka s příchutí "Hořké kakao & Sezam" s obsahem 3,60 log KTJ/g výrobku.

Kvůli nedostatečnému počtu opakování byly ze statistického vyhodnocení vyřazeny výrobky: hrachové chipsy a těstoviny s cvrčím proteinem. Po provedení statistického vyhodnocení zbylých kategorií výrobků byly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi výrobky: tyčinky a krekry, tyčinky a pražení cvrčci a cvrčci a prášek do pečiva a na pečení ($p < 0,05$).

Aerobní sporulující mikroorganismy

Největší nárůst aerobních sporulujících mikroorganismů byl zaznamenán u výrobku celých pražených cvrčků "Rajčata & Oregano", kde jejich obsah dosahoval hodnoty 4,58 log KTJ/g. Zároveň kategorie pražených cvrčků obsahovala i nejvyšší průměrné hodnoty $3,94 \pm 0,40$ log KTJ/g. Naopak u skupiny výrobků tyčinek a proteinový shake vyšly hodnoty aerobních sporulujících mikroorganismů pod hranicí detekce (1 log KTJ/g).

Kvůli nedostatečnému opakování byly ze statistického vyhodnocení vyřazeny výrobky: hrachové chipsy a těstoviny s cvrčím proteinem. Mezi zbylými kategoriemi výrobků byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi výrobky tyčinky a celí pražení cvrčci ($p < 0,05$).

Escherichia coli

Detekční limit metody pro určení přítomnosti bakterií *Escherichia coli* je stanoven na 1 log KTJ/g. Po dokončení kultivace ve všech analyzovaných vzorcích vyšly bakterie *Escherichia coli* pod touto hranicí detekce.

Bacillus cereus

Ve všech vzorcích tyčinek a hrachových chipsů nebyl prokázán žádný výskyt bakterie *Bacillus cereus* (pod hranicí detekce < 1 log KTJ/g). Nejvyšší zaznamenaný počet byl ve výrobcích proteinových shakes, kde u obou vzorků dosahovaly hodnoty bakterie *Bacillus cereus* 2,30 log KTJ/g.

Kvůli nedostatečnému opakování byly ze statistického vyhodnocení vyřazeny výrobky: hrachové chipsy a těstoviny s cvrčím proteinem. Mezi zbylými vzorky nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl.

Enterobacteriaceae

Po ukončení kultivace byly spočítány kolonie z každé Petriho misky, které byly růžové, červené, nebo fialové barvy, či s obklopeny růžovou zónou. Výsledky bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae* vyšly ve všech analyzovaných vzorcích pod hranicí, jež má hodnotu < 1 log KTJ/g.

Koagulázapozitivní stafylokoky a *Staphylococcus aureus*

Výsledek počtu koaguláza pozitivních stafylokoků vyšel ve všech testovaných vzorcích pod 1 log KTJ/g. Pomocí konformačního testu Staphylase kit (Oxoid), bylo potvrzeno, že oproti výchozím spotům simulující výskyt těchto bakterií se u kontrolních spotů z našich vzorků nevyskytovaly shluky suspenzí testovaných buněk ani u jednoho vzorku a byla tak potvrzena absence výskytu bakterií *Staphylococcus aureus*.

***Salmonella* spp.**

Po ukončení kultivace na SS agaru bylo pozorováno několik černě zbarvených kolonií podobných koloniím salmonel. Provedením aglutinačního testu Salmonella Test Kit (Oxoid) byla zjištěna negativní reakce bez vzniku sraženin, a že se tím pádem nejedná o kolonie bakterií rodu *Salmonella*.

Kvasinky a plísňe

Počet kvasinek a plísňí byl nejvíce zaznamenán u výrobků z kategorie krekrů, průměrně se jednalo o hodnotu $2,50 \pm 1,29$ log KTJ/g. Nejvyšší hodnota byla naměřena u krekrů s příchutí "Černé olivy" a to 3,68 log KTJ/g. Ve výrobcích ze skupiny prášku do pečiva a hrachových chipsů nebyly žádné kvasinky ani plísňe detekovány.

Kvůli nedostatečnému opakování byly ze statistického vyhodnocení vyřazeny výrobky: hrachové chipsy a těstoviny s cvrčím proteinem. Mezi testovanými vzorky nebyly žádné statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$).

5.2 Identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie

***Clostridium* spp.**

Výskyt *Clostridium* spp. byl potvrzen celkem u 7 vzorků popsanych v Tabulce č. 9, včetně jejich skóre spolehlivosti identifikace. Tato identifikace proběhla podle metodiky pro stanovení hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, jenž je popsána výše v podkapitole 4.3.

Nejvyšší identifikační skóre 2,02 s vysokou mírou jistoty bylo vyhodnoceno u vzorku celých pražených cvrčků "Slaný karamel" s identifikací bakterie *Clostridium indolis*. U vzorku proteinového shake byla s pravděpodobnou identifikací rodu určena bakterie *Clostridium sporogenes* (skóre 1,84). Zbýlých 5 vzorků obsahujících *Clostridium* sp., rovněž s pravděpodobnou identifikací rodu, nebylo možné druhově identifikovat.

Tabulka č. 9: Výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF

Skóre	Identifikovaný taxon	Vzorek
1,84	<i>Clostridium sporogenes</i>	Proteinový shake
1,75	<i>Clostridium</i> sp. (druh nelze určit)	Protein tyčinka typu 1 (Ananas & Kokos)
2,02	<i>Clostridium indolis</i>	Pražení cvrčci (Slaný karamel)
1,73	<i>Clostridium</i> sp. (druh nelze určit)	Proteinové krekry (Oregano & Tymián)
1,74	<i>Clostridium</i> sp. (druh nelze určit)	Proteinové krekry (Oregano & Tymián)
1,76	<i>Clostridium</i> sp. (druh nelze určit)	Proteinové krekry (Černé olivy)

6 Diskuze

Momentálně pro jedlý hmyz neexistují legislativní mikrobiologické limity, a proto se v praxi pro jejich dodržování využívají hodnoty z normy ČSN 56 9609, která stanovuje mikrobiologická kritéria pro potraviny. Konkrétně jsou z této normy používány hodnoty pro korýše a jejich vzdálené příbuzné, jelikož se jedná o podobný alergen. Panel EFSA NDA (2021) stanovil odlišné požadavky na mikrobiální ukazatele u cvrčka domácího ve formě zmražené, sušené a ve cvrčím prášku, jenž jsou uvedeny v Tabulce č. 10.

