

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

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

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Seidlerová

Obor: Výživa a potraviny

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

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 25. dubna 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala panu Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za odbornou pomoc při vedení práce, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala členům Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky, že mi umožnili realizovat experimentální část této diplomové práce.

Účinky hmyzího chitinu na bifidobakterie a jeho význam jako prebiotika

Souhrn

Předpokládá se, že do roku 2050 se populace navýší na bezmála 9 miliard lidí a spolu s tím stoupne až o 70 % poptávka po bílkovinách živočišného původu. Aktuální stav produkce potravin je za těchto podmínek neudržitelný, a proto se v současné době hledají alternativní potravinářské směry, které přicházející poptávku uspokojí. Jedním z alternativních zdrojů potravy je entomofagie neboli konzumace jedlého hmyzu. Jedlý hmyz je obecně bohatý na bílkoviny a tuky. Hmyz je ovšem kromě toho také velmi dobrým zdrojem chitinu. Průměrně je hmyz tvořen z 10 % chitinem, který je pro člověka nestravitelný, může však působit prebioticky na střevní mikrobiom.

Cílem diplomové práce bylo zjistit, jak chitin v těle jedlého hmyzu může ovlivňovat *in vitro* růst bifidobakterií a mít tak prebiotický účinek. Pro tuto práci jsme vybrali tři hmyzí moučky: larvy potěmníka moučného (*Tenebrio molitor*), švába obecného (*Blatta orientalis*), a cvrčka domácího (*Acheta domestica*), z nichž byl vytvořen bujón, který sloužil jako kultivační médium pro námi zvolené probiotické bifidobakteriální kmeny: *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (DSM 20 438), *B. breve* (ATCC 15 700), *B. adolescentis* (DSM 20 083), *B. longum* (ATCC 15 707), *B. animalis* (DSM 10 140) a *B. bifidum* (DSM 20 082).

Pro samotné hodnocení schopnosti bifidobakterií využívat hmyzí moučku jsme zvolili tři zkoušky. První hodnocení proběhlo pomocí plotnové metody na Petriho miskách za pomoci decimálního ředění. Dále byla stanovena absorbance pomocí optické denzity kultivačních médií s bifidobakteriemi. Posledním testováním bylo stanovení růstových křivek bifidobakterií.

Výsledky testů ukázaly, že námi zvolené bifidobakteriální kmeny se dokázaly nejlépe kultivovat na Wilkins-Chalgren s přidavkem sojového peptonu, který sloužil jako ideální médium pro růst bifidobakterií. U hmyzích mouček nebyl zaznamenán žádný prebiotický efekt a nárůst na jednotlivých hmyzích moučkách se od sebe příliš nelišil. Naše prvotní hypotéza tak nebyla potvrzena.

Získané hodnoty ukazují, že hmyzí moučka, jejíž hlavní součástí je chitin, nedokáže působit prebioticky jako jediný zdroj uhlíku. Dále jsme zjistili, že hmyzí moučka neinhibuje bifidobakteriální kulturu a jako potrava budoucnosti nebude narušovat bifidobakteriální společenství střev.

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

Effect of insect chitin on bifidobacteria and function like prebiotikum

Summary

The population is expected to increase to almost 9 billion people in 2050, and together the demand for animal protein will increase by up to 70 %. Under these conditions the current state is unsustainable, when it comes to food production. Therefore alternative food routes that would satisfy the incoming demand are currently being sought. One alternative is entomophagy – the practice of eating insects, especially by people. Edible insects are generally rich in proteins and fats. Insects are the same and also a very good source of chitin. On average, insects are made up of 10% chitin, which is indigestible to humans and can have a prebiotic effect on the intestinal microbiome.

The aim of the diploma thesis was to find out how chitin in the body of edible insects can affect the growth of bifidobacteria *in vitro* and thus have a prebiotic effect. For this work, we selected three insect meal: larvae of mealworms (*Tenebrio molitor*), cockroach (*Blatta orientalis*) and domestic cricket (*Acheta domesticus*). Based on the fact that a broth was created as a culture medium for our chosen probiotic bifidobacterial strains: *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (DSM 20 438), *B. breve* (ATCC 15 700), *B. adolescentis* (DSM 20 083), *B. longum* (ATCC 15 707), *B. animalis* (DSM 10 140) and *B. bifidum* (DSM 20 082).

To create an evaluation of the ability of bifidobacteria to perform insect meal, we chose three tests. The first evaluation was performed by using plate methods on a Petri dish with the help of decimal dilution, and the absorbance was determined by using the optical density of culture media with bifidobacteria. The last test was to determine the growth curves of bifidobacteria.

The results of the tests show that the selected bifidobacterial strains were the best cultured on Wilkins-Chalgren with the addition of soy peptone, which serves as a medium for the growth of bifidobacteria. No prebiotic effect was found in insect flours and individual insect flours did not differ much from each other. Our initial hypothesis may not be confirmed.

The obtained data shows that chitin cannot act prebiotically as the only carbon source. We have also found that insect meal does not inhibit bifidobacterial culture and as a food of the future will not disrupt the bifidobacterial intestinal community.

Keywords: Bifidobacteria; insect; chitin; prebiotics; probiotics

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Jedlý hmyz	9
3.1.1 Entomofagie jako udržitelný zdroj potravy	9
3.1.2 Jedlý hmyz ve světě a v České republice.....	11
3.1.3 Druhy jedlého hmyzu	12
3.1.4 Chemické složení hmyzu a jeho nutriční hodnota	14
3.2 Chitin	16
3.2.1 Metabolismus chitinu.....	18
3.2.2 Chitin jako prebiotikum.....	19
3.3 Gatsrointestinální trakt	20
3.4 Mikrobiom lidských střev	21
3.4.1 Probiotika.....	24
3.4.2 Rod <i>Bifidobacterium spp.</i>	25
3.4.3 Prebiotika.....	27
4 Materiál a metodika	30
4.1 Materiál	30
4.2 Metodika	30
4.2.1 Stanovení čistoty kultur	30
4.2.2 Příprava hmyzu	31
4.2.3 Testování růstu bifidobakterií.....	31
4.2.4 Statistické vyhodnocení	33
5 Výsledky	34
5.1 Identifikace bifidobakterií	34
5.2 Růst bifidobakterií v médiu s hmyzí moučkou	35
6 Diskuze	39
7 Závěr	42
8 Literatura	43
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	52

1 Úvod

V současnosti je většina západní společnosti navyklá na dostatek většiny dostupných zdrojů, věcí a potravin. S výhledem na budoucnost a s rostoucí světovou populací, která se v roce 2050 předpokládá okolo 9 miliard lidí, což představuje téměř 50 % přírůstek populace, však začne být nedostatek dostupných potravin. Tento nedostatek je v současnosti již patrný v zemích třetího světa. S takto rostoucí populací bude vyvíjen tlak na všechny, ale zejména na potravinářský systém, který bude muset uživit celou populaci. Z tohoto důvodu v současnosti sílí zájem o udržitelné potravinářské systémy, tak aby již nyní mohla být tato poptávka uspokojena a v budoucnu nedocházelo k výraznému nedostatku. Jedním z takových opatření může být entomofagie, neboli konzumace hmyzu.

Přestože se tento potravinářský směr neseťkává v západním světě s oblibou. Entomofagie je běžnou součástí mnoha tradičních pokrmů, a to zejména v asijském regionu, kde jedlý hmyz slouží jako relativně levný a bohatý zdroj proteinů. V porovnání s hospodářskými zvířaty, je zde výrazně nižší spotřeba krmiv a vody na produkci 1 kg jedlého hmyzu a tím i nižší produkce CO₂.

Mimo bohatého zdroje proteinu je hmyz i významným zdrojem chytinu, který může mít i prebiotický potenciál pro lidský střevní mikrobiom.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

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

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

3 Literární rešerše

3.1 Jedlý hmyz

Lidstvo konzumuje hmyz po tisíciletí. V historii se jednalo o jednoduchý způsob obstarání potravy, který byl výživný a chutný (FAO 2010). V současné době se používá termín „entomofagie“, vyjadřující proces konzumace hmyzu jako potravy (Gahukar 2011). Toto slovo pochází ze starořeckého entomos „hmyz“ a fagos „k jídlu“ (Boudot & Courtioux 2021).

Biomasa hmyzu je v mnohých ekosystémech vysoká. Tento fakt vede k závěru, že je hmyz považován za neomezený zdroj potravy a krmiva (Yen 2015a). Hmyz je druhově nejbohatší skupinou živočichů, která zahrnuje 70-95 % všech druhů zvířat (Hodkinson 1992). Není ovšem známo, kolik druhů je potenciálně vhodným krmivem pro zvířata či potravou pro člověka. V současnosti se udává, že lidé konzumují přibližně 2 000 druhů hmyzu z globálně popsanych 1,1 milionu druhů (Yen 2015a).

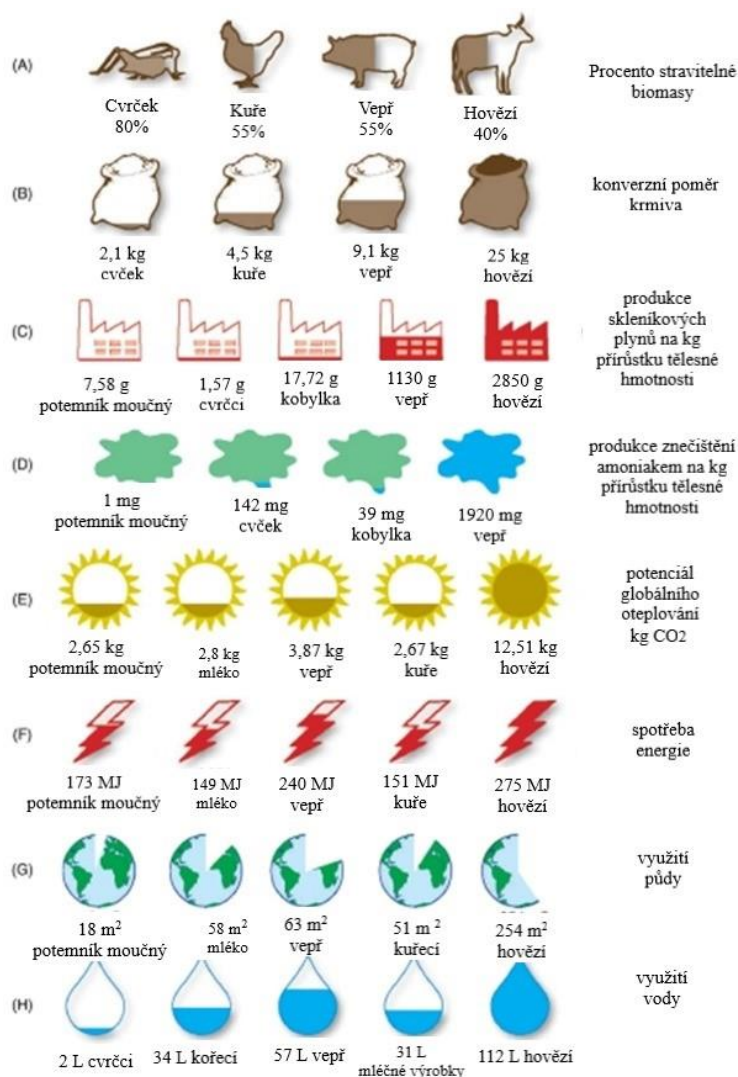
3.1.1 Entomofagie jako udržitelný zdroj potravy

Entomofagie se praktikuje z několika důvodů. Prvním z nich je, že se hmyz přirozeně vyskytuje v lesích a ve vodních zdrojích, čímž se stává lehce dostupným pro každého. Žije ve velkých počtech na jednom místě a je možné ho lehce sbírat. Hmyz lze také snadno chovat a množit. To vše na malém prostoru v krátkém časovém období, díky rychlému životnímu cyklu a vysokému přírůstku biomasy (Oonincx et al. 2010). Více než 92 % jedlého hmyzu je sbíráno z volné přírody. Problém ovšem nastává v případech, když jsou ve velkém sbírány ohrožené druhy hmyzu, jak je tomu například u zástupců druhu *Lepidoptera*, kteří patří mezi hlavní skupiny jedlého hmyzu sbíraného z volné přírody. Díky jejich velkému využití v entomofagii, ale musel být umístěn na Červený seznam IUCN (mezinárodní seznam ochrany přírody) ohrožených druhů zvířat (Yen 2015a). Když se nejedná o ohrožený druh je dostupnost jedlého hmyzu z volné přírody velkým pozitivem. Svým konzumentům nabízí nejen vysokou nutriční hodnotu, ale také četnost ekologických výhod. Tyto výhody spočívají ve zmírnění současného tlaku na globální zajištění potravin, růstu populace a posunu stravovacích preferencí. Další výhodou chovu hmyzu je fakt, že nezpůsobuje tak velké množství skleníkových plynů jako je tomu u živočišné výroby, která produkuje přibližně 14,5 % celkových emisí skleníkových plynů vzniklých lidskou činností (Gerber et al. 2013). Produkce těchto plynů je považována za jednu z hlavních příčin změny klimatu, kterému společnost v současnosti čelí. Kromě toho hospodářská zvířata produkují velké množství amoniaku (NH_3), což vede k nitrifikaci a okyselení půdy (Ramos-Elorduy 2009).

Neopomenutelným pozitivem je, že hmyz spotřebovává mnohem méně energie než běžná hospodářská zvířata. To je dáno tím, že hmyzí organismus funguje poikilotermicky, což znamená, že nevyužívá svůj metabolismus k zahřívání nebo ochlazování těla. Tím je energeticky méně náročný než jiní zástupci živočišné říše (Yen 2009; Premalatha et al. 2011) a konverze krmiva je tím pádem u hmyzu mnohem více efektivní (obr. 1). Hmyz má průměr konverze krmiva (FCR) 0,9 – 1,5. Pro porovnání s hospodářskými zvířaty: kuřata 2,5 FCR, vepř 5 FCR a skot 10 FCR (Smil 2002). Celkově tedy platí, že přeměna biomasy krmiva na bílkovinu nebo kalorie je u hmyzu více efektivní než u hospodářských zvířat (Huis 2013). Dalším faktorem efektivnosti hmyzu je i vyšší reprodukce a rychlost dosahování pohlavní zralosti, která se pohybuje spíše ve dnech, a ne v měsících či letech, jak je tomu u hospodářských zvířat. Když vezmeme spojení FCR a rychlost reprodukce hmyzu jedná se o 11× efektivnější proces produkce bílkovin oproti skotu. Dále pak chov hmyzu vyžaduje mnohem menší prostor pro život a nezpůsobuje takové znečištění jako hospodářská zvířata (Oonincx et al. 2010).