Tabulka č. 10: Požadavky na mikrobiální ukazatele podle Panelu EFSA NDA (2021)

Mikrobiologický parametr	Jednotka	Cvrčci mražení	Cvrčci sušení	Cvrččí prášek
Celkový počet mezofilních aerobních mikroorganismů	log KTJ/g	≤ 5,00	≤ 5,00	≤ 5,00
<i>Enterobacteriaceae</i>	log KTJ/g	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
<i>Escherichia coli</i>	log KTJ/g	≤ 1,70	≤ 1,70	≤ 1,70
<i>Salmonella</i> spp.	v 25 g	negativní	negativní	negativní
<i>Bacillus cereus</i>	log KTJ/g	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
Koaguláza pozitivní stafylokoky	log KTJ/g	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00
Kvasinky a plísně	log KTJ/g	≤ 2,00	≤ 2,00	≤ 2,00

6.1 Mikroorganismy

6.1.1 Celkové počty mezofilních aerobních mikroorganismů

Podle Ministerstva zemědělství ČR (2018) i Panelu EFSA NDA (2021) je doporučena maximální přípustná hodnota pro mezofilní bakterie v jedlém hmyzu po tepelné úpravě do 5 log KTJ/g. Grabowski & Klein (2017) ve své práci zkoumali komplexní mikrobiální obsah jedlého hmyzu, včetně cvrčka domácího a jejich počty mezofilních aerobních organismů byly následující: v sušených cvrčcích se průměrná hodnota pohybovala okolo 5,5 log KTJ/g, v cvrčím moučce 5,70 log KTJ/g a v extrudovaných cvrčcích 3,10 log KTJ/g. Další podobná studie od Caparros Megido a kolektivu (2017) u čerstvých cvrčků bez tepelného ošetření zjistila hodnotu 7,97 log KTJ/g, u cvrčků blanširovaných po dobu 4 minuty 4,39 log KTJ/g a u sterilovaných cvrčků 3,74 log KTJ/g, u lyofilizovaných cvrčků vyšly hodnoty 4,05 log KTJ/g. Z uvedených studií lze potvrdit, že tepelné opracování má pozitivní vliv na výsledné počty mezofilních aerobů, nelze však říct, že by všechny testované vzorky splňovaly limitní hodnoty. Klunder a kolektiv (2012) ve své studii o aspektech zpracování a skladování jedlého hmyzu zmiňují, že existuje závislost mezi dobou skladování a množstvím obsažených mikroorganismů.

Nadlimitní hodnoty celkových počtů mezofilních mikroorganismů se objevily i ve výzkumu provedeném v rámci této práce, a to hned u několika vzorků. V průměru tak limit 5 log KTJ/g překročily všechny kategorie výrobků, kromě těstovin, které byly jediné pod limitem detekce <1 log KTJ/g. V průměru nejvyšších hodnot dosáhli pražení cvrčci ($7,45 \pm 0,43$ log KTJ/g), kde vzorek pražených cvrčků "Rajčata & Oregano" obsahoval 7,94 log KTJ/g. Druhou kategorií s nejvyšším obsahem mezofilních aerobů byly krekrý ($7,35 \pm 0,60$ log KTJ/g), jeden z výrobků krekrů "Černé olivy" dosahoval dokonce 8,43 log KTJ/g.

6.1.2 Aerobní sporulující mikroorganismy

Garofalo a kolektiv (2019) zmiňují, že hladiny v čerstvém hmyzu jsou obvykle nižší než hladiny ve zpracovaných produktech, a to kvůli několika faktorům, mezi které patří snížená a_w a následný osmotický stres, který sporulaci aktivuje. Tento fakt potvrzuje studie Ververis a kolektivu (2022), kteří popisují v souhrnu studií naměřené sporulující aerobní mikroorganismy v čerstvém hmyzu do hodnoty 4,30 log KTJ/g, ale ve cvrčcích v tepelně opracované formě až do 7,80 log KTJ/g. V jiných studiích byly hodnoty nižší u čerstvého i zpracovaného hmyzu, například studie Klundera a kolektivu (2012) uvádí hodnotu 3,60 log KTJ/g v čerstvých cvrčcích a hodnoty 1,50 log KTJ/g u cvrčků vařených i smažených. Další studie od Fasolato a kolektivu (2018) zjistila na 11 vzorcích pražených cvrčků průměrnou hodnotu sporulujících aerobů 4 log KTJ/g.

Z našich testovaných výrobků se nejvíc aerobních sporulujících mikroorganismů objevilo u kategorie pražených cvrčků s průměrnou hodnotou 3,94 log KTJ/g. Nejvyšší hodnotu 3,53 log KTJ/g měl výrobek pražených cvrčků "Rajčata & Oregano. Nejméně sporulujících aerobů

bylo v kategoriích tyčinek a proteinových shakes, kde byla identifikace pod limitem detekce (<1 log KTJ/g).

6.1.3 *Escherichia coli*

Ververis a kolektiv (2022) ve své práci shromáždili data různých mikrobiologických rozborů cvrčka domácího ve 4 opracovaných formách. U cvrčků v sušené a záhřevem opracované formě popisují hodnoty *Escherichia coli* u obou způsobů ošetření maximálně 1 log KTJ/g nebo bez detekce. Obecně se tyto patogeny u všech hmyzích produktů objevují jen minimálně a nejsou běžnou mikrobiotou cvrčků domácích. To potvrzují i Fernandez-Cassi a kolektiv (2019), kteří žádné *Escherichia coli* nenašli ani při podrobnějších metagenomických studiích. Müller a kolektiv (2021) vysvětlují, že ačkoli je *Escherichia coli* nejčastějším patogenem přenášejícím se potravinami, v jedlém hmyzu se objevuje pravděpodobně jen jako důsledek použité kontaminované vody. Limitní kritérium pro *Escherichia coli* je maximálně 1,7 log KTJ/g, což bylo splněno i v této práci, kde žádný výrobek nepřekročil 1,7 log KTJ/g, což byl rovněž detekční limit použité metody. Tím pádem nelze s jistotou tvrdit, že vzorky neobsahovaly *E. coli* vůbec, avšak lze říct, že vzorky byly z hlediska tohoto kritéria vyhovující.

6.1.4 *Bacillus cereus*

Bawa a kolektiv (2020) zkoumali rozdíly v počtu různých druhů mikroorganismů u čerstvých cvrčků v porovnání s pečenými cvrčky. Efekt tepelného zpracování byl účinný u všech druhů mikroorganismů včetně *Bacillus cereus*, kde čerství cvrčci obsahovali v průměru $4,17 \pm 1,10$ log KTJ/g a pečení cvrčci $3,27 \pm 1,25$ log KTJ/g. Frigerio a kolektiv (2020) zmiňují, že přestože v EU neexistují pevně stanovené limity pro obsah *Bacillus cereus* v jedlém hmyzu, je bezpečnostní práh určen na 5 log KTJ/g. Dále odkazují na studii Fasolato et al. (2018), kteří v 11 vzorcích komerčně dostupných pražených cvrčků domácích naměřili hodnoty v průměru pod 4 log KTJ/g, našli se však i vzorky, které dosahovali až hodnot 6,6 log KTJ/g. V roce 2021 Panel EFSA NDA (2021) stanovili mikrobiologické požadavky na obsah *Bacillus cereus* u cvrčků zmražených, sušených a v cvrččí moučce, a to na hodnotu 2 log KTJ/g.