V neposlední řadě je potřeba zvážit skutečnost, že v roce 2050 by se světová populace měla navýšit o třetinu, a tak překročit 9 miliard lidí na planetě. V současnosti trpí hladem

přibližně 1 miliarda lidí. Aby nedocházelo k navyšování hladovění Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů (FAO) odhaduje, že bude zapotřebí zvýšit celostetovou produkci potravin o 60 % oproti aktuálnímu stavu. Již v současné době je znatelný tlak na potravinové zdroje, jelikož za posledních 50 let vzrostla poptávka po potravinách o 50 % (Beddington 2010; Gahukar 2011; Hanboonsong et al. 2013). Jedním z řešení by bylo navýšení orné půdy a pastvin, což ovšem přichází na jedné straně do konfliktu s nutností udržovat lesy a na straně druhé s tlakem urbanizace. Rostoucí zájem o půdu vede k tomu, že produkce masa z hospodářských zvířat je čím dál méně udržitelná. Ať už z pohledu prostoru pro chov nebo pro pěstování plodin, kterými jsou hospodářská zvířata krmena. Roste také využití krmiva pro výrobu energie z biomasy. Jedním z možných způsobů, jak tento problém obejít, je rozšířit entomofagii (Premalatha et al. 2011). Hmyz v současnosti nabízí několik výhod a zároveň je extrémně bohatý na bílkoviny, vitamíny a minerály (Nakagaki & Defoliart 1991; Hanboonsong et al. 2013).



Obrázek 1: Využití zdrojů a parametry dopadu chovu hmyzu na životní prostředí ve srovnání s hospodářskými zvířaty. (A) Procento stravitelné biomasy, (B) konverzní poměr krmiva (Huis 2013), (C) produkce skleníkových plynů na kg přírůstku tělesné hmotnosti, (D) produkce znečištění amoniakem na kg přírůstku tělesné hmotnosti (Ooninx et al. 2010), (E) potenciál globálního oteplování (Ooninx & de Boer 2012), (F) spotřeba energie (Huis 2013), (G) využití půdy (Ooninx & de Boer 2012), (H) využitelnost vody (Huis 2013). Upraveno podle (Gahukar 2016).

3.1.2 Jedlý hmyz ve světě a v České republice

V současnosti může být na entomofagii pohlíženo z několika úhlů pohledu. Prvním z nich je každodenní způsob obživy. To se ovšem týká pouze částí Latinské Ameriky, Asie a Afriky. V Evropě a Severní Americe může být na jedlý hmyz nahlíženo jako na staromódní či špinavý způsob stravy. Na druhou stranu se v těchto západních zemích může jednat o určitou vizitku luxusu a originality. Jinde se na jedlý hmyz pohlíží jako na pokrm, který může pomoci v environmentálních problémech a udržitelnosti. Díky vysokému obsahu bílkovin a dalších živin jde o možnou náhradu živočišných bílkovin. Navzájem se tyto úhly prolínají a moderní populace je k tomuto způsobu stravy stále otevřenější (FAO 2010; Looy et al. 2014).

Celosvětově je okolo 1 700 až 2 086 druhů jedlého hmyzu, který konzumuje až na 3 071 etnických skupin, žijících v 130 zemích, přičemž africký, jiho-americký a asijský kontinent jsou nejvíce entomofagickými (Ramos-Elorduy 2009; Yen 2015a). Spojením kulturních a náboženských praktik se těmito populacím podařilo integrovat různé druhy hmyzu do svých tradičních pokrmů. Předáváním informací o jedlém hmyzu po několik generací si tyto etniky našly hmyz, který má skvělé chuťové vlastosti a vysokou nutriční hodnotu. Entomofagie jim tak umožňuje doplnit stravu, která bývá často neplnohodnotná a nevyvážená (Boudot & Courtioux 2021). Mezi 80 % nejvíce konzumovaných druhů hmyzu patří brouci (*Coleoptera*), blanokřídlí (*Hymenoptera*), rovnokřídlí (*Orthoptera*) a motýli (*Lepidoptera*) (Ramos-Elorduy 2009; Yen 2015; Boudot & Courtioux 2021). Konzumované druhy jsou závislé jak na geografických podmínkách, tak na ročním období či vývojové fázi hmyzu (Huis 2003).

V každé části světa je oblíbený jiný druh hmyzu. V Africe byl sestaven seznam přibližně 250 jedlých druhů hmyzu. Z toho 30 % tvoří *Lepidoptera*, 29 % *Orthoptera*, 19 % *Coleoptera* a zbylých 22 % zahrnuje *Isoptera*, *Homoptera*, *Hymenoptera*, *Heteroptera*, *Diptera* a *Odonota* (Huis 2003). V Thajsku je za nejoblíbenější jedlý hmyz sbíraný ve volné přírodě považován mravenec tkadlec (*Oecophylla langinoda*), bambusový červ (*Omphisa fuscidentalis*) a sarančata (*Caelifera*). Nejvíce farmově chovaní jsou zde však cvčci a larvy nosatce palmového (*Rhynchophorus ferrugineus*). Thajsko je velmi expanzivní v chovu hmyzu, v roce 2013 zde existovalo přibližně 20 000 hmyzích farem a celková produkce zde mezi lety 1996-2011 činila v průměru okolo 7 500 tun hmyzu ročně. Místní farmy chovají šváby nebo cvrčky, kteří umožňují chov na malé ploše za krátký čas. Hmyz je pak prodáván za atraktivní cenu, například chov cvrčků vyjde pouze na 1 euro měsíčně a přináší zisk 1 000 eur (Hanboonsong et al. 2013; Boudot & Courtioux 2021). V Jižní Americe, zejména v mexické oblasti Oaxaca, jsou součástí místní stravy zástupci řádu rovnokřídlých obzvláště rod *Sphenarium* spp. (Huis et al. 2013).

Oproti tomu ochota západních spotřebitelů zavádět do své stravy hmyz či bílkoviny pocházející z hmyzu je obecně nízká. Na potraviny založené na bázi hmyzu se pohlíží skepticky a s nechutí (Vanhonacker et al. 2013). Z psychologického hlediska je hluboce zakořeněný pohled na hmyz jako na špinavý, nechutný a nebezpečný (Looy et al. 2014). Studie House (2016) zaměřená na akceptaci potravy na bázi hmyzu, došla k poznatku, že uváděné počáteční motivace pro zkoušení potravin z hmyzu se podstatně liší od skutečnosti. I když respondenti nazačátku studie projevovali nadšení z hmyzích produktů, tak se jim ovšem nepodařilo tyto produkty začlenit do každodenního jídelníčku. Většina hlavních faktorů ovlivňujících opakovanou konzumaci byla zejména praktická a souvisela s rutinní konzumací konvenčnějších potravin. Dalšími stěžejními faktory byla cena, chuť, dostupnost produktů a jejich stupeň souladu se zavedenými stravovacími postupy, včetně přizpůsobení preferencí jiných lidí. Stejná studie ovšem uvádí i poznatek, že lidé nemají problém přijímat hmyzí protein jako nenápadnou potravinářskou přísadu. Z čehož může vycházet fakt, že se v poslední době stalo moderním přidávání moučky z hmyzu do některých tradičních a oblíbených potravin, jako jsou těstoviny, tortilly, vepřová paštika a masové kuličky (Smarzyński et al. 2019; Mancini et al. 2019). Největším potenciálem pro Evropu a Severní Ameriku, co se týče konzumace hmyzu je

v oblasti potravinových doplňků, zpracovaných potravin a krmiv pro zvířata (Cerritos 2009). Zákodárci Evropské unie na nový trend přidávání hmyzu do potravin reagovali v roce 2018, kdy byl hmyz zahrnut do nařízení o nových potravinách (EU) 2015/2283 (Mancini et al. 2019).

Česká republika (ČR) v tomto odvětví nezůstává pozadu. Byl proveden výzkum zaměřený na hledání vhodných druhů hmyzu pro entomofagii v ČR. Vybrané druhy byly hodnoceny z pohledu vhodnosti druhu k výživě, senzoričských vlastností, způsobu chovu, zpracování a vlastní postoj respondentů ke konzumovaným druhům. Dotazníky prokázaly, že pro český trh jsou vhodné následující druhy:

1. larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)
2. larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*)
3. larvy potemníka brazilského (*Zophobas morio*)
4. nymfy sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*)
5. plod včely medonosné (*Apis mellifera*)
6. nymfy cvrčka banánového (*Gryllus assimilli*)
7. kukly bource morušového (*Bombyx mori*)

Respondenti byli nejvíce ochotni konzumovat plod včely medonosné, ale po zvážení dalších faktorů, jako je například obtížnost chovu, se tento druh hmyzu umístil až na pátém místě. Švábi byli dotazovanými hodnoceni velmi záporně a u tohoto druhu nebyly provedeny další analýzy (Bednářová et al. 2013). Tento poznatek byl potvrzen i v jiné studii Kulma et al. (2020b), kde švábi byli nejméně oblíbenou volbou českých hodnotitelů. Co se týče kukly bource morušového, který je z pohledu výživy celosvětově hodnocen velmi kladně, pro Čechy je tento druh nejméně přijatelný, nejspíše z důvodu masitosti. Senzoricky nejlépe hodnoceným byl potemník moučný, cvrček banánový a potemník brazilský. Pozitivem je, že všechny tyto druhy jsou chovány v České republice a není třeba je dovážet ze zahraničí (Bednářová et al. 2013). Přestože je zákazník v České republice v současné době dostatečně informován o jedlém hmyzu z festivalů, televizních pořadů nebo článků v časopisech, je zde stále k entomofagii pocíťován značný ostych. Preferovány jsou spíše výrobky, ve kterých je hmyz ve skryté formě. Jak muži, tak ženy, bez problémů přijali, takovýto druh výrobků i když byli předem informováni, že mouka, z které je výrobek připraven je hmyzího původu. Výsledky ukazují, že spotřebitelé v České republice nemají problém konzumovat produkty z jedlého hmyzu, zejména pokud si mohou zvolit formu produktu a druh hmyzu ze kterého je výrobek vyrobený (Adámek et al. 2020). Podobné výsledky ukázala i studie Kulma et al. (2020b), u které se došlo k závěru, že z pohledu preference čeští občané, dávají přednost mletému hmyzu nebo hmyzí moučce. Pokud jde o konzumaci celého hmyzu, nejlépe hodnoceným hmyzem byly cvrčci, sarančata a kobylinky. Ze sociodemografického hlediska byly odpovědi významně ovlivněny věkem a pohlavím. Mladší lidé a muži uváděli pozitivnější postoje k entomofagii než starší lidé a ženy.

3.1.3 Druhy jedlého hmyzu

Lepidoptera

Motýli a můry (*Lepidoptera*), jsou entomofagickým hmyzem, který je oblíbený v mnoha zemích. Někdy může být využíván i jako lék. Řadíme sem téměř 400 druhů jedlého hmyzu (Yen 2015b). Z tohoto řádu jsou konzumováni denní i noční motýli a to nejčastěji ve vývojovém stádiu housenky (Bukkens 1997).

Velmi oblíbenými ve světě jsou kukly bource morušového (*Bombyx mori*) (Gahukar 2011). Bourec je výživný hmyz, díky jeho vysokému podílu bílkovin (52,62 g na 100 g sušiny) a tuků (29,36 g na 100 g sušiny). Dostupný je ovšem pouze v omezené části roku, z důvodu krmení listy moruše, které nerostou celoročně.

Dalším oblíbeným zástupcem z řád *Lepidoptera*, který byl hodnocen ve výzkumu Bednářová et al. (2013), byla housenka zavíječe voskového (*Galleria mellonella*), která obsahovala vysoký obsah tuku (31,24 g na 100 g sušiny) a bílkovin (60,43 g na 100 g sušiny).

Je dobrým zdrojem olejové (18: 1) a palmitové (16: 0) mastné kyseliny. Sensoricky byl hodnocen pozitivně, negativně byla hodnocena především náročnost chovu.

Zajímavostí této čeledi je, že může být využívána i v medicíně. Larvy můr a motýlů jsou napadány housenicí čínskou (*Ophiocordyceps sinensis*), která patří mezi parazitické houby využívané v tradiční čínské medicíně (Shrestha et al. 2010). Larvy napadené housenicí jsou v asijských zemích podávány při nemocích k dodání síly nebo jako doplněk stravy sportovcům (Cannon et al. 2009).

Orthoptera

Rovnokřídlí (*Orthoptera*), tento řád zahrnuje sarančata (*Caelifera*) a kobylky (*Ensifera*) mezi které jsou řazeni cvrčci (*Grylloidea*). Tento řád je v entomofagii velmi populární. Je zde i poměrně rozdíl v obsahu nutričních látek v závislosti na druhu (Bukkens 1997).

Nymfy sarančete stěhovavého (*Locusta migratoria*), jsou nízkokalorickým zdrojem potravin (364,74 kcal na 100 g sušiny), díky jejich poměrně dobrému obsahu bílkovin (41 - 62,21 g na 100 g sušiny) a nízkému obsahu tuku (12,61 g na 100 g sušiny). Dále je dobrým zdrojem linolové (18: 2) a glutamové kyseliny. V sensorickém hodnocení jsou posuzovány velmi dobře obzvláště z důvodu jejich křupavosti (Bednárová et al. 2013).