V provedených rozborech se bakterie *Bacillus cereus* rovněž objevily v největším počtu ve vzorcích pražených cvrčků. Nejvyšší obsah *Bacillus cereus* u pražených cvrčků byl změřen u příchutě "BBQ & Paprika" s hodnotou 4,18 log KTJ/g a příchutě "Slaný karamel" s hodnotou 3,95 log KTJ/g, nad limitní hodnotou 2 log KTJ/g byly identifikovány i vzorky prášku do pečiva (3,83 log KTJ/g) a proteinové shakes (2,301 log KTJ/g). Testované výrobky, kde se bakterie *Bacillus cereus* neobjevily (<1 log KTJ/g), byly v našem případě tyčinky, krekry a hrachové chipsy.

6.1.5 *Enterobacteriaceae*

Ve studii Vandeweyera a kolektivu (2017) byly zkoumány bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* u cvrčka domácího v čerstvém stavu v porovnání s následným blanšírováním po dobu 10, 20 a 40 vteřin. Hodnoty u čerstvých cvrčků několikanásobně převyšovaly maximální limitní

hodnotu, jež činí 1,7 log KTJ/g, ovšem s každým následujícím blanširovacím procesem se tato hodnota zmenšovala až pod maximální limitní hodnotu <1,7 log KTJ/g. Garofalo a kolektiv (2017) zase ve své studii zkoumali mikrobiologickou kvalitu cvrččí mouky, u které ve všech testovaných šaržích *Enterobacteriaceae* vycházely hodnoty rovněž pod 1,7 log KTJ/g. Podobných hodnot dosahují i cvrčci vaření a smažení ze studie Klundera a kolektivu (2012), které dosahovaly dokonce pod 1 log KTJ/g.

Lze tedy konstatovat, že tepelná úprava bezpečně napomáhá snížit *Enterobacteriaceae* pod maximální limitní hodnotu, což je potvrzeno i v této diplomové práci, kde byly všechny výrobky z hlediska obsahu *Enterobacteriaceae* pod limitem detekce (<1 log KTJ/g).

6.1.6 Koagulázopozitivní stafylokoky a *Staphylococcus aureus*

Osimani a kolektiv (2016) srovnávali ve své práci rozdíl mezi čerstvými cvrčky s cvrččím moučkou a uvádí, že všechny nalezené stafylokoky vykazovaly negativní reakci na koagulázu a tím pádem neobsahovaly ani žádnou bakterii *Staphylococcus aureus*. Jiná studie zaměřená na mikrobiologickou kvalitu u čerstvých, pečených a sušených cvrčků od Bawa a kolektivu (2020) vyhodnotila ve všech vzorcích i šaržích počet *Staphylococcus aureus* pod limitem detekce, tedy <1 log KTJ/g.

V této práci byly všechny vzorky po provedené kultivaci testovány na přítomnost koaguláza pozitivních stafylokoků včetně *Staphylococcus aureus* pomocí Staphylase Test Kitu (Oxoid) a všechny vyšly pod detekčním limitem (<1 log KTJ/g).

6.1.7 *Salmonella* spp.

Patogenní bakterie rodu *Salmonella* by neměly být, dle platných evropských právních předpisů, vůbec přítomny v 25 g nebo ml testovaného výrobku. V této práci u všech kategorií výrobků nebyly žádné bakterie rodu *Salmonella* identifikovány, stejně tak nedošlo k identifikaci *Salmonella* spp. i u výzkumné práce Kolakowski a kolektivu (2021), kteří rovněž testovali výrobky z cvrčka domácího, konkrétně se jednalo o proteinové tyčinky, proteinový prášek, cvrččí mouku a pražené cvrčky. Fasolato a kolektiv (2021) zkoumali několik dostupných výrobků z tepelně upravených celých těl cvrčků domácích, kde rovněž žádné bakterie rodu *Salmonella* nebyly identifikovány.

6.1.8 Kvasinky a plísně

Osimani a kolektiv (2016) ve své studii zkoumali vzorky cvrččí moučky a sušených celých cvrčků na přítomnost kvasinek i plísní. Zatímco v sušených cvrčcích dosahovaly kvasinky a plísně hodnot pod limitem detekce (<1 log KTJ/g), u cvrččí moučky bylo nalezeno $2,00 \pm 0,01$ log KTJ/g kvasinek a $3,30 \pm 0,02$ log KTJ/g plísní. Ve studii Grabowskiho a Kleina (2017), zkoumající stejný typ výrobků, byly hodnoceny kvasinky a plísně dohromady. U sušených celých cvrčků naměřili hodnotu 2,20 log KTJ/g a cvrččí mouka obsahovala 4,80 log KTJ/g. Ververis a kolektiv (2022) potvrzují ve své studii účinnost tepelného opracování na

čerstvých cvrčcích domácích, v kterých bylo naměřeno až 7,20 log KTJ/g kvasinek a plísní, zatímco v tepelně opracované formě byla maximální hodnota 1,60 log KTJ/g a v sušené formě maximálně 5,10 log KTJ/g. Přesto všechny zmíněné studie ve většině nesplňují limitní hodnotu do 2 log KTJ/g, jež stanovil Panel EFSA NDA (2021).

V této práci dosahovaly nejvyšších hodnot kategorie výrobků proteinové krekrý s průměrnou hodnotou $2,50 \pm 1,29$ log KTJ/g, nejvíce se jich objevilo ve vzorku proteinových krekrů "Černé olivy" s hodnotou 3,68 log KTJ/g. Nadlimitní hodnota byla naměřena i u jednoho vzorku cvrčků (2,48 log KTJ/g) a dvou vzorků tyčinek (2,43 log KTJ/g a 2,85 log KTJ/g).

6.2 Tepelné zpracování

Výrobní krok tepelného zpracování, který zahrnuje vaření, paření či autoklávování, je všeobecně nutný ke snížení mikrobiální kontaminace, a to včetně sporotvorných bakterií, i když má běžně užívaný záhřev na spory jen mírný účinek (Klunder et al. 2012). Fröhling a kolektiv (2020) popisují, že v ideálním případě by měly být aplikovány vyšší teploty, které by umožnily snížení počtu mikroorganismů, i případně přítomných spor, ale mohly by negativně ovlivnit nutriční profil a organoleptické vlastnosti cvrčků. Bourdoux a kolektiv (2016) popisují proces sušení jako užitečný krok v eliminaci bakterií, nelze ho však využívat samostatně kvůli nejisté účinnosti vzhledem ke snížené a_w , což potvrzují i Nyangena a kolektiv (2020) ve své studii na cvrčcích domácích, kde právě sušené vzorky obsahovaly (ze 4 různých způsobů opracování, za účelem eliminace mikroorganismů) nejvíc mezofilních aerobů, stafylokoků i kvasinek a plísní. Ve stejné studii je prokázáno, že kombinace dvou různých opracování mnohem účinněji eliminuje mikrobiální kontaminaci.

Samostatnou kategorií je cvrččí mouka, která je obecně považována za mikrobiologicky stabilní produkt vlivem nízké a_w , jenž nepodporuje růst bakterií. Nicméně je třeba poznamenat, že určité bakterie mohou přežít i v extrémních podmínkách, a dokonce se i množit, pokud je cvrččí mouka znovu rehydratována pro výrobu potravin. Je proto třeba tento aspekt vzít v úvahu u potravinářských výrobků obsahující právě cvrččí moučku, uvádí Kooh a kolektiv (2020). Ververis a kolektiv (2022) doplňují, že k zajištění mikrobiologické bezpečnosti je žádoucí sledovat kvalitu syrového hmyzu především v následujících kritériích: celkové mezofilní bakterie, sporotvorné bakterie, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus*, a zároveň vhodně optimalizovat tepelné zpracování vzhledem k množství zmíněných mikroorganismů. Rovněž uvádějí, že správné hygienické postupy ve všech krocích výrobního procesu mohou přispět ke zlepšení mikrobiologické bezpečnosti všech zpracovaných forem cvrčka domácího i dalšího jedlého hmyzu.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověření hypotézy, zda výrobky z jedlého hmyzu budou obsahovat nežádoucí mikroorganismy, které již v minulosti byly v několika studiích v jedlém hmyzu pozorovány. K mikrobiologické analýze bylo vybráno celkem 20 vzorků z různých kategorií výrobků s přídavkem cvrčků domácích v celé, či zpracované formě na cvrččí mouku. Kromě tyčinek a těstovin proběhlo testování dalších 5 kategorií produktů, a to na přítomnost devíti, v hmyzu nejčastěji se vyskytujících, skupin mikroorganismů. Všechny testy proběhly kultivačními metodami podle standardních postupů a platných norem s následující identifikací vybraných parametrů pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Po porovnání získaných výsledků s údaji z odborných studií lze konstatovat, že u některých druhů mikroorganismů tepelné zpracování pomohlo jejich eliminaci. Nelze však tvrdit, že vždy jde o 100% účinnou metodu, protože v některých testovaných výrobcích byly i přes více kombinací tepelného opracování překročeny limitní hodnoty. V našem případě se jednalo především o mezofilní aerobní mikroorganismy, které překročily limit u 6 ze 7 testovaných kategorií výrobků. Rovněž se v jisté míře nad limitem objevovaly i aerobní sporulující mikroorganismy a kvasinky a plísňe. U některých vzorků byla pomocí MALDI-TOF MS zjištěna přítomnost *Clostridium* spp. i *Bacillus cereus*, ale patogenní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Salmonella* spp. nebyly v našem rozboru prokázány.

Ze získaných výsledků lze potvrdit hypotézu, že výrobky budou obsahovat v určitém množství nežádoucí mikroorganismy. Zároveň lze ale říct, že opracování v průběhu výroby snižuje jejich množství.

8 Seznam použité literatury

Aguilar-Toalá JE, Cruz-Monterrosa RG, Liceaga AM. 2022. Beyond Human Nutrition of Edible Insects: Health Benefits and Safety Aspects. *Insects* **13**. Available at <https://www.mdpi.com/2075-4450/13/11/1007> (accessed April 7, 2023).

Alenazy R. 2022. Antibiotic resistance in Salmonella: Targeting multidrug resistance by understanding efflux pumps, regulators and the inhibitors. *Journal of King Saud University – Science* **34**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1018364722004566> (accessed November 29, 2022).

Alrifai O, Marcone MF. 2019. Human Use of Insects as Food – Food Security. *Comprehensive Biotechnology*:618-628. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640468004638> (accessed October 16, 2022).

Azzollini D, Derossi A, Severini C. 2016. Understanding the drying kinetic and hygroscopic behaviour of larvae of yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) and the effects on their quality. *Journal of Insects as Food and Feed* **2**:233-243. Available at <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/JIFF2016.0001> (accessed November 19, 2022).

Baiano A. 2020. Edible insects: An overview on nutritional characteristics, safety, farming, production technologies, regulatory framework, and socio-economic and ethical implications. **100**:35-50. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224419302511> (accessed October 5, 2022).

Ballesté E, Muniesa M, García-Aljaro C. 2022. *Shigella* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*:515-521. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965009938> (accessed November 29, 2022).

Bawa M, Songsermpong S, Kaewtapee C, Chanput W. 2020. Effects of microwave and hot air oven drying on the nutritional, microbiological load, and color parameters of the house crickets (*Acheta domesticus*). *Journal of Food Processing and Preservation* **44**. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.14407> (accessed March 27, 2023).

Belluco S, Losasso C, Maggioletti M, Alonzi CC, Paoletti MG, Ricci A. 2013. Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **12**:296-313. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12014> (accessed October 16, 2022).

Biswas S, Rolain J-M. 2013. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. *Journal of Microbiological Methods* **92**:14-24. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701212003478> (accessed February 7, 2023).

Borges MM, da Costa DV, Trombete FM, Câmara AKFI. 2022. Edible insects as a sustainable alternative to food products: an insight into quality aspects of reformulated bakery and meat products. *Current Opinion in Food Science* **46**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214799322000662> (accessed November 6, 2022).

Bourdoux S, Li D, Rajkovic A, Devlieghere F, Uyttendaele M. 2016. Performance of Drying Technologies to Ensure Microbial Safety of Dried Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **15**:1056-1066. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12224> (accessed April 5, 2023).

Bußler S, Rumpold BA, Jander E, Rawel HM, Schlüter OK. 2016. Recovery and techno-functionality of flours and proteins from two edible insect species: Meal worm (*Tenebrio molitor*) and black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Heliyon* **2**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844016317467> (accessed November 19, 2022).

Bursíková Š, Necidová L, Dušková M. 2014. Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno. Available at https://fvhe.vfu.cz/files/cela-skripta-bursova-a-kol_obecna-mb_definitivni-elektronicka-verze_27-11.pdf (accessed February 6, 2023).

Caparros Megido R et al. 2018. Effect of household cooking techniques on the microbiological load and the nutritional quality of mealworms (*Tenebrio molitor* L. 1758). *Food Research International* **106**:503-508. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918300024> (accessed November 19, 2022).