V entomofagii je velmi oblíbený cvrček domácí (*Acheta domestica*). Cvrčci jsou obecně bohatí na obsah bílkovin, který může dosáhnout až 70 g na 100 g sušiny a jejich hladina lipidů se obvykle pohybuje pod 20 g na 100 g sušiny. Obsah nutričních hodnot je ovšem z určité míry závislý na vývojové fázi, typu chovu hmyzu a pohlaví (Kouřimská & Adámková 2016; Kulma et al. 2019; Montowska et al. 2019). Samice prokazují vyšší energetickou hodnotu, což je ovlivněno podstatně vyšším obsahem lipidů a menším zastoupením bílkovin oproti samcům (Kulma et al. 2019).

Coleoptera

Hlavním zástupcem brouků (*Coleoptera*), z pohledu entomofagie je nosatec palmový (*Rhynchophorus ferrugineus*). U něhož jsou konzumovány především larvy (Bukkens 1997). Larvy nosatce palmového, jsou chovány hlavně v jihovýchodním Thajsku z důvodu hojného výskytu cykasu japonského (*Cycas revoluta*), který je hlavním zdrojem potravy tohoto brouka (Hanboonsong et al. 2013).

Významným zástupcem je potěmník moučný (*Tenebrio molitor*), jehož larvy jsou dobrým zdrojem linolové kyseliny (18: 2), která je jednou z esenciálních mastných kyselin. Obsahuje 50,86 g bílkovin na 100 g sušiny a 36,10 g tuku na 100 g sušiny. Sensoricky je hodnocen jako vynikající ať už po stránce konzistence a chuti tak vzhledově. Lidem nedělá problém larvy tohoto brouka konzumovat jen v tepelně upravené formě a není potřeba je maskovat či mlýt (Bednárová et al. 2013). *T. molitor* je díky snadnému chovu, krátkému životnímu cyklu, poměrně dobrému podílu esenciálních aminokyselin a vysoké nutriční hodnotě potenciálním zdrojem živočišných bílkovin pro astronauty. *T. molitor* je jedním ze zvířecích kandidátů na systém podpory bioregenerativního života ve vesmíru, kde jde o využití nevyužití rostlinné biomasy ke krmení zvířat a poskytnout astronautům živočišné bílkoviny (Li et al. 2013, 2015).

Dalším zástupcem jsou larvy potěmníka brazilského (*Zophobas morio*), který má nízký obsah vlhkosti 59,47 %, což při zpracování může vést ke značné úspoře energie, především pak při sušení. Úroveň živin je spíše průměrná, obsah bílkovin je 54,25 g na 100 g sušiny a tuku je 40,26 g na 100 g sušiny s vyšším obsahem esenciální mastné olejové kyseliny (18: 1) (Bednárová et al. 2013).

Hymenoptera

Do řádu Blanokřídlých (*Hymenoptera*) z hlediska entomofagie řadíme hlavně čeled' mravencovití (*Formicidae*) a včelovití (*Apidae*). Obsah bílkovin se v čeledi mravencovitých pohybuje v závislosti na druhu. U afrických druhů je obsah 7,5 - 25 g na 100 g sušiny a u kolumbijských druhů 42 - 52 g na 100 g sušiny (Bukkens 1997).

Včely jsou oblíbené nejen díky ceněnému medu a vedlejším produktům, ale některé národnosti jejich larvy využívají jako pochutinu. Výsledky práce Ghosh et al. (2016) ukazují, že u larev přecházející do fáze imago, dochází ke snižování sacharidů z 46,1 % na 30,6 % a tuků z 14,5 % na 6,9 %, zatímco množství bílkovin se zvyšuje z 35,3 % na 51 %. Díky vysokému obsahu bílkovin ve všech vývojových stádiích by včely mohly být ideální potravinou. Napovídá tomu i vyvážené složení nasycených a mono-nenasycených mastných kyselin, a významné množství železa a zinku (Bednářová et al. 2013).

3.1.4 Chemické složení hmyzu a jeho nutriční hodnota

Jednotlivé druhy jedlého hmyzu se od sebe liší velmi rozmanitou energetickou hodnotou (tab. 1) (Payne et al. 2016; Kulma et al. 2020a).

Tabulka 1: Přehled energetické hodnoty vybraných druhů jedlého hmyzu (Huis et al. 2013).

Český název	Latinský název	Vývojová fáze	Energetická hodnota hodnota (kcal / 100g)
Saranče tlusté	<i>Chortoicetes terminifera</i>	Dospělec	499
Mravenec tkadlec	<i>Oecophylla smaragdina</i>	Dospělec	1272
Potemník moučný	<i>Tenebrio molitor</i>	Larva	206
Potemník moučný	<i>Tenebrio molitor</i>	Dospělec	138
Mexický mravenec	<i>Atta mexicana</i>	Dospělec	404
Cvrček dvojskvrnný	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Dospělec	120
Japonská kobylka	<i>Oxya japonica</i>	Dospělec	149
Kobylka hnědá	<i>Cyrtacanthacris tatarica</i>	Dospělec	89
Bourec morušový	<i>Bombyx mori</i>	Kukla	94
Saranče stěhovavé	<i>Locusta migratoria</i>	Dospělec	179

Nutriční hodnota je do značné míry hodně podobná masu zvířat a ryb (Huis 2003), někdy mohou mít hmyzí potraviny dokonce vyšší obsah energie, sodíku a nasycených tuků než maso běžných hospodářských zvířat (Payne et al. 2016). Energetická hodnota jedlého hmyzu závisí na jeho složení a zejména na obsahu tuku. Co se týče vývojového stádia, larvy nebo kukly jsou obvykle energeticky bohatší ve srovnání s dospělými jedinci (Smit et al. 2004; Bednářová et al. 2013; Kulma et al. 2020a).

Druhy s nízkou energetickou hodnotou, mají obecně vyšší obsah bílkovin (Smit et al. 2004). Vysoký obsah bílkovin mají zástupci řádu rovnokřídlých. Saranče stěhovavé ze studie Bednářová et al. (2013) obsahovalo 62,21 g na 100 g sušiny, což byl nejvyšší obsah ze sledovaných druhů v této studii (tab. 2). Jiná studie Hyun et al. (2012) provedla analýzu na *Oxya chinensis formosana*, řadící se také do řádu rovnokřídlých. Obsah bílkovin v sušeném podílu byl přibližně 72,01 %, což je více než obsah u proteinu u živočišných produktů, jako je hovězí maso (steak 17,5 %, libové maso 20,0 %), vepřové maso (steak 14,1 %, libové maso 17,8 %) a kuřecí maso (libové maso 19,8 %, stehno 20,6 %). Takto vysoké hodnoty ovšem mohou být na jednu stranu zkreslené. Jelikož výpočty proteinu jsou prováděné pomocí Kjeldahlovy metody, která počítá s obsahem dusíkatých látek a nebere v potaz množství kutikuly, která je primárně složena z chitinu a N-acetylglukosaminu (Adi & Martinez 2017). Důležitým faktorem při hodnocení kvality bílkovin je složení esenciálních aminokyselin (EAA). Obecně jsou hodnoty EAA hmyzu srovnatelné s bílkovinou sóji. Když se však

porovnají EAA hmyzu s EAA živočišných bílkovin například kaseinu je hodnota EAA hmyz nižší (tab. 3) (Yi et al. 2013). Dalším faktorem určujícím kvalitu bílkovin jsou limitující aminokyseliny. Těmi jsou v jedlém hmyzu především tryptofan, lysin, leucin a aminokyseliny obsahující síru a to methionin a cystein. Záleží však především na druhu hmyzu (Bukkens 1997; Finke 2013; Köhler et al. 2019).

Tabulka 2: Obsah bílkovin v sušině jedlého hmyzu (Bednářová et al. 2013; Kulma et al. 2019, 2020a).

Český název	Latinský název	Vývojová fáze	Obsah proteinu (% v sušině)
Bourec morušový	<i>Bombyx mori</i>	Kukla	53
Včela medonosná	<i>Apis mellifera</i>	Včelí plod	54
Saranče stěhovavé	<i>Locusta migratoria</i>	Nymfa	62
Zavíječ voskový	<i>Galleria mellonella</i>	Housenka	38
Cvrček banánový	<i>Gryllus assimilis</i>	Nymfa	59
Potemník moučný	<i>Tenebrio molitor</i>	Larva	51
Potemník brazilský	<i>Zophobas atratus</i>	Larva	54
Cvrček domácí	<i>Acheta domestica</i>	Dospělec	63
Šváb smrtihlav	<i>Blaberus craniifer</i>	Dospělec	67

Tabulka 3: Předled EAA obsažených v pěti druzích hmyzu (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domestica* a *Blaptica dubia*), kaseinu a sójového proteinu (Yi et al. 2013).

Jednotka (mg / g dusíkatých látek)	A. <i>diaperinus</i>	T. <i>Molitor</i>	Z. <i>Moritor</i>	A. <i>domesticus</i>	B. <i>Dubia</i>	Kasein	Sójové boby
Histidin	34	29	31	21	23	32	25
Isoleucin	43	43	46	36	31	54	47
Leucin	66	73	71	66	56	95	85
Lysin	61	54	54	53	43	85	63
Methionin + cystein	26	26	24	25	23	35	24
Fenylalanin + tyrosin	120	100	111	92	93	111	97
Threonin	39	39	40	35	32	42	38
Tryptofan	12	12	14	9	8	14	11
Valine	58	61	63	55	52	63	49
Součet EAA	459	437	454	392	361	531	439

Energetická hodnota je nejvíce ovlivněna množstvím lipidů. Ty jsou pro organismus zdrojem energie a esenciálních mastných kyselin (Smit et al. 2004). Obsah lipidů v hmyzu se pohybuje od méně než 10 % do více než 30 % na 100 g čisté hmotnosti. To potvrzuje studie Finke (2013) zaměřená na porovnání čtyř druhů hmyzu. Rozsah tuku v této práci byl mezi 1,9 a 29,4 %. Nejvyšší obsah tuku mají housenky (Tzompa-Sosa et al. 2014), kde v některých případech může být zastoupení tuku až 50 g na 100 g sušiny (tab. 4) (Bukkens 1997; Kouřimská & Adámková 2016).

Tabulka 4: Obsah tuku v sušině jedlého hmyzu (Bednářová et al. 2013; Kulma et al. 2019, 2020a).

Český název	Latinský název	Vývojová fáze	Obsah tuku (% v sušině)
Bourec morušový	<i>Bombyx mori</i>	Kukla	29
Včela medonosná	<i>Apis mellifera</i>	Včelí plod	31
Saranče stěhovavé	<i>Locusta migratoria</i>	Nymfa	13
Zavíječ voskový	<i>Galleria mellonella</i>	Housenka	57
Cvrček banánový	<i>Gryllus assimilis</i>	Nymfa	34
Potemník mooučný	<i>Tenebrio molitor</i>	Larva	36
Potemník brazilský	<i>Zophobas atratus</i>	Larva	40
Cvrček domácí	<i>Acheta domestica</i>	Dospělec	16
Šváb smrtihlav	<i>Blaberus craniifer</i>	Dospělec	24

Hmyz má v relativně vysokých hodnotách zastoupenou olejovou (18: 1), linolovou (18: 2) a alfa-linolenovou (18: 3) kyselinu (tab. 5) (Tzompa-Sosa et al. 2014). Co se týče poměru nasycených (SFA) a nenasycených mastných kyselin (MUFA). Více zastoupenými jsou MUFA. Tento fakt potvrzuje i to, že převládající mastnou kyselinou (FA) je olejová kyselina, patřící mezi MUFA (Rumpold & Schlüter 2013). U *Oxya chinensis formosana* je celkové množství tuku je 9,02 g na 100 g sušiny, přičemž obsah MUFA je 71–74 % a SFA je 26–29 % (Hyun et al. 2012). Pro porovnání s jinými druhy je obsah SFA v rozmezí od 30,83 % u *Hymenoptera* a do 41,97 % u *Isoptera* (Rumpold & Schlüter 2013) Dalším aspektem sledujícím při posuzování lipidů je obsah cholesterolu. Ze studie Tzompa-Sosa et al. (2014) je zřejmé, že průměrné množství cholesterolu u jedlého hmyzu je nižší než 3,6 %. Tuk je v hmyzu přítomen v několika formách. Triacylglyceroly tvoří asi 80 % tuku. Slouží především jako energetická rezerva pro období vysoké energetické náročnosti, kterou může být delší let. Další důležitou skupinou lipidů jsou fosfolipidy, jejichž obsah je obvykle nižší než 20 %.

Tabulka 5: Obsah mastných kyselin v sušině jedlého hmyzu v g na 100 g sušiny (Bednářová et al. 2013).

Český název	Latinský název	Vývojová fáze	18:0	18:1	18:2	18:3
Bourec morušový	<i>Bombyx mori</i>	Kukla	1,46	2,23	3,17	9,13
Včela medonosná	<i>Apis mellifera</i>	Včelí plod	3,12	5,18	2,16	1,14
Saranče stěhovavé	<i>Locusta migratoria</i>	Nymfa	1,88	2,13	3,55	0,64
Zavíječ voskový	<i>Galleria mellonella</i>	Housenka	0,72	28,91	4,02	0,19
Cvrček banánový	<i>Gryllus assimilis</i>	Nymfa	0,42	3,25	4,92	
Potemník mooučný	<i>Tenebrio molitor</i>	Larva	1,49	11,04	14,58	
Potemník brazilský	<i>Zophobas atratus</i>	Larva	3,09	14,35	7,93	

Jedlý hmyz je zajímavý z pohledu minerálních látek, jako je železo, zinek, draslík, sodík, vápník, fosfor, hořčík, mangan a měď (Huis 2013). Obsah vápníku je dokonce vyšší, než v mase obratlovců, ale ne zas tak vysoký jako v plnotučném mléce (Bukkens 1997). Pro představu obsahu mikronutrientů a vitamínů provedl studii na *Oxya chinensis formosana* (tab. 6) (Hyun et al. 2012).

Tabulka 6: Obsah minerálních látek a vitamínů v *Oxya chinensis formosana* (Hyun et al. 2012).