Carlin F. 2016. *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* sp. Causing Foodborne Poisonings, Detection of. *Encyclopedia of Food and Health*:301-306. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123849472000519> (accessed November 24, 2022).

Costa-Neto EM, Dunkel FV. 2016. Insects as Food: History, Culture, and Modern Use around the World. 29-60 in *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028568000028>.

ČSN 56 9609 (569609) Pravidla správné hygienické a výrobní praxe: Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. 2008. Český normalizační institut, Praha.

ČSN ISO 21527-1: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní – Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95. 2009. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 21528-2 (560096): Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu bakterií čeledi Enterobacteriaceae – Část 2: Technika počítání kolonií. 2021. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 4833-1 (560083): Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. 2014. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 6579-1 (560088): Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu Salmonella – Část 1: Průkaz bakterií rodu Salmonella. 2020. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 6888-1 (560089): Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda stanovení počtu koaguláza pozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera. 2022. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 7932 (560092): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu presumptivního *Bacillus cereus* – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. 2005. Český normalizační institut, Praha.

ČSN EN ISO 7937 (560091): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu *Clostridium perfringens* – Technika počítání kolonií. 2006. Český normalizační institut, Praha.

ČSN ISO 16649-2: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu beta-glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* – Část 2: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glukuronidu. 2003. Český normalizační institut, Praha.

Davin-Regli A, Lavigne J-P, Pagès J-M. 2019. *Enterobacter* spp: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **32**: e00002-19. Available at <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00002-19> (accessed November 29, 2022).

Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märtlbauer E, Granum PE. 2021. The Food Poisoning Toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins* **13**. Available at <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/2/98> (accessed November 24, 2022).

de Castro RJS, Ohara A, Aguilar JG dos S, Domingues MAF. 2018. Nutritional, functional and biological properties of insect proteins: Processes for obtaining, consumption and future challenges. **76**:82-89. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417306702> (accessed October 5, 2022).

de Gier S, Verhoeckx K. 2018. Insect (food) allergy and allergens. *Molecular Immunology* **100**:82-106. Available at

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589018300944> (accessed October 15, 2022).

Ditchburn J-L, Hodgkins R. 2019. *Yersinia pestis*, a problem of the past and a re-emerging threat. *Biosafety and Health* **1**:65-70. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2590053619300230> (accessed November 25, 2022).

Dong N, Yang X, Chan EW-C, Zhang R, Chen S. 2022. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine* **79**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396422001827> (accessed November 29, 2022).

Douglas AE. 2017. The B vitamin nutrition of insects: the contributions of diet, microbiome and horizontally acquired genes. *Current Opinion in Insect Science* **23**:65-69. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214574517300226> (accessed November 3, 2022).

EFSA. 2018. Novel food. Available at https://food.ec.europa.eu/safety/novel-food_en (accessed September 27, 2022).

EFSA NDA. 2021. Safety of frozen and dried formulations from whole yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **19**. Available at <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2021.6778> (accessed April 7, 2023).

EFSA Scientific Committee. 2015. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal* **13**. Available at <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2015.4257> (accessed October 2, 2022).

Eilenberg J, Vlaskovic JM, Nielsen-LeRoux C, Cappellozza S, Jensen AB. 2015. Diseases in insects produced for food and feed. *Journal of Insects as Food and Feed* **1**:87-102. Available at <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/JIFF2014.0022> (accessed November 4, 2022).

Fasolato L, Cardazzo B, Carraro L, Fontana F, Novelli E, Balzan S. 2018. Edible processed insects from e-commerce: Food safety with a focus on the *Bacillus cereus* group. *Food Microbiology* **76**:296-303. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002017311826> (accessed March 29, 2023).

Feng Y, Chen X-M, Zhao M, He Z, Sun L, Wang C-Y, Ding W-F. 2018. Edible insects in China: Utilization and prospects. *Insect Science* **25**:184-198. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1744-7917.12449> (accessed September 6, 2022).

- Fernandez-Cassi X, Supeanu A, Vaga M, Jansson A, Boqvist S, Vagsholm I. 2019. The house cricket (*Acheta domesticus*) as a novel food: a risk profile. *Journal of Insects as Food and Feed* **5**:137-157. Available at <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/JIFF2018.0021> (accessed April 3, 2023).
- Fetsch A, Johler S. 2018. *Staphylococcus aureus* as a Foodborne Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports* **5**:88-96. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s40588-018-0094-x> (accessed November 29, 2022).
- Finke MD. 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology* **26**:105-115. Available at <http://doi.wiley.com/10.1002/zoo.20123> (accessed October 9, 2022).
- Finke MD, Oonincx D. 2014. Insects as Food for Insectivores. 583-616 in *Mass Production of Beneficial Organisms*. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123914538000170> (accessed November 2, 2022).
- Frigerio J, Agostinetti G, Galimberti A, De Mattia F, Labra M, Bruno A. 2020. Tasting the differences: Microbiota analysis of different insect-based novel food. *Food Research International* **137**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996920304518> (accessed November 3, 2022).
- Fröhling A, Bußler S, Durek J, Schlüter OK. 2020. Thermal Impact on the Culturable Microbial Diversity Along the Processing Chain of Flour From Crickets (*Acheta domesticus*). *Frontiers in Microbiology* **11**. Available at <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.00884/full> (accessed April 5, 2023).
- García-Solache M, Rice LB. 2019. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews* **32**:e00058-18. Available at <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00058-18> (accessed November 23, 2022).
- Garofalo C, Milanović V, Cardinali F, Aquilanti L, Clementi F, Osimani A. 2019. Current knowledge on the microbiota of edible insects intended for human consumption: A state-of-the-art review. *Food Research International* **125**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919303989> (accessed October 21, 2022).
- 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 at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002016300867> (accessed March 27, 2023).
- Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, Ferreira LCS, Martinez MB. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology* **47**:3-30.

Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216310917> (accessed November 29, 2022).

Govorushko S. 2019. Global status of insects as food and feed source: A review. **91**:436-445. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224418304874> (accessed August 19, 2022).

Grabowski NT, Klein G. 2017. Bacteria encountered in raw insect, spider, scorpion, and centipede taxa including edible species, and their significance from the food hygiene point of view. **63**:80-90. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415302065> (accessed October 21, 2022).

Gravel A, Doyen A. 2020. The use of edible insect proteins in food: Challenges and issues related to their functional properties. **59**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1466856419313062> (accessed November 16, 2022).

Haenni M, Lupo A, Madec J-Y, Aarestrup FM, Schwarz S, Shen J, Cavaco L. 2018. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiology Spectrum* **6**. Available at <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017> (accessed November 29, 2022).