Minerální látky	Obsah (mg/100g sušiny)	Vitaminy	Obsah (mg/100g sušiny)
Na	115,7	vit. A	/
Fe	6,8	vit. B ₁	0,0478
Ca	84,4	vit. B ₂	0,7421
Mg	84,6	vit. B ₆	2,5076
K	902,5	vit. C	/
Mn	2,2	vit. D	/
P	545,5	niacin	2,02
Z	14,6		
Cu	6,2		

3.2 Chitin

Hmyz obsahuje významné množství nerozpustné (hrubé) vlákniny, která je obsažena především ve formě chitinu (Finke 2007). Chitin je po celulóze druhým nejhojněji zastoupeným polysacharidem na Zemi (Hamid et al. 2013). Je také jedním z nejdůležitějších biopolymerů v přírodě (Merzendorfer & Zimoch 2003). Vyskytuje se ve stěně hub, v mikrofilárním plášti parazitických hlístic a v exoskeletu všech členovců (Finke 2007). Exoskelet je částečně složen z chitinu a sekundárních sacharidů obsahujících dusík. Obsah vlákniny v hmyzu se může

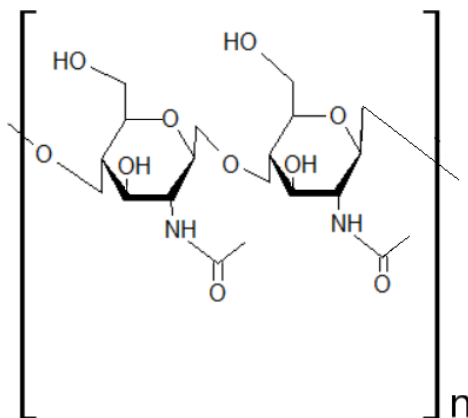
pohybovat v rozmezí 4,9 - 12,1 g na 100 g sušiny (tab. 7) (Bukkens 1997; Finke 2007, 2013). Vlákna obsažená v hmyzu se skládá nejen z chitinu, ale také z významného množství aminokyselin, které představují kutikulární proteiny. Hmyzí exoskelet může být tvrdý nebo měkký. Tvrdost není dána množstvím chitinu, jak se dlouhou dobu myslelo, ale obsahem kutikulárních aminokyselin. Hmyz s jejich vyšším podílem má tvrdší kutikulu, a naopak hmyz s měkčí kutikulou jich má méně (Finke 2007).

Tabulka 7: Obsah nerozpustné vlákniny (Bednářová et al. 2013; Kulma et al. 2019, 2020b).

Český název	Latinský název	Vývojová fáze	Obsah vlákniny (% v sušině)
Bourec morušový	<i>Bombyx mori</i>	Kukla	14
Včela medonosná	<i>Apis mellifera</i>	Včelí plod	11
Saranče stěhovavé	<i>Locusta migratoria</i>	Nymfa	27
Zavíječ voskový	<i>Galleria mellonella</i>	Housenka	21
Cvrček banánový	<i>Gryllus assimilis</i>	Nymfa	8
Potemník mooučný	<i>Tenebrio molitor</i>	Larva	18
Potemník brazilský	<i>Zophobas atratus</i>	Larva	17
Cvrček domácí	<i>Acheta domestica</i>	Dospělec	17
Šváb smrtihlav	<i>Blaberus craniifer</i>	Dospělec	7

Exoskelet u hmyzu funguje jako kostra, podporuje kutikulu epidermis, průdušnice a peritrofické matrice (PM) lemující střevní epitel (Merzendorfer & Zimoch 2003). PM je extracelulární, polopropustný biokompozit, který lemuje střevní část většiny hmyzu. PM má vysoce dynamickou strukturu, která se skládá hlavně z chitinových vláken zasíťovaných proteiny, glykoproteiny a proteoglykany (Liu et al. 2019a). Předpokládá se, že podporuje trávení, poskytuje ochranu před abrazivními částicemi potravy a enterickými patogeny (Agrawal et al. 2014).

Chitin je hlavním polysacharidem v kutikule hmyzu. Je složen z 2- acetamido- 2- deoxy- D- glukózy spojený pomocí β - (1-4) -glykosidovými vazbami (obr. 2) (Kramer et al. 1995).



Obrázek 2: Strukturální vzorec chitinu.

Chitin se vyskytuje ve třech formách α -chitin, β -chitin a γ -chitin. α -Chitin je pevně zhuštěný a polymorfně nejkryštalický typ chitinu. Řetězce jsou zde uspořádány antiparalelně, spojeny silnou vodíkovou vazbou čímž tvoří nejstabilnější formu z tří krystalických variací. Řetězce α -chitinu se nacházejí ve skořápkách krabů, humrů, krevet, členovců a v buněčných stěnách hub. Jedná se také o nejrozšířenější formu chitinu (Jang et al. 2004; Raabe et al. 2006). Většina chitinových nanofibril v PM hmyzu je považována za β -chitin (Liu et al. 2019a), hojně se také vyskytuje v olivních (*Loligo*) (Jang et al. 2004). V β -chitinu jsou řetězce paralelní. Jedná se o krystalický hydrát, kde voda může pronikat mezi řetězce β -chitinu (Mohan et al. 2020). β -chitin je charakterizován slabými mezibuněčnými silami. Vykazuje se vyšší reaktivitou a vyšší afinitou k rozpouštědlům než α -chitin. γ -Chitin je směs α - a β -chitinu se dvěma

paralelními řetězci v jednom směru a třetím ve směru opačném (Raabe et al. 2006). γ -chitin existuje v kokonových vláknech brouka vrtavce zhoubného (*Ptinus fur*) a v žaludku olihně (*Loligo*) (Jang et al. 2004).

Složení i množství chitinu v hmyzu závisí především na druhu a na fázi vývojového cyklu. U cvrčka polního (*Gryllus testaceus*) se obsah chitinu u dospělce pohybuje od 7 do 8,7 % v sušině a u larvy 12 % (Wang et al. 2004; Adámková et al. 2017). Představiteli s vyšším obsahem chitinu jsou například zástupci z řádu *Orthoptera* kde *Oedaleus decorus* obsahuje $16,5 \pm 0,7$ % a *Calliptamus barbarus* dokonce $20,5 \pm 0,7$ % (Kaya et al. 2015). Obsah chitinu je dále ovlivněn množstvím aminokyselin (Longvah et al. 2011).

Hmyzí chitin a chitosan mají široké spektrum biologických aktivit, jako jsou antioxidační a antibakteriální účinky s podstatnými reologickými vlastnostmi, které by mohly být použity v potravinářském průmyslu ke zvýšení bezpečnosti potravin, trvanlivosti a kontroly kvality (Park & Kim 2010; Mohan et al. 2020).

3.2.1 Metabolismus chitinu

Chitin může být degradován speciálními enzymy – tak zvanými chitinázami (Bierbaum et al. 2005; Madan et al. 2020). Chitinázy byly identifikovány v řadě organismů přes bakterie, viry, houby, parazity, hmyz, rostliny i savce (Gianfrancesco & Musumeci 2004; Hamid et al. 2013). Enzym chitináza je glykosidhydrolasa, která se váže na chitin a náhodně štěpí glykosidické vazby v chitinu a chitodextrinech v neprocesivním režimu, přičemž generuje chitooligosacharidy s volnými konci (Lombard et al. 2014).

Existují dvě hlavní kategorie chitináz (endo-chitinázy a exo-chitinázy) rozlišené na základě mechanismu účinku buď exo-lyticky nebo endo-lyticky (Brzezinska et al. 2013). Mezi endo-chitinázy patří chitotriosidáza, chitináza 1 (CHIT1) a acidic mammalian chitinase (AMCase) (Madan et al. 2020). Tyto enzymy štěpí chitinový polymer ze vnitř na náhodných místech a vytvářejí malé multimerní jednotky, jako je chitotetráza a chitotrióza (Farah et al. 2016). Kvůli strukturní podobnosti chitinu a celulózy sledují chitinolytické a celulolytické dráhy paralelní kroky. Chitinová hydrolyza spočívá v prvním štěpení polymeru na ve vodě rozpustné oligomery, následované štěpením těchto oligomerů na dimery jiným enzymem, který štěpí dimery na monomery. Tento proces zahrnuje endo-působící chitinázu, která náhodně hydrolyzuje chitin a výsledné oligomery a uvolňuje směs konečných produktů různých velikostí. Tento enzym však není schopen rozložit molekuly z diacetylchitobiózy. Na druhé straně β -N-acetylhexosaminidázy působí exo-lyticky a štěpí chitinové oligomery a chitin z neredukujícího konce (Veliz et al. 2017). Exo-chitinázy jsou někdy také označovány jako chitobiáza (CTBS) (Adrangi & Faramarzi 2013) a napadají chitin na vnějších koncích. Rozdělují se do dvou kategorií na základě postupné degradace chitobiosidáz a β -1,4 N-acetylglukosaminidáz. Enzymatickým působením chitobiosidázy se uvolní diacetylchitobiose, který je dále štěpen na oligomerní jednotky působením β -1,4 N-acetylglukosaminidázy (Farah et al. 2016).

Teprve nedávno byly chitinázy nalezeny v několika lidských tkáních a jejich role byla spojena s obranou proti parazitickým infekcím a některými alergickými stavy (Paoletti et al. 2007). U lidí se chitinázy nebo enzymy degradující chitin skládají jak z enzymaticky aktivních chitináz, tak z proteinů podobných chitináze, označovaných jako chi-lektiny, které postrádají enzymatickou aktivitu (Bussink et al. 2007). První identifikovaná chitináza v lidském organismu byla chitotriosidáza (Renkema et al. 1995; Bussink et al. 2006; Hamid et al. 2013). Druhou identifikovanou chitinázou byla AMCase, kde název vyplývá z její aktivity v kyselém pH okolo 2 (Boot et al. 2001). Chitotriosidáza je enzym specifický pro fagocyty a AMCase je exprimovaná v plicích a gastrointestinálním traktu (Boot et al. 2005). Aktivitu AMCase ovšem nemají všichni jedinci. Přibližně 80 % populace ji má obsaženou ve svých žaludečních šťávách. AMCase se vyskytuje v podstatně vyšší míře u obyvatel žijících v tropických oblastech. Tento

fakt může být dán dvěma faktory. Prvním z nich je, že v těch to oblastech je vyšší míra entomofágie. Druhá z možností je, že lidé žijící v tropických oblastech mají přirozeně vyšší obranyschopnost vůči parazitům (Paoletti et al. 2007). U osob, které mají AMC_{ase} enzym neaktivní, je chitin pouze částečně hydrolizován lysozymem a kyselinou chlorovodíkovou ve slinách a žaludku (Huis 2013). Výzkum zaměřený na aktivitu AMC_{ase} u 25 italských pacientů, prokázal, že tento enzym byl přítomný v žaludečních šťávách 20 pacientů a u 5 z nich byla aktivita velmi vysoká. Nedostatečná aktivita u 20 % žaludečních šťáv může být důsledkem absence chitinového jídla v západní stravě (Paoletti et al. 2007).

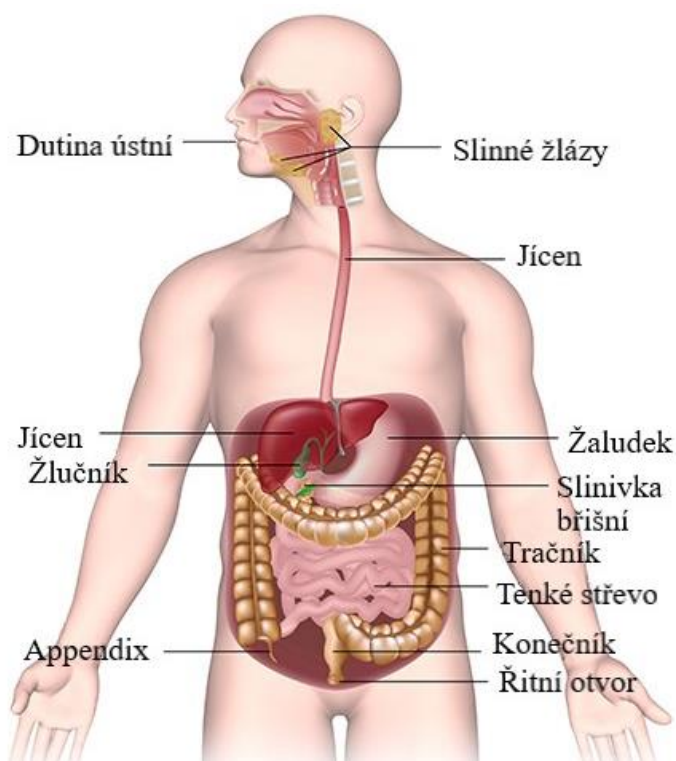
3.2.2 Chitin jako prebiotikum

I když lidé mohou chitin štěpit jen do určité míry a někteří vůbec ne, je zde možnost štěpení chitinu mikrobiotou lidských střev. V roce 1936 George L. Clark uvedl: „chitin (C₈H₁₃O₅N) je modifikovaný polysacharid obsahující dusík se strukturou analogickou s nestravitelnou celulórou. Je považován za nerozpustnou vlákninu s potenciálními prebiotickými vlastnostmi, která by mohla prospět lidskému zdraví tím, že selektivně podpoří růst prospěšných bakteriálních druhů ve střevech“ (Clark & Smith 1936). Jelikož hmyz nebyl významnou složkou lidské stravy, jako zdroj prebiotik byl testován teprve nedávno. Studie Stull et al. (2018) měla za cíl posoudit snášenlivost a dopad konzumace cvrččího prášku na mikrobiotu střev. Výsledky naznačují, že konzumace 25 g cvrčků (*G. sigillatus*) denně po dobu 14 dnů je bezpečná a po tuto dobu nebyl pozorován žádný nepříznivý účinek na lidský organismus. Konzumace cvrčků během období studie nijak nenarušila zdravou mikrobiotu. Příjem cvrčků byl spojen se zvýšením hojnosti pěti bakteriálních taxonů, z nichž jeden se nejvíce shodoval se sekvencemi *Bifidobacterium animalis*, který je považován za jedno z hlavních probiotik. To že může být chitin využíván bifidobakteriemi podporuje i fakt, že chitooligosacharidy, které jsou podobné těm, které se vyskytují v cvrčcích, jsou označovány jako bifidogenní (Chen et al. 2002). Byla provedena *in vitro* studie Young et al. (2020), jejíž výsledky jasně ukazují, že různé druhy jedlého hmyzu mají potenciál modifikovat lidský střevní mikrobiom. Mezi pozorovanými druhy hmyzu byly larvy chroustu (*Costelytra giveni*), kteří pozitivně ovlivňovali růst bakterií *Faecalibacterium* a *Prevotella*. Cvrčci dobře působili na bakterie skupiny *Escherichia-Shigella*, *Dialister* a *Lachnospiraceae*. Významná změna ve střevní mikrobiotě spojená s konzumací jedlého hmyzu v podobě cvrčků byla zaznamenána na *Lactobacillus* spp. (LAB) a *Leuconostoc*, kdy při 14 denní konzumaci došlo k 3× až 4× snížení těchto rodů. Snížené množství LAB by mohlo ovšem souviset s náhradou potraviny s obsahem těchto probiotických rodů, jako jsou například jogurty či fermentované mléčné výrobky za hmyzí produkty (Stull et al., 2018).

Studie Stull et al. (2018) také hodnotila vylučované SCFA pro měření změn v mikrobiálním metabolismu. Bylo pozorováno malé snížení vylučovaného acetátu a propionátu při konzumaci cvrčků, i když hladiny butyrátu se nezměnily. Což může naznačovat nepřizpůsobivost mikrobioty, která nemusí být schopna využívat nové zdroje vlákniny, jakým je chitin. Na proti tomu je zde studie Borrelli et al. (2017) provedená na nosnicích, která zkoumala účinek larvy *Hermetia illucens* na střeva mikrobiom a produkci SCFA. Hmyzí strava měla pozitivní vliv na růst *Bacteroides plebeius*, *Elusimicrobium minutum*, *Alkaliphilus transvaalensis*, *Christensenella minuta*, *Vallitalea guaymasensis* a *Flavonifractor plautii*. Z nich, *F. plautii*, *C. minuta*, *A. transvaalensis* mají potenciál degradovat chitinovou hmyzí moučku. Tyto mikroorganismy tak mohou spojit degradaci chitinu s vysokou produkcí SCFA. Výsledky této studie, tedy naznačují, že larvy *H. illucens* mají u nosnic potenciál prebiotik.

3.3 Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt (GIT) je komplexní systém, složený z ústní dutiny (*cavum oris*), hltanu (*pharynx*), jícnu (*oesophagus*), žaludku (*gaster*), tenkého střeva (*intestinum tenue*) - (*duodenum, jejunum, ileum*), tlustého střeva (*intestinum crassum*) - (*intestinum caecum, colon, rectum*) a řitního otvoru (*anus*), které společně s pomocnými zaživacími orgány tvoří trávicí systém (obr. 3) (Maukonen & Saarela 2015). Pro zjednodušení a lepší představení lze GIT dělit na tři části - horní GIT (ústa, jícen, žaludek); střední GIT (tenké střevo); dolní GIT (kolon). Čtvrtou částí mohou být označovány přidatné orgány, které ovšem nejsou přímo součástí trávicí trubice. Tato část zahrnuje slinné žlázy (*glandula salivaria*), slinivku břišní (*pankreas*), játra (*iecur*) a žlučník (*vesica fellea*). Každý z těchto orgánů má nezaměnitelnou funkci pro správné fungování zaživacího traktu. Společným znakem většiny, těchto orgánů je složení stěny trávicí trubice, která zahrnuje čtyři vrstvy – mukóza (vnitřní vrstva – sliznice), submukóza (podslizniční vazivo), svalová vrstva (*muscularis extrema*) a vnější vrstva serosa (Smith & Motron 2010; Johnstone et al. 2014).



Obrázek 3: Schéma lidského trávicího traktu (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases 2017).

Trávicí systém má řadu sofistikovaných a autonomních funkcí, které je možno shrnout do několika kroků. Prvním krokem je trávení, které se odehrává v horní části GIT, jde o mechanické a chemické rozložení složek stravy na malé molekuly. Následuje vstřebávání a přechod selektovaných látek stěnami GIT do krevního řečiště, tento krok probíhá do určité míry po celé délce trávicího traktu, ale nejmasivněji se odehrává ve středním a dolním GIT. Poté následuje distribuce, využití případně skladování živin. Nevyužité složky jsou v poslední fázi z organismu vyloučeny. Důležitou funkcí je obrana proti potenciálním patogenům. Mezi hlavní obranné mechanismy patří hlen, epiteliální překážky, trávicí šťávy a symbiotické mikroorganismy (Cheng et al. 2010; Maukonen & Saarela 2015; Wang et al. 2020). Tyto mikroorganismy osidlují střevní trakt a spolupracují s buňkami celého těla (Zschocke 2017).

3.4 Mikrobiom lidských střev

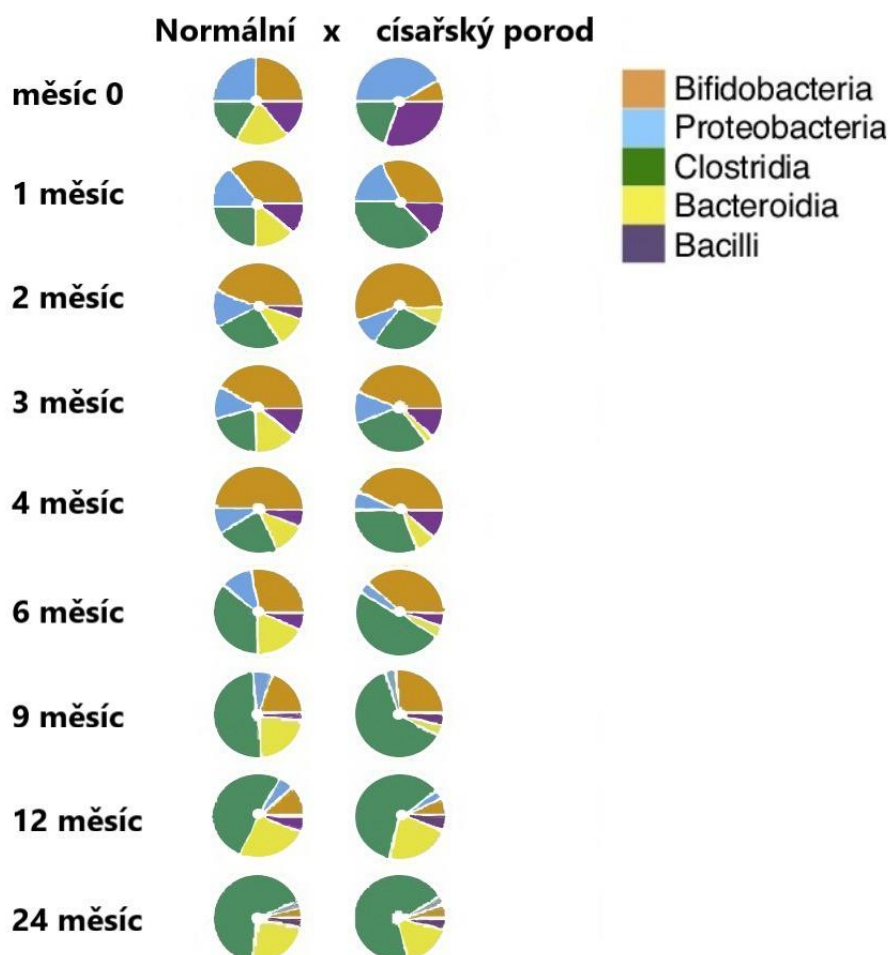
V lidském střevním traktu je 10^{13} až 10^{14} bakterií, což je $10\times$ až $20\times$ vyšší počet než celkové množství tkáňových buněk v celém těle (Suau et al. 1999; Dinan & Cryan 2012; Zschocke 2017).

Trávicí trakt je v celé své délce jistým způsobem osídlený mikroorganismy. Složení gastrointestinální mikrobioty je určeno řadou faktorů, ať už ze strany hostitele (genetika, trávicí sekrece, fyziologie trávení, vrozená a adaptivní imunita, strava, nemoci, užívání drog a antibiotik), mikrobiologických (soutěž o živiny a místa adheze, metabolické kooperace, bakteriální antagonismus) a faktory prostředí (dostupnost substrátu, lokální pH, redoxní potenciál, geografie) (Macfarlane & Macfarlane 2012; Rinninella et al. 2019). U zdravých jedinců má žaludek a horní část tenkého střeva relativně nízký počet mikroorganismů, a to díky antimikrobiálním vlastnostem dusitanů, oxidů dusnatých či kyseliny chlorovodíkové, které jsou součástí žaludečních kyselin. Dalším faktorem nízkého osídlení je krátká doba výdrže žaludečního obsahu v žaludku, kde je počet života schopných bakteriálních buněk do 10^2 na ml, přičemž převládají kyselé grampozitivní druhy, jako jsou laktobacily a streptokoky (Macfarlane & Macfarlane 2012). V oblasti dvanáctníku je bakteriální kolonizace potlačena několika mechanismy, čímž je rychlý tranzitní čas, antimikrobiální peptidy, proteolytické enzymy, kyselé pH a toxická koncentrace žluči (Yadav et al. 2017). Dolní tenké střevo je přechodnou zónou mezi mírně osídleným horním a středním GIT a silně bakteriálně osídleným tlustým střevem. Rychlost pohybu střevního obsahu se v tlustém střevě výrazně zpomaluje, což usnadňuje vývoj velkých a komplexních bakteriálních komunit. Tlusté střevo je proto hlavním místem trvalé mikrobiální kolonizace v lidském těle. Ve spodní části tlustého střeva, se počet bakterií zvyšuje na úroveň 10^6 až 10^7 mikroorganismů na ml tráveniny. Tato gastrointestinální mikrobiota je považována za první biologickou bariéru pro patogenní bakterie. Počty bakterií ve střevě se postupně zvyšují z proximálního tračníku do distálního a některé studie Liévin-Le Moal & Servin (2006); Macfarlane & Macfarlane (2012); Yadav et al. (2013, 2017) provedené za posledních několik let naznačují, že počet životaschopných buněk ve fekálním materiálu se pohybuje od přibližně 10^{11} do 10^{12} na g tráveniny. Drtivá většina těchto organismů jsou obligátní anaeroby.

Díky takto vysokému počtu osídlení a významným funkcím, byl vznesen názor, že střevní mikrobiota může být do určité míry chápána jako mikrobiální orgán umístěný v hostiteli (Bäckhed et al. 2005). Střevní mikrobiální komunita má kolektivní genom, označovaný jako mikrobiom (Turrone et al. 2008). Obsahuje také $150\times$ více genů, než je lidský genom (Qin et al. 2010). Lidský „metagenom“ je tedy složen jak z genů *Homo sapiens sapiens*, tak z bakteriálního mikrobiomu (Turnbaugh et al. 2007; Bäckhed et al. 2015). Mikrobiom, kóduje funkce, o nichž se předpokládá, že mají významný dopad na lidskou fyziologii (Turrone et al. 2008; Islam 2016). Má schopnost získávat energii a živiny ze stravy (Ley et al. 2016). Podílí se na příjmu, přeměně a uvolňování látek v těle, a to nejen z potravy, ale také ze vzduchu. Je nevyhnutelně propojen s buňkami imunitního systému. Mikrobiom dále ovlivňuje nervový systém a je spojen s hormonálními cykly (Islam 2016). Obecně lze říct, že mikrobiom kóduje značnou část metabolických funkcí (Ley et al. 2016). Předpokládá se, že mikrobiom významně zvyšuje metabolismus aminokyselin a glykanových kyselin, obrát xenobiotik, methanogenezi a biosyntézu vitamínů (Turrone et al. 2008). Dále spotřebovává a ukládá energii, fyziologicky

zprostředkovává důležité chemické transformace a je schopen se sám replikovat (Bäckhed et al. 2005).

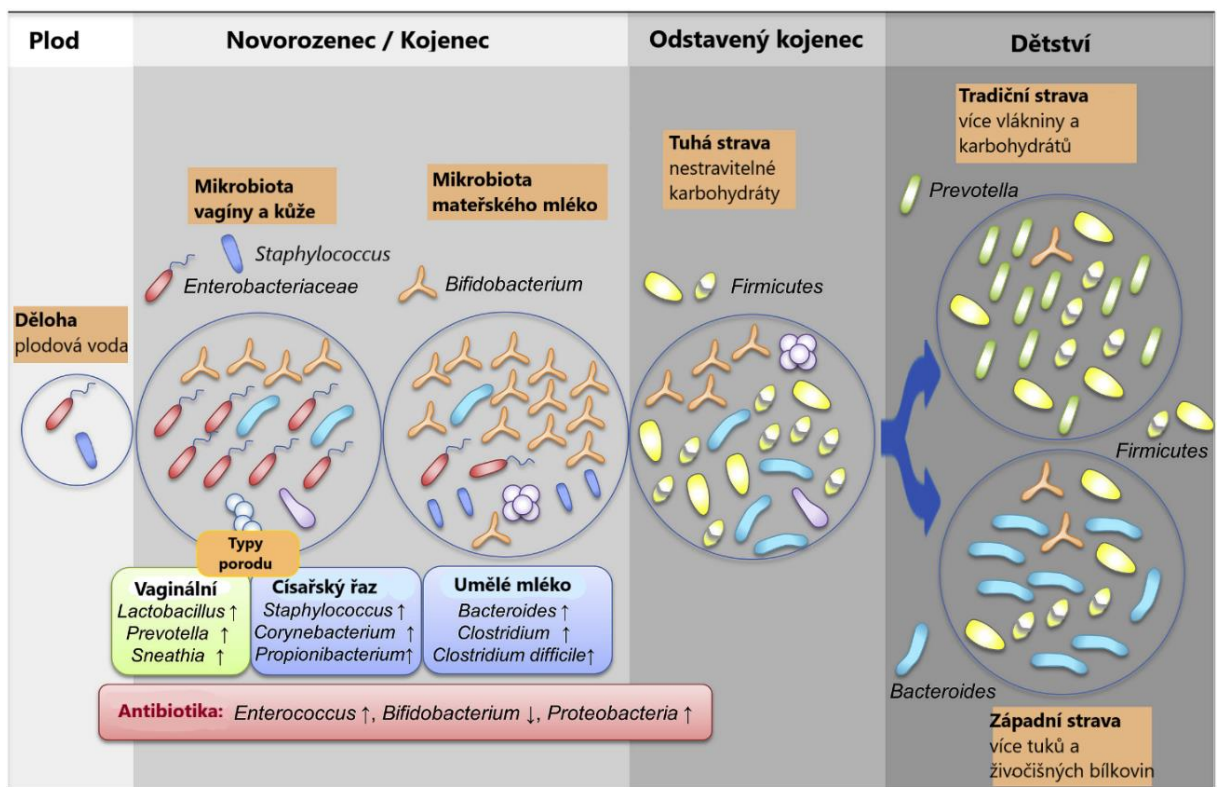
Tyto funkce jsou pro lidský organismus nezbytné již od jeho narození. Počáteční složení lidské mikrobioty má dlouhodobé metabolické účinky a je známo, že počáteční složení lidských střevních bakterií ovlivňuje vývoj postnatálního imunitního systému (Biasucci et al. 2010). Předpokládá se, že zdravý lidský plod se vyvíjí v aseptickém prostředí (Dominguez-Bello et al. 2010). Kolonizace lidského organismu začíná v momentě porodu, kdy podle způsobu porodu nastává osídlování odlišnou mikrobiotou (obr. 4) (Korpela & Vos 2018; Liu et al. 2019b).