Huong TT, Komínková M, Guráň R, Ruttkay-Nedecký B, Kopel P, Trnková L, Zítka O, Adam V, Kizek R. 2014. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*:64-66. Available at https://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0214/pdf/d-microbial_identification_by_maldi-tof_ms.pdf (accessed February 7, 2023).

Imathiu S. 2020. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. *NFS Journal* **18**:1-11. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S235236461930046X> (accessed October 8, 2022).

Jajere SM. 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World* **12**:504-521. Available at <http://www.veterinaryworld.org/Vol.12/April-2019/5.html> (accessed November 29, 2022).

Jantzen da Silva Lucas A, Menegon de Oliveira L, da Rocha M, Prentice C. 2020. Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. *Food Chemistry* **311**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461932165X> (accessed October 5, 2022).

Kačalová M. 2011. Optimalizace podmínek přípravy vzorků pro MALDI-MS profilování bakterií. Diplomová práce. Brno. Available at <https://theses.cz/id/kq8jzn/>.

- Klunder HC, Wolkers-Rooijackers J, Korpela JM, Nout MJR. 2012. Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control* **26**:628-631. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512000874> (accessed March 27, 2023).
- 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. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S122686151830671X> (accessed October 11, 2022).
- Kooh P, Jury V, Laurent S, Audiat-Perrin F, Sanaa M, Tesson V, Federighi M, Boué G. 2020. Control of Biological Hazards in Insect Processing: Application of HACCP Method for Yellow Mealworm (*Tenebrio molitor*) Powders. *Foods* **9**. Available at <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/11/1528> (accessed April 5, 2023).
- Kolakowski BM, Johaniuk K, Zhang H, Yamamoto E. 2021. Analysis of Microbiological and Chemical Hazards in Edible Insects Available to Canadian Consumers. *Journal of Food Protection* **84**:1575-1581. Available at <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017311826> (accessed March 27, 2023).
- Kosečková P, Zvěřina O, Pěchová M, Krulíková M, Duborská E, Borkovcová M. 2022. Mineral profile of cricket powders, some edible insect species and their implication for gastronomy. *Journal of Food Composition and Analysis* **107**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157521005408> (accessed October 9, 2022).
- Kouřimská L, Adámková A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal* **4**:22-26.
- Kowalski S, Mikulec A, Mickowska B, Skotnicka M, Mazurek A. 2022. Wheat bread supplementation with various edible insect flours. Influence of chemical composition on nutritional and technological aspects. *LWT* **159**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643822001554> (accessed November 6, 2022).
- Lange KW, Nakamura Y. 2021. Edible insects as future food: chances and challenges. *Journal of Future Foods* **1**:38-46. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2772566921000033> (accessed September 7, 2022).
- 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 at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b03286> (accessed October 9, 2022).

Liceaga AM. 2022. Edible insects, a valuable protein source from ancient to modern times. *Emerging Sources and Applications of Alternative Proteins*:129-152. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452622000110> (accessed October 8, 2022).

Mabelebele M, Kolobe SD, Malematja E, Sebola NA, Manyelo TG. 2022. A Comprehensive Review of the Importance of Selected Trace Elements Present in Edible Insects. *Biological Trace Element Research* **2022**. Available at <https://link.springer.com/10.1007/s12011-022-03423-z> (accessed October 9, 2022).

Mąka Ł, Popowska M. 2016. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* **67**:343-358. Warsaw.

Mancini S, Sogari G, Espinosa Diaz S, Menozzi D, Paci G, Moruzzo R. 2022. Exploring the Future of Edible Insects in Europe. *Foods* **11**. Available at <https://www.mdpi.com/2304-8158/11/3/455> (accessed November 6, 2022).

Marshall DL, Dickson JS, Nguyen NH. 2016. Ensuring Food Safety in Insect Based Foods: Mitigating Microbiological and Other Foodborne Hazards. *Insects as Sustainable Food Ingredients*:223-253. Elsevier. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128028568000089> (accessed November 2, 2022).

McNally A, Thomson NR, Reuter S, Wren BW. 2016. 'Add, stir and reduce': *Yersinia* spp. as model bacteria for pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology* **14**:177-190. Available at <https://www.nature.com/articles/nrmicro.2015.29> (accessed November 25, 2022).

Melgar-Lalanne G, Hernández-Álvarez A-J, Salinas-Castro A. 2019. Edible Insects Processing: Traditional and Innovative Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18**:1166-1191. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1541-4337.12463> (accessed November 19, 2022).

Mlček J, Rop O, Borkovcová M, Bednářová M. 2014. A Comprehensive Look at the Possibilities of Edible Insects as Food in Europe – A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* **64**:147-157. Available at <http://www.journalssystem.com/pjfn/A-Comprehensive-Look-at-the-Possibilities-of-Edible-Insects-as-Food-in-Europe-A-Review,98389,0,2.html> (accessed October 9, 2022).

Moore ERB, Tindall BJ, Martins Dos Santos VAP, Pieper DH, Ramos J-L, Palleroni NJ. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. *The Prokaryotes*:646-703. Springer New York, New York, NY. Available at http://link.springer.com/10.1007/0-387-30746-X_21 (accessed November 23, 2022).

Müller A, Seinige D, Grabowski NT, Ahlfeld B, Yue M, Kehrenberg C. 2021. Characterization of *Escherichia coli* from Edible Insect Species: Detection of Shiga Toxin-Producing Isolate. *Foods* **10**. Available at <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/11/2552> (accessed March 31, 2023).

Murefu TR, Macheka L, Musundire R, Manditsera FA. 2019. Safety of wild harvested and reared edible insects: A review. *Food Control* **101**:209-224. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713519301021> (accessed October 12, 2022).

Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 2015/2283: o nových potravinách, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 a o zrušení nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 258/97 a nařízení Komise (ES) č. 1852/2001. 2015.

Nyangena DN, Mutungi C, Imathiu S, Kinyuru J, Affognon H, Ekesi S, Nakimbugwe D, Fiaboe KKM. 2020. Effects of Traditional Processing Techniques on the Nutritional and Microbiological Quality of Four Edible Insect Species Used for Food and Feed in East Africa. *Foods* **9**. Available at <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/5/574> (accessed April 5, 2023).

Ordoñez-Araque R, Egas-Montenegro E. 2021. Edible insects: A food alternative for the sustainable development of the planet. *International Journal of Gastronomy and Food Science* **23**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878450X21000032> (accessed October 8, 2022).

Osmani A et al. 2016. Insight into the proximate composition and microbial diversity of edible insects marketed in the European Union. *European Food Research and Technology* **243**:1157-1171. Available at <http://link.springer.com/10.1007/s00217-016-2828-4> (accessed March 31, 2023).