Obrázek 4: Porovnání složení střevní mikrobioty normálního (vaginálního) a císařského porodu a jeho změna v průběhu prvních 24 měsíců od narození (Korpela & Vos 2018).

Lidská plodová voda a placenta obsahují jedinečná mikrobiální společenství, která mohou poskytnout počáteční inokulum pro kolonizaci střev (Collado et al. 2016). S vaginálním porodem přirozeně osídlují novorozence mateřské vaginální bakterie, a to především kmene *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus*, *Prevotella* nebo *Sneathia spp.* (Dominguez-Bello et al. 2010; Fernández et al. 2013b). U porodu císařským řezem značně dominují kožní bakterie a bakterie operačního sálu. Mikroiota je pak zastoupena bakteriemi *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Propionibacterium spp.* a dochází ke zpomalené kolonizaci *Bifidobacterium* (Dominguez-Bello et al. 2010; Heshmati et al. 2011; Shao et al. 2019). Dalším faktorem, který je podstatný pro rozvoj mikrobioty je způsob stravy. Kojenci, kteří jsou živieni mateřským mlékem mají v GIT dominantnější bifidobakterie, laktobacily, bakteroidy a staphylokoky (obr. 5) (Bäckhed et al. 2015; Senn et al. 2020). Tyto bakterie mají funkci

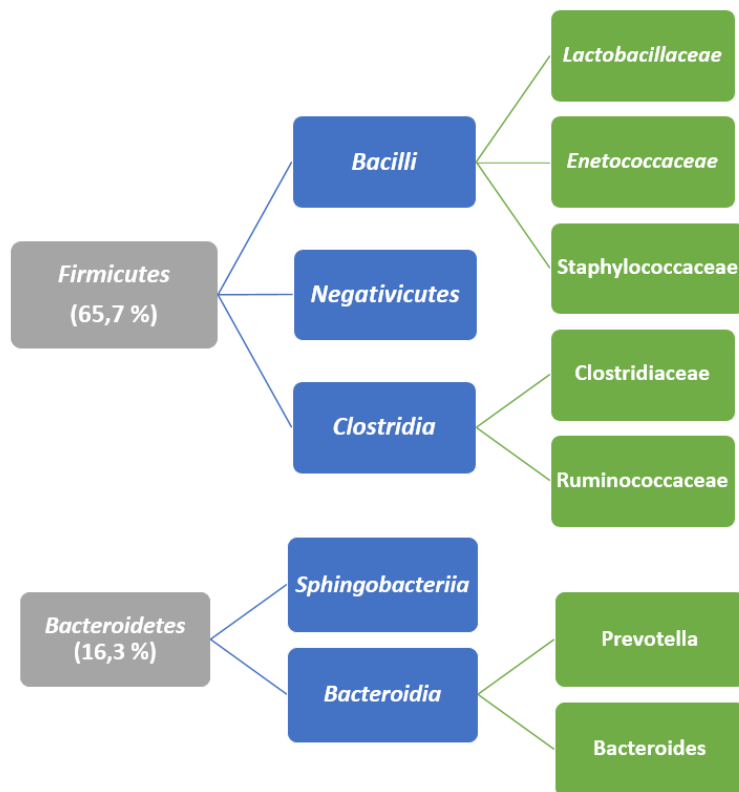
chránit kojence před infekcemi a mimo jiné přispívat k rozvoji imunitního systému (Fernández et al., 2013b). Kojenci živení umělou výživou mívají širší zastoupení mikrobioty. Šíře tohoto zastoupení je ovlivněna především typem umělé výživy a přidanými probiotickými složkami. Obecně se u takto živených kojenců vyskytuje vyšší osídlení *Bifidobacteriaceae*, *Clostridia*, *Enterococcus* a *Enterobacteriaceae* (Senn et al. 2020). S nástupem batolecí stravy se rozdíly v mikrobiotě způsobené typem porodu, kojením či umělou stravou do určité míry sjednotí. Uvádí se, že ke sjednocení dojde do 6 až 9 měsíců po odstavení (Reyman et al. 2019; Shao et al. 2019). Studie Chu et al. (2017) dokonce uvádí, že ke sjednocení rozdílností vzniklých porodem dojde již během prvních 6 týdnů života. Mikrobiota kojenců prochází podstatnou reorganizací, která je primárně řízena tělem či způsobem stravy a nikoli způsobem porodu. Faktor který ovšem může narušit normální vývoj mikrobioty dítěte je příjem antibiotik, které výrazně naruší přirozený rozvoj mikrobioty. Toto narušení mění mikrobiální signály, které hostitel přijímá, což může ovlivnit jeho následný vývoj (Korpela & Vos 2018).



Obrázek 5: Kolonizace střevní mikrobioty od porodu do dětství a důležité faktory, které tento proces ovlivňují (Tanaka & Nakayama 2017).

Ve věku jednoho roku je dětská mikrobiota zastoupena především: *Akkermansiamuciniphila*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium coccoides* spp. (Tidjani Alou et al. 2016). Koncentrace *Bifidobacterium* spp. se během dospívání postupně snižuje (Derrien et al. 2019). Okolo dvou let je mikrobiota jedince srovnatelná se složením mikrobioty dospělého člověka. Obsah mikroorganismů dospělých jedinců je ovšem velmi různorodý, ovlivňuje jej řada faktorů jako je geografická lokalizace, úroveň hygieny a různorodé podnebí. Nejdůležitějším faktorem jsou však stravovací zvyklosti jedince (Delcenserie et al. 2008). Obecně ovšem platí, že dominantními kmeny střevní mikrobioty u dospělých jedinců jsou *Firmicutes* (65,7 %) a *Bacteroidetes* (16,3 %) (obr. 6) (Eckburg et al. 2016; Ley et al.

2016). Kmen *Firmicutes* se skládá z více než 200 různých rodů, jako jsou *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* a *Ruminococcus*. Rody *Clostridium* představují přibližně 95 % kmene *Firmicutes*. *Bacteroidetes* se skládá z *Bacteroides* a *Prevotella* (Arumugam et al. 2011). Dalšími zastoupenými kmeny jsou *Proteobakterie* (8,8 %); *Aktinobakterie* (4,7 %); *Verukomikrobie* (2,2 %); *Fusobakterie* (0,67 %) (Eckburg et al. 2016; Ley et al. 2016) .



Obrázek 6: Dominující kmeny mikroorganismů ve střevech dospělého jedince. Upraveno podle (G. T. Macfarlane et Macfarlane 2012; Rinninella et al. 2019)

Ke konci života se složení mikrobioty opět mění důsledkem ztráty zubů, snížením funkce slin, zpomalením trávení a průchodu střev. Uvádí se, že mikrobiota u starších lidí je však, rozmanitější ve srovnání s mladšími dospělými (Maukonen & Saarela 2015).

3.4.1 Probiotika

Termín probiotika pochází z řečtiny a vznikl složením slov "pro" (příznivý) a "bios" (život). Význam slova je používán k definování živých nepatogenních organismů a jejich příznivých účinků na hostitele. Pojem „probiotika“ poprvé zavedl Vergin v roce 1954, když studoval škodlivé účinky antibiotik a jiných antimikrobiálních vlastností na mikrobiální populaci ve střevech. Poznamenal, že „probiotika“ působila příznivě na střevní mikrobiom. Pojem probiotika byl pak Lilly a Stillwell v roce 1965 předefinován jako „Produkt produkovaný jedním mikroorganismem stimulujícím růst jiného mikroorganismu“ (Pandey et al. 2015; Markowiak & Ślizewska 2017). Fuller (1989) definoval „probiotika“ jako „živý mikrobiální doplněk krmiva, který příznivě ovlivňuje hostitelské zvíře zlepšením jeho střevní mikrobiální rovnováhy“. Podle aktuálně přijaté definice FAO a WHO jsou probiotika živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos (Fioramonti et al. 2003). Mnoho z probiotik je součástí lidské střevní mikrobioty, kde

žijí v symbiotickém vztahu (Ley et al. 2016). Mikrobiální společenství (bakterie, houby, archea, viry a prvoci) se nacházejí v lidském GIT, plicích, kůži a existují v komenzálním vztahu s hostitelskými buňkami, čímž hrají významnou roli v lidském zdraví (Bustamante et al. 2020). Většina probiotik spadá do skupiny organismů známých jako bakterie mléčného kvašení (BMK), které produkují mléčnou kyselinu. Obvykle se konzumují ve formě jogurtů, fermentovaného mléka nebo jiných fermentovaných potravin (Parvez et al. 2006).

Hlavním zástupcem kvasinek je *Saccharomyces cerevisiae* a předními představiteli BMK jsou především kmeny *Lactobacilli* spp. a *Bifidobacterium* spp., jež jsou považovány za nejúčinnější a nejčastější probiotika (Guarner et al. 2008; Yadav et al. 2017). BMK jsou nepatogenní, netoxické, grampozitivní, fermentující bakterie, které jsou spojeny s produkcí mléčné kyseliny ze sacharidů, čehož je využíváno při kvašení potravin. (Guarner et al. 2008).

Mezi příznivé účinky konzumace BMK patří: zlepšení zdraví střevního traktu; redukce infekce *Helicobacter pylori*; zlepšení imunitního systému; syntéza a zvýšení biologické dostupnosti živin; snížení příznaků intolerance laktózy; snížení alergických reakcí a snížení rizika některých druhů rakoviny. Dále pak posilují střevní slizniční bariéry proti škodlivým látkám (Schrezenmeir & Vrese 2001; Fioramonti et al. 2003; Parvez et al. 2006; Guarner et al. 2008; Scaldaferrri et al. 2013; Bustamante et al. 2020). Bylo navrženo, že probiotika by měla být konzumována denně v dávkách 10^8 až 10^{10} koloniích tvořící jednotky (KTJ), aby byly prokázány příznivé účinky na zdraví jedince (Bustamante et al. 2020).

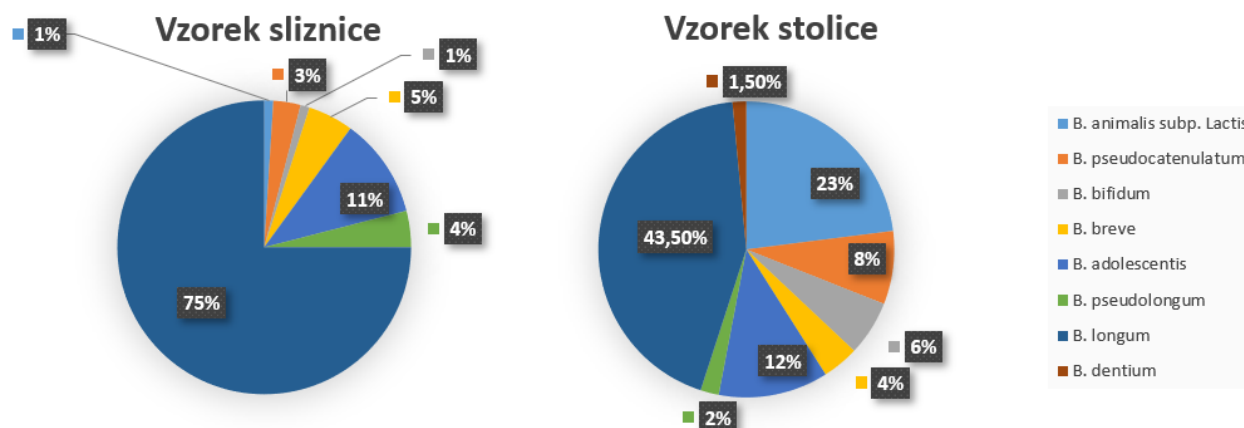
Mechanismy, kterými probiotika uplatňují své účinky, jsou do značné míry neznámé, ale mohou zahrnovat úpravu pH střev, stimulují imunomodulační buňky a antagonizaci patogenům produkcí antimikrobiálních sloučenin (Parvez et al. 2006). Probiotické kmeny inhibují patogenní organismy tím, že s nimi soutěží o substrát potřebný pro fermentaci. Kromě toho si konkurují v navázání na receptory a zabraňují adhezi patogenních bakterií k hostitelským buňkám (Eizaguirre et al. 2002; Mangell et al. 2002; Parvez et al. 2006). Příkladem je mechanismus fungování *Lactobacillus plantarum*, který může přilnout k buňkám lidského tlustého střeva. Jakmile probiotikum přilne k buňce, dochází k různým biologickým aktivitám, které zahrnují především uvolňování cytokinů a chemokinů. Ty pak uplatňují svoji sekundární aktivitu, jako je stimulace slizniční a systémové imunity hostitele (Delcenserie et al. 2008). Je také známo, že některé střevní bakterie produkují vitamíny (Parvez et al. 2006). Probiotika uvolňováním svých metabolitů (arginin, glutamin, mastné kyseliny s krátkým řetězcem a konjugované linolové kyseliny) chrání střeva. Probiotická antimikrobiální aktivita je dána vylučováním produktů zvaných bakteriociny a látek, jako jsou organické kyseliny (mléčná, octová a máselná kyselina) a H_2O_2 (de Keersmaecker et al. 2006). Tyto metabolity působí bakteriocidně tím, že mají tendenci snižovat pH střevního obsahu. Probiotika mohou také ovlivnit další ochranné funkce střevní sliznice, včetně syntézy a sekrece antibakteriálních peptidů a mucinu (de Keersmaecker et al. 2006; Parvez et al. 2006).

3.4.2 Rod *Bifidobacterium* spp.

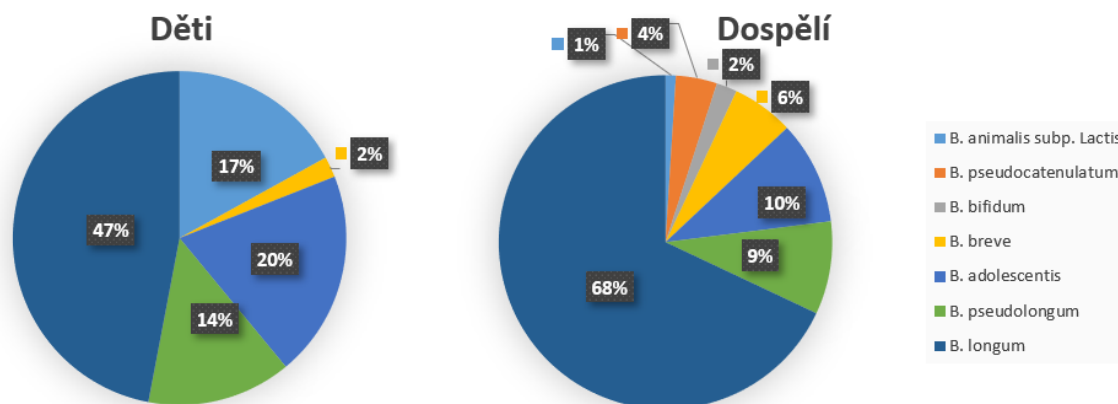
Bifidobakterie jsou grampozitivní, anaerobní prokaryota, které přirozeně kolonizují zvířecí či lidský GIT a vagínu. Ačkoli nejsou numericky dominantní ve složité střevní mikrobiotě, jsou považovány za klíčové komenzály, které podporují zdravý jedince (Schell et al. 2002; Turrone et al. 2009). Patří mezi první bakterie, které kolonizují lidský GIT. Předpokládá se, že mají pozitivní účinky na podporu zdraví, jako jsou ochranné aktivity proti

patogenům, produkcí antimikrobiálních látek (např. bakteriociny), anebo blokování adheze patogenů a modulace imunitní odpovědi (Turroni et al. 2009).

Provedená analýza ukázala, že kultivovatelná populace bifidobakterií ze střevních a fekálních vzorků zahrnuje šest hlavních fylogenetických taxonů, tj. *Bifidobacterium longum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. adolescentis*, *B. pseudolongum*, *B. breve* a *B. bifidum* a dva druhy většinou detekované ve vzorcích stolice, tj. *B. dentium* a *B. animalis subsp. Lactis* (obr. 7). Zastoupení těchto kmenů bifidobakterií se během života postupně mění. Nejdominantnějším ovšem zůstává *B. longum* (obr. 8) (Turroni et al. 2009).



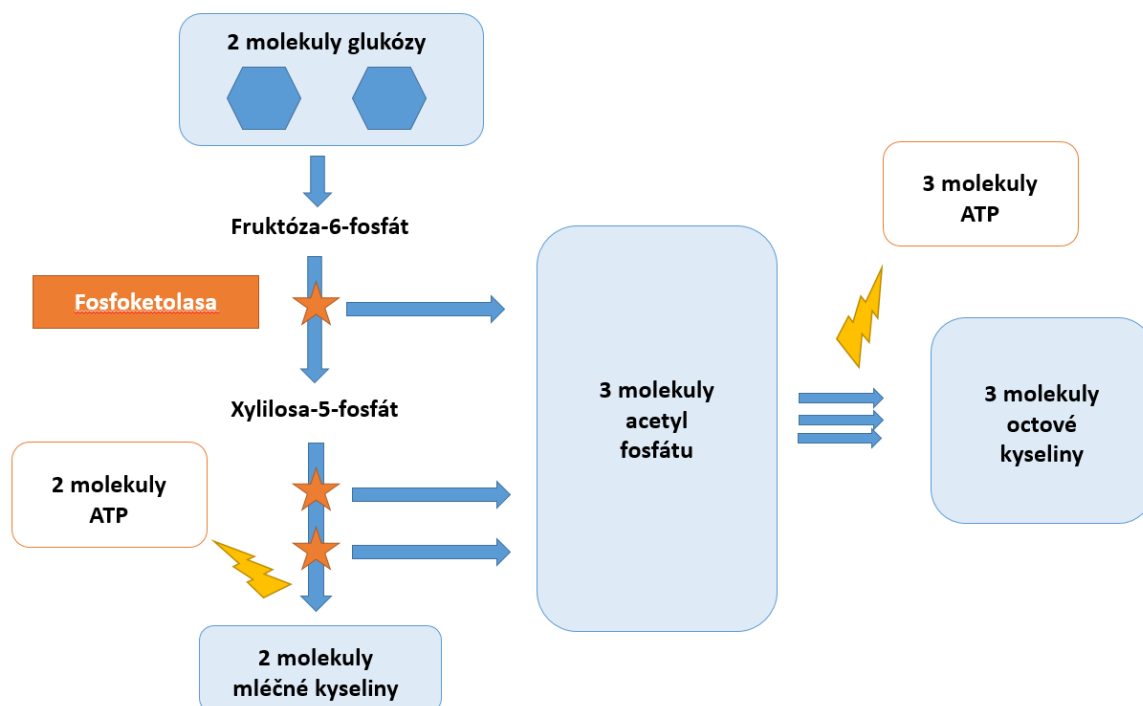
Obrázek 7: Procentuální zastoupení identifikovaných bifidobakterií ze vzorků stolice a sliznice tlustého střeva. Upraveno podle (Turroni et al. 2009).



Obrázek 8: Procentuální zastoupení identifikovaných bifidobakterií ze vzorků odebraných dospělým jedincům a dětem. Upraveno podle (Turroni et al. 2009).

Výskyt a poměr zastoupení bifidobakterií závisí také na typu konzumované stravy. Stravitelné a relativně jednoduché mono-, di- a trisacharidy (laktóza a sacharóza), jsou metabolizovány v horní části tlustého střeva, kde jsou především kolonizovány laktobacily (Hooper et al. 2002; Vaughan et al. 2005). Naproti tomu bakterie aktivní v dolních částech tlustého střeva, jako jsou bifidobakterie, mají schopnosti metabolizovat komplexní sacharidy nepodléhající trávení v horních částech (Hooper et al. 2002). Bifidobakterie degradují polymerní sacharidy na oligosacharidy s nízkou molekulovou hmotností, které následně rozkládají na monosacharidy. Ty se pomocí enzymů přeměňují na meziproducty fruktóza-6-fosfát a následně na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA; short chain fatty acids) (Pokusaeva et al. 2011). Právě tímto způsobem fermentace se bifidobakterie liší od jiných

BMK, které mají enzymy aldoláza a glukóza-6-fosfát NADP + oxidoreduktáza. Naproti tomu klíčovým enzymem fermentace bifidobakterií je fruktóza-6-fosfát fosfoketolasa (F6PPK). Enzym katalyzuje štěpení fruktóza-6-fosfátu na erythrose-4-fosfát a acetyl-fosfát, který je poté přeměněn na octovou kyselinu, která je spolu s mléčnou kyselinou hlavním produktem fermentace (Fandi et al. 2001). Bifidobakterie tedy degradují hexózoové cukry glukózu a fruktózu jedinečným způsobem s názvem „bifid shunt“ (obr. 9) (Pokusaeva et al. 2011). Tímto procesem se produkuje více energie ve formě ATP ze sacharidů než fermentačními dráhami působícími například u BMK. Bifidobakteriální dráha poskytuje 2,5 molekuly ATP z 1 molu fermentované glukózy a 1,5 molu octanu a 1 mol laktátu (Palframan et al. 2003; Suzuki et al. 2010).



Obrázek 9: Schéma „bifid shunt“. Dvě molekuly mléčné kyseliny, tři molekuly octové kyseliny a pět molekul ATP se vyrábějí ze dvou molekul glukózy. Fosfoketoláza katalyzuje rozklad dvou molekul glukózy ve třech krocích. Upraveno dle (Suzuki et al. 2010).

3.4.3 Prebiotika

Aby mohlo docházet k produkci výše zmíněné energie musejí být přítomná prebiotika. Prebiotika jsou definována jako „substrát, který selektivně podporuje růst nebo aktivitu střevních mikroorganismů a zlepšuje tím zdravotní stav konzumenta.“ Tato nová definice umožňuje zahrnutí látek bez obsahu sacharidů a aplikaci do jiných tělních míst, než je gastrointestinální trakt. Nově jsou zde také zahrnuty prebiotika používaná u zvířat (Gibson et al. 2017). Většinou se jedná o neškrobové polysacharidy a oligosacharidy špatně trávené lidskými enzymy (Macfarlane et al. 2006; Guarner et al. 2008). V současné době jsou nejdominantnějšími a nejúčinnějšími prebiotiky zejména oligosacharidy, jako fruktany (fruktooligosacharidy (FOS) a inulin) a galaktany (galaktooligosacharidy (GOS)), které velmi dobře podléhají metabolické transformaci rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Gibson et al. 2017).

Oligosacharidy, jsou štěpeny bakteriální fermentací v tlustém střevě (Blaut 2002). Nejen že produkty této fermentace mohou působit specifické změny ve složení a činnosti gastrointestinální mikrobioty, ale také pozitivně ovlivňují zdraví hostitele (Guarner et al. 2008).

Fermentace v tlustém střevě má velké množství fyziologických účinků, jako je zvýšení absorpce vápníku, nárůst fekální hmotnosti, zkrácení doby průchodu gastrointestinálním traktem a snížení hladiny lipidů v krvi. Předpokládá se, že nárůst bifidobakterií v tlustém střevě prospívá lidskému zdraví produkcí sloučenin, které inhibují potenciální patogeny snížením hladiny amoniaku v krvi a produkcí vitamínů a trávicích enzymů (Guarner et al. 2008; Dahiya et al. 2017).

Lidské tělo produkuje pouze omezený počet enzymů potřebných k degradaci komplexních sacharidů. Savci jsou vybaveni tak, aby absorbovali jednoduché cukry (např. glukózu, fruktózu), hydrolyzovali konkrétní disacharidy (např. sacharózu a maltózu) a štěpili pouze velmi omezený počet polysacharidů (např. škrob). Naproti tomu nemohou trávit jiné dietní polysacharidy (např. pektin a polysacharidy obsahující xylan a arabinózu). Nestravitelnost těchto cukrů odráží nedostatek lidských enzymů potřebných pro jejich degradaci (Vaughan et al. 2005; Sonnenburg et al. 2005). U těchto nestravitelných sacharidů neprobíhá hydrolýza a nevstřebávají se v tenkém střevě. Patří sem sacharidy, jako je rezistentní škrob a rezistentní dextriny; neškrobové polysacharidy (např. pektiny, arabinogalaktany, arabská guma, guarová guma a hemicelulóza); nestravitelné oligosacharidy (např. fruktany inulinového typu, galaktany, manany, rafinóza a stachyóza); nestrávené podíly disacharidů (např. laktóza); a cukerné alkoholy (např. laktitol a isomalt) (Shahrul & Rastall 2011).

Termín fruktany inulinového typu zahrnuje všechny β (2 ← 1) lineární fruktany včetně nativního inulinu, oligofruktózy, a také specifické kombinace oligofruktózy a inulinu. Fruktany inulinového typu odolávají trávení a fungují jako vláknina (Roberfroid 2007). Tyto látky jsou nejčastěji izolovány z kořenů čekanky *Cichorium intybus* L. Obecně lze ovšem říct, že jsou hojně zastoupeny u rostlin čeledi *Liliaceae*, *Amaryllidaceae*, *Poaceae* a *Compositae* (Gupta et al. 2019).

Fruktany a galaktany jsou oligosacharidy přednostně metabolizované bifidobakteriemi. Bifidobakterie obsahují enzym β -fruktanosidázových a β -galaktosidázových, které snadno degradují vazby ve FOS a GOS (Shahrul & Rastall 2011). Prebiotická oligofruktóza se přirozeně nachází v mnoha potravinách. Nejčastěji se s nimi setkáme v pšenici, cibuli, banánech, medu, česneku a pórku (Guarner et al. 2008).