Pahalagedara ASNW, Flint S, Palmer J, Brightwell G, Gupta TB. 2020. Antimicrobial production by strictly anaerobic *Clostridium* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents* **55**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857920300492> (accessed November 24, 2022).

Patel S, Suleria HAR, Rauf A. 2019. Edible insects as innovative foods: Nutritional and functional assessments. **86**:352-359. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224417304326> (accessed October 4, 2022).

Perez-Santaescolastica C, De Winne A, Devaere J, Fraeye I. 2022. The flavour of edible insects: A comprehensive review on volatile compounds and their analytical assessment. **127**:352-367. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224422003004> (accessed November 21, 2022).

Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor Hidayah MS, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah YK, Son R. 2011. Salmonella: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal* **18**:465-473. Available at [http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20\(02\)%202011/\(1\)%20IFRJ-2010-306.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20(02)%202011/(1)%20IFRJ-2010-306.pdf) (accessed January 27, 2023).

- Raheem D, Raposo A, Oluwole OB, Nieuwland M, Saraiva A, Carrascosa C. 2019. Entomophagy: Nutritional, ecological, safety and legislation aspects. *Food Research International* **126**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996919305587> (accessed October 2, 2022).
- Ribeiro JC, Cunha LM, Sousa-Pinto B, Fonseca J. 2018. Allergic risks of consuming edible insects: A systematic review. **62**. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201700030> (accessed October 14, 2022).
- Rumpold BA, Schlüter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **57**:802-823. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201200735> (accessed October 30, 2022).
- Sampedro I, Parales RE, Krell T, Hill JE. 2014. *Pseudomonas chemotaxis*. *FEMS Microbiology Reviews*:n/a-n/a. Available at <https://academic.oup.com/femsre/article/39/1/17/541236/Pseudomonas-chemotaxis> (accessed November 23, 2022).
- Sapkota A. 2022. Serial Dilution: Definition, Formula, Calculator, Procedure, Uses. Available at <https://microbenotes.com/serial-dilution/> (accessed March 20, 2023).
- Schlüter O et al. 2017. Safety aspects of the production of foods and food ingredients from insects. **61**. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201600520> (accessed October 15, 2022).
- Searchinger T, Hanson C, Ranganathan J, Lipinski B. 2014. Creating a sustainable food future. A menu of solutions to sustainably feed more than 9 billion people by 2050.: World resources report 2013-14 : interim findings. World Resources Institute.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. 2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* **6**. Available at <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00791/abstract> (accessed February 7, 2023).
- Spickler AR. 2020. Zoonotic Streptococcosis. The Center for Food Security & Public Health. Iowa. Available at <https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/streptococcosis.pdf> (accessed November 29, 2022).
- Společnost pro výživu. 2019. Referenční hodnoty pro příjem živin. Praha.
- Sun-Waterhouse D, Waterhouse GIN, You L, Zhang J, Liu Y, Ma L, Gao J, Dong Y. 2016. Transforming insect biomass into consumer wellness foods: A review. *Food Research International* **89**:129-151. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996916304264> (accessed November 19, 2022).

Tae-Kyung K, Hae In Y, Young-Boong K, Hyun-Wook K, Yun-Sang C. 2019. Edible Insects as a Protein Source: A Review of Public Perception, Processing Technology, and Research Trends. *Food Science of Animal Resources* **39**:521-540. Korea. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6728817/> (accessed February 14, 2023).

Turck D et al. 2021. Safety of frozen and dried formulations from whole yellow mealworm (*Tenebrio molitor* larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal* **19**. Available at <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2021.6778> (accessed November 19, 2022).

Vandeweyer D, Lenaerts S, Callens A, Van Campenhout L. 2017. Effect of blanching followed by refrigerated storage or industrial microwave drying on the microbial load of yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*). *Food Control* **71**:311-314. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713516303747> (accessed November 19, 2022).

van Huis A, van Itterbeeck J, Klunder H, Merthens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. 2013. Edible insects: Future prospects for food and feed security. *FAO Forestry Paper 171*. Food and agriculture organization of the united nations, Řím.

van Huis A, Rumpold B, Maya C, Roos N. 2021. Nutritional Qualities and Enhancement of Edible Insects. *Annual Review of Nutrition* **41**:551-576. Available at <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-nutr-041520-010856> (accessed October 9, 2022).

Verhoeckx KCM, van Broekhoven S, den Hartog-Jager CF, Gaspari M, de Jong GAH, Wichers HJ, van Hoffen E, Houben GF, Knulst AC. 2014. House dust mite (Der p 10) and crustacean allergic patients may react to food containing Yellow mealworm proteins. *Food and Chemical Toxicology* **65**:364-373. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691514000088> (accessed October 15, 2022).

Verhoeckx K, Broekman H, Knulst A, Houben G. 2016. Allergenicity assessment strategy for novel food proteins and protein sources. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **79**:118-124. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230016300605> (accessed October 15, 2022).

Ververis E, Boué G, Poulsen M, Pires SM, Niforou A, Thomsen ST, Tesson V, Federighi M, Naska A. 2022. A systematic review of the nutrient composition, microbiological and toxicological profile of *Acheta domesticus* (house cricket). *Journal of Food Composition and Analysis* **114**. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088915752200477X> (accessed March 27, 2023).

Williams TL, Andrzejewski D, Lay JO, Musser SM. 2003. Experimental factors affecting the quality and reproducibility of MALDI TOF mass spectra obtained from whole bacteria cells. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **14**:342-351. Available at [https://pubs.acs.org/doi/10.1016/S1044-0305\(03\)00065-5](https://pubs.acs.org/doi/10.1016/S1044-0305(03)00065-5) (accessed February 20, 2023).

Xiaoming C, Ying F, Hong Z, Zhiyong C. 2010. Review of the nutritive value of edible insects. 85-92 in *Forest Insects as Food: Proceedings of a Workshop on Asia-Pacific Resources and Their Potential for Development*. Thajsko. Available at <http://www.doc-developpement-durable.org/file/Elevages/Insectes/edible%20forest%20insects.pdf#page=94> (accessed November 2, 2022).

Yen AL. 2009. Edible insects: Traditional knowledge or western phobia?. *Entomological Research* **39**:289-298. Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5967.2009.00239.x> (accessed February 14, 2023).

Yi C, He Q, Wang L, Kuang R. 2010. The Utilization of Insect-resources in Chinese Rural Area. *Journal of Agricultural Science* **2**. Available at [10.5539/jas.v2n3p146](https://doi.org/10.5539/jas.v2n3p146) (accessed August 22, 2022).

Zákon č. 166/1999 Sb.: Zákon o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon). 1999. Available at <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1999-166?text=hmyz>.

9 Elektronické zdroje

[Online 1] The List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: Enterococcus. 2022. Available at <https://lpsn.dsmz.de/genus/enterococcus> (accessed February 14, 2023).

[Online 2] The List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: Streptococcus. 2022. Available at <https://lpsn.dsmz.de/genus/streptococcus> (accessed February 14, 2023).

[Online 3] Thermo Fisher Scientific. 2022. Available at <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0595A> (accessed February 13, 2023).

[Online 4] Staphylase Test Kit. Available at <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0595A> (accessed February 20, 2023).

[Online 5] Salmonella Test Kit using Latex Agglutination. Available at <https://www.fishersci.se/shop/products/salmonella-test-kit-using-latex-agglutination/10557473> (accessed February 20, 2023).

10 Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Druhy hmyzu možné uvádět na trh v České republice podle přechodného opatření Nařízení (EU) č. 2015/2283	13
Tabulka č.2: Srovnání obsahu bílkovin u hmyzu a jiných konzumovaných živočišných druhů.	15
Tabulka č. 3: Obsah prvků ve vzorcích jedlého hmyzu (v mg/100 g sušiny) a porovnání s referenčními hodnotami příjmu živin (DACH) (v mg/den pro dospělého člověka).....	17
Tabulka č. 4: Seznam analyzovaných výrobků včetně jejich popisu.....	30
Tabulka č. 5: Složení ředícího média	31
Tabulka č. 6: Podmínky kultivace pro jednotlivé mikroorganismy.....	33
Tabulka č. 7: Třídy spolehlivosti v databázi MALDI Biotyper.....	39
Tabulka č. 8: Stanovené počty mikroorganismů po skončení kultivace, uvedeno v log KTJ/g. Hodnoty jsou zprůměrované podle počtu opakování a druhu výrobku ± směrodatná odchylka.....	40
Tabulka č. 9: Výsledky identifikace pomocí MALDI-TOF	43
Tabulka č. 10: Požadavky na mikrobiální ukazatele podle Panelu EFSA NDA (2021).....	43
Tabulka č. 11: Výsledky všech bakterií ze všech analyzovaných vzorků po dokončení kultivace	43

11 Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Průměrný obsah bílkovin jedlého hmyzu v sušině.	14
Obrázek č. 2: Porovnání odhadovaných zdrojů k produkci 1 kg bílkovin z krávy domácí a saranče stěhovavé	26
Obrázek č. 3: Schéma ředící řady do hodnoty 10^{-6}	32
Obrázek č. 4: Připravená pěstební a ředící média ke kultivaci	32
Obrázek č. 5: Staphylase Test Kit a Salmonella Test Kit (Oxoid).....	37
Obrázek č. 6: Metody nanášení vzorků na MALDI destičku	38
Obrázek č. 7: Schéma MALDI-TOF	39

12 Seznam použitých zkratek a symbolů

a_w = water activity

ČSN ISO = Česká technická norma, která zavádí do soustavy českých norem mezinárodní normu ISO

EFSA = European Food Safety Authority

EU = Evropská unie

HACCP = Hazard Analysis and Critical Control Points

IgE = imunoglobulin E

KTJ = kolonie tvořící jednotky

log = dekadický logaritmus

MS = mass spectrometry

neg = negativní

TBX = Tryptone Bile X-Glucuronide

TSA = trypton-sójový agar

13 Samostatné přílohy

Tabulka č. 11: Výsledky všech bakterií ze všech analyzovaných vzorků po dokončení kultivace

Vzorek č. 1	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$5,1 \cdot 10^4$	4,71
Aerobní sporulující	$6,8 \cdot 10^3$	3,83
<i>Bacillus cereus</i>	$6,7 \cdot 10^3$	3,83
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 5	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$2,4 \cdot 10^6$	6,38
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	$2 \cdot 10^2$	2,30
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 2	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$9,3 \cdot 10^5$	5,97
Aerobní sporulující	$2,0 \cdot 10^2$	2,30
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 6	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$7,6 \cdot 10^5$	5,88
Aerobní sporulující	$6 \cdot 10^2$	2,78
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 3	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$6,7 \cdot 10^5$	5,83
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	$4 \cdot 10$	1,60
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 7	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	$2,7 \cdot 10^2$	2,43
Mezofilní aerobní	$1,5 \cdot 10^6$	6,18
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 4	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	$1 \cdot 10$	1,00
Mezofilní aerobní	$2,4 \cdot 10^6$	6,38
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	$2 \cdot 10^2$	2,30
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 8	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísně	$7 \cdot 10^2$	2,85
Mezofilní aerobní	$1,6 \cdot 10^5$	5,20
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

* neg. = negativní

Vzorek č. 9	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$1,2 \cdot 10^5$	5,08
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 13	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	$3 \cdot 10^2$	2,48
Mezofilní aerobní	$6,2 \cdot 10^6$	6,79
Aerobní sporulující	$3,4 \cdot 10^3$	3,53
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 10	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$4 \cdot 10^3$	3,60
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 14	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$8,6 \cdot 10^7$	7,94
Aerobní sporulující	$3,8 \cdot 10^4$	4,58
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 11	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$2,4 \cdot 10^7$	7,38
Aerobní sporulující	$9 \cdot 10^3$	3,95
<i>Bacillus cereus</i>	$9 \cdot 10^3$	3,95
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 15	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$1,2 \cdot 10^7$	7,08
Aerobní sporulující	$2,5 \cdot 10^3$	3,40
<i>Bacillus cereus</i>	$1 \cdot 10$	1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 12	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	<1,00	<1,00
Mezofilní aerobní	$5 \cdot 10^7$	7,70
Aerobní sporulující	$4,9 \cdot 10^3$	3,70
<i>Bacillus cereus</i>	$1,5 \cdot 10^4$	4,18
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 16	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	$7,2 \cdot 10^2$	2,86
Mezofilní aerobní	$1,2 \cdot 10^7$	7,08
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

* neg. = negativní

Vzorek č. 18	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	$5,5 \cdot 10^2$	2,74
Mezofilní aerobní	$6,7 \cdot 10^6$	6,83
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg	neg

Vzorek č. 19	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	$1,6 \cdot 10^3$	3,20
Mezofilní aerobní	$6,7 \cdot 10^6$	6,83
Aerobní sporulující	<1,00	<1,00
<i>Bacillus cereus</i>	<1,00	<1,00
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

Vzorek č. 20	KTJ/g	log
<i>Enterobacteriaceae</i>	<1,00	<1,00
<i>E. coli</i>	<1,00	<1,00
<i>St. aureus</i>	<1,00	<1,00
Kvasinky a plísňe	$1 \cdot 10^2$	2,00
Mezofilní aerobní	<1,00	<1,00
Aerobní sporulující	$2 \cdot 10^3$	3,30
<i>Bacillus cereus</i>	$5 \cdot 10$	1,70
<i>Salmonella</i> spp.	neg.	neg.

* neg. = negativní