Prvními prebiotiky, se kterými se člověk setkává jsou oligosacharidy lidského mléka. Jedná se o zvláště důležitou složku kojenecké stravy, mající důležitý vliv na vývoj střevní mikrobioty, metabolických a imunologických systémů novorozence dítěte. Mateřské mléko obsahuje i vysoký počet rodu *Bifidobacterium*, čímž je přirozeně zvyšován obsah těchto bakterií ve střevě kojenců (Garrido et al. 2015). Lidské kolostrum a mléko bylo tradičně považováno za sterilní. Ze vzorků lidského mléka bylo však dosud izolováno více než 200 různých bakteriálních druhů, včetně stafylokoků, BMK a bifidobakterií. Je zajímavé, že stejné bakteriální kmeny byly nalezeny jak v mateřském mléce, tak v kojeneckých výkalech různých párů matka-dítě, což potvrzuje vliv mateřského mléka na bakteriální kolonizaci střev kojence. Tyto komenzální bakterie chrání střeva kojence a podílejí se na zrání imunitního systému (Fernández et al. 2013a). Do mléka by se tyto bakterie mohli dostat z úst dítěte případně z pokožky prsu matky nebo bakteriální translokací z gastrointestinálního traktu matky do mléčné žlázy. Tato dráha je označována jako entero-mléčnou dráhou (Fernández et al. 2013a; Rodríguez 2014; Moossavi & Azad 2020). Lidské mléko je tedy zdrojem probiotik

a prvních prebiotik, s nimiž se novorozenci setkávají (Garrido et al. 2015; Al-Khafaji et al. 2020).

Prebiotika obsahují konfigurace glykosidových vazeb, která je odolná vůči hydrolýze střevní kyselinou a trávicími enzymy. U prebiotik proto nedochází ke štěpení v horních oblastech gastrointestinálního traktu a mohou se dostat do intestinálního traktu, kde jsou střevní mikrobiotou odbourávány na octovou, propionovou, máselnou a mléčnou kyselinu a také plyny CO₂ a H₂ (Bustamante et al. 2020).

Bakteriální skupiny, které v tlustém střevě nejčastěji fermentují nestravitelné oligosacharidy, jsou nazývány sacharolytickými organismy a jedná se o rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* a *Clostridium*. Naproti tomu skupiny mikrobů, jako je *Streptococcus*, *Clostridium*, *Bacillus* a *Staphylococcus*, mají schopnost fermentovat aminokyseliny a jsou tedy řazeny mezi proteolitické organismy (Shahrul & Rastall 2011). Sacharidy jsou fermentovány v proximální části tlustého střeva a výsledkem metabolických procesů fermentace za anaerobních podmínek jsou především SCFA, primárně acetát, propionát a butyrát, dále laktát - sůl mléčné kyseliny (který se hromadí v těle nebo může být přeměněn na SCFA) a plyny (CO₂, CH₄ a H₂). Tyto plyny jsou následně exkretovány stolicí či vydýchány (Cummings & Macfarlane 1991). Proteiny jsou především štěpeny v distální části tlustého střeva, na mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem, jako je isobutyřát, isovalerát a řada dusíkatých sloučenin. Některé z těchto metabolitů mohou být dále metabolizovány na toxické látky, jako je například amoniak, aminy a somefenolové sloučeniny (Cummings & MacFarlane 1997; Shahrul & Rastall 2011; Macfarlane & Macfarlane 2012).

SCFA jsou hlavními produkty fermentace, poskytující zdroj energie pro řadu orgánů, jako jsou svaly, ledviny, srdce a mozek. Tvoří téměř 10 % denní energetické potřeby mikrobiomu tlustého střeva a více než 70 % energie pro buněčné dýchání. (Blaut 2002; Guarner et al. 2008; Kasubuchi et al. 2015). Mimo to SCFA také ovlivňují metabolismus lipidů či sacharidů v játrech a okyselují obsah tlustého střeva, kde většinou probíhá i jejich absorpce do krevního řečiště (Cummings & MacFarlane 1997). SCFA jako acetát, propionát a butyrát vznikají v poměru 60:20:20 (Havenaar 2011; Macfarlane & Macfarlane 2012). Acetát se metabolizuje hlavně v lidských svalech, ledvinách, srdci a mozkových tkáních. Propionát přispívá k inhibici syntézy cholesterolu v játrech a regulaci ukládání tukové tkáně. Butyrát je metabolizován především epitelem tlustého střeva, kde slouží jako hlavní energetický substrát a jako regulátor buněčné diference. Uvádí se, že butyrát hraje ochrannou roli proti kolorektálnímu karcinomu a kolitidě. Bylo zjištěno, že rektálně podávaný butyrát snižuje záněty u subjektů s aktivní idiopatickou ulcerózní kolitidou (Shahrul & Rastall 2011; Kasubuchi et al. 2015).

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Pro testování byly použity tři druhy hmyzu: larvy potměníka moučného (*Tenebrio molitor*), šváb obecný (*Blatta orientalis*), a cvrček domácí (*Acheta domestica*), jež poskytl Ing. Martin Kulma, Ph.D. z katedry zoologie a rybářství (FAPPZ).

Pro vlastní testování byly využity bakteriální kmeny: *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (DSM 20 438), *B. breve* (ATCC 15 700), *B. adolescentis* (DSM 20 083), *B. longum* (ATCC 15 707), *B. animalis* (DMS 10 140) a *B. bifidum* (DSM 20 082). Z přístrojového zařízení byl použit mikroskop Nikon 2000, třepačka Vortex, vodní lázeň, kolona s CO₂ a H₂. a z běžného spotřebního materiálu podložní a krycí sklíčka, Petriho misky, injekční stříkačky, vialky.

Chemikálie využitě pro přípravu kultivačních medií, Wilkins-Chalgren s přídavkem sojového peptonu (WSP), Wilkins-Chalgren agaru s přídavkem sojového peptonu a média na ředící řadu jsou uvedeny v tabulce 8, chemikálie pro provedení F6PPK testu v tabulce 9.

Tabulka 8: Materiál potřebný pro přípravu medií a agaru.

Médium	Složení média na 1000 ml	Médium	Složení média na 1000 ml
Kultivační médium základ	10 g Tryptone	Wilkins-Chalgren s přídáním sojového peptonu	33 g Wilkins-Chalgren bujónu
	10 g Nutrient broth N.2		5 g sojového peptonu
	5 g kvasničný extract		0,5 g L-cysteinu (Sigma)
	1 ml Tween (Scharlau)		1 ml Tweenu (Scharlau)
	0,5 g Cystein (Sigma)		
	+ 1 g zdroje uhlíku		
Ředící řada	5 g Tryptone	Wilkins-Chalgren agar s přídavkem sojového peptonu	33 g Wilkins-Chalgren agar
	5 g Nutrient broth N.2		5 g sojového peptonu
	2,25 g kvasničný extract		1 ml Tween (Scharlau)
	0,5 ml Tween (Scharlau)		0,5 g Cystein (Sigma)
	0,25 g Cystein (Sigma)		50 mg mupirocinu

Výrobce jednotlivých složek medií je OXOID (UK), pokud není uvedeno jinak.

Tabulka 9: Činidla pro F6PPK test.

Název činidla	Složení
Roztok 1	0,36 g K ₂ HPO ₄ , 0,10 g KH ₂ PO ₄ , 0,15 g cysteinu, 300 ml H ₂ O
Roztok 2	120 mg NaF, 200 mg Na-iodoacetátu, 20 ml H ₂ O
Roztok 3	4,17 g hydroxylaminu, 30 ml H ₂ O
Roztok 4	3 g trichloroctové kyseliny, 20 ml H ₂ O
Roztok 5	2,48 ml HCl, 17,52 ml H ₂ O
Roztok 6	1 g FeCl ₃ , 62 µl HCl, 20 ml H ₂ O
Roztok 7	290 mg fruktosa-6-fosfátu, 5,5 ml H ₂ O
Roztok CTAB	detergent cetrídium bromidu (45 mg/100 ml H ₂ O)

4.2 Metodika

4.2.1 Stanovení čistoty kultur

Na začátku vlastního testování byla zkontrolována čistota sbírkových kmenů a jejich morfologie. Před provedením kontroly byly kultury zaočkovány (0,3 ml) do skleněných vialek obsahující 10 ml WSP, kde byla anaerobní atmosféra a ponechány 24 hodin kultivovat při 37 °C. Po kultivaci byla provedena kontrola čistoty narostlých bakteriálních kultur. Každá

bakteriální kultura byla převedena pomocí sterilní injekční jehly na podložní sklíčko a umístěna pod mikroskop (Nikon 2000), kde byla pozorována jejich morfologie.

Kontrola pomocí F6PPK

Následně byla provedena druhá kontrola na rodové úrovni na základě detekce fruktozo-6-fosfát fosfoketolázy, enzymu, který je specifický pro čeleď *Bifidobacteriaceae*.

Narostlé kultury na WSP byly odstředěny v centrifuze na 5 minut při 12 000 otáčkách. Vzniklý supernatan byl slit, rozpuštěn v 0,5 ml bifipufu a následně 2× propláchnut roztokem 1. K rozbití buněk bylo přidáno 0,2 ml CTAB a kultivace probíhala při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Následně se k rozbitým buňkám přidalo 0,125 ml roztoku 2 a 0,2 ml roztoku 7. Vzorek se nechal kultivovat 30 minut ve vodní lázni při teplotě 37 °C. K zastavení reakce byl použit roztok 3 v množství 0,75 ml. Následná inkubace probíhala při pokojové teplotě 10 minut. V posledním kroku bylo dodáno ještě 0,5 ml roztoku 4, 5 a 6.

Identifikace pomocí MALDI-TOF

Pro identifikaci na druhovou úroveň byla použita MALDI-TOF. Jedná se o šetrnou ionizační techniku, při které dochází k tvorbě iontů bez fragmentace molekul. Sterilní jehlou byl odebrán 1 ml narostlé čisté kultury do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek, které se poté nechaly odstředit po dobu 2 minut při 14 000 otáček. Po centrifugaci byl supernatan slit. Ke vzniklému peletu, který zůstal na dně zkumavky byl přidán 70% ethanol o objemu 500 µl. Takto vzniklý roztok se nechal odstředit na 14 000 otáček po dobu 2 minut. Supernatan byl opět slit a zbývající ethanol se opatrně odstranil odpipetováním, tak aby nedošlo k poškození peletu. Následně bylo k peletu přidáno 15 µl 70% kyseliny mravenčí (CH₂O₂) a 15 µl 100% acetonitrilu (C₂H₃N), které slouží k narušení buňky a uvolnění ribozomálního proteinu. K promíchání CH₂O₂ a C₂H₃N byla použita třepačka (Vortex) po dobu 30 sekund a vzorky byly opět vloženy do centrifugy a stočeny na 2 minuty při 14 000 otáčkách.

Vzniklý supernatan byl nanesen na MALDI destičku ve dvou kopiích v množství 1 µl. Vzorky na destičce se nechaly zaschnout a následně byla nanesena matrice MATRIX také v množství 1 µl. Destička se při pokojové teplotě nechala zaschnout a byla připravena k analýze. Samotná analýza proběhla na MALDI-TOF Autoflex Speed Bruker a výsledná spektra byla vyhodnocena softwarem Bruker MALDI Biotyper.

4.2.2 Příprava hmyzu

V tomto testování byly použity 3 druhy hmyzu – cvrčci, švábi, larvy potemníka moučného. Každý druh byl samostatně lyofilizován, došlo k jeho zmražení - 80 °C a následně byl hmyz sušen ve vakuu při - 56 °C. Jednotlivé druhy byly samostatně mixovány v Grindomix GM200 po dobu zhruba 2 minut na 2.0 × 1000 rpm s cílem zajistit jemnou a sypkou konzistenci.

4.2.3 Testování růstu bifidobakterií

Schopnost bifidobakterií využívat hmyzí moučku, byla testována pomocí stanovení růstových křivek, stanovení optické denzity média a kultivačním stanovením bakteriálních buněk.

Stanovení počtu bifidobakterií po kultivaci na médiích s hmyzí moučkou

Pro testování využitelnosti hmyzí moučky bifidobakteriemi byla použita kultivační media se čtyřmi druhy uhlíku: moučka z cvrčků, švábů, moučných červů a jako kontrolní zdroj uhlíku

byla použita glukóza. Posledním použitým kultivačním médiem byl Wilkins-Chalgren s přísadou sojového peptonu, který obsahoval veškeré nutné živiny pro kultivaci bifidobakterií. Složení kultivačního média je uvedeno v tabulce 7. Všechny přísady jednotlivých medií byly naváženy a rozvařeny. Bujóny byly nadávkovány do zkumavek po 10 ml. Zkumavky byly vloženy do vodní lázně s teplotou 100 °C na 10 minut, čímž došlo k vyvaření kyslíku a částečnému zajištění anaerobního prostředí.

Po vyjmutí z vodní lázně bylo u všech zkumavek zcela vytvořeno anaerobní prostředí probubláním média oxidem uhličitým. Následně byly zkumavky rychle uzavřeny gumovou zátkou s plastovým těsněním. Všechny zkumavky byly dále vloženy do autoklávu (121 °C, 1 hod). Po vyjmutí z autoklávu se nechaly zkumavky zchladit na pokojovou teplotu a byly do nich zaočkovány jednotlivé kmeny bakterií s následnou 24 hodinovou kultivací při 37 °C.

Počet bakterií v jednotlivých mediích byl stanoven kultivačně pomocí plotnové metody na Petriho miskách. Abychom mohli stanovit co nejpřesnější počet nárůstu kultivovaných bifidobakterií na mediích s různým zdrojem uhlíku, byla vytvořena ředící řada. Zaočkováná a kultivovaná média byla naředěna decimálním ředěním do koncentrace 10^{-7} a u Wilkins-Chalgren bujónu do 10^{-8} , čímž byla zajištěna lepší viditelnost nárůstu bakteriálních kmenů.

Příprava média na ředící řadu byla navržena dle receptu popsaného výše. Všechny potřebné přísady byly společně rozvařeny a nadávkovány po 9 ml do vialek. Poté se vialky umístily do vodní lázně přibližně na 15 minut při teplotě 100 °C, čímž opět došlo k vyvaření kyslíku. Po vyndání z vodní lázně bylo u všech vialek vytvořeno anaerobní prostředí probubláním média oxidem uhličitým. Následně byly zkumavky rychle uzavřeny gumovou zátkou s hliníkovou krytkou. Vialky byly vloženy do autoklávu (121 °C, 1 hod), čímž došlo ke sterilizaci média. Souběžně s přípravou média na ředící řadu, byl udělán i agar Wilkins-Chalgren s přísadou sojového peptonu. Všechny potřebné složky (tab. 7) byly rozmíchány v destilované vodě, rozvařeny a také sterilovány.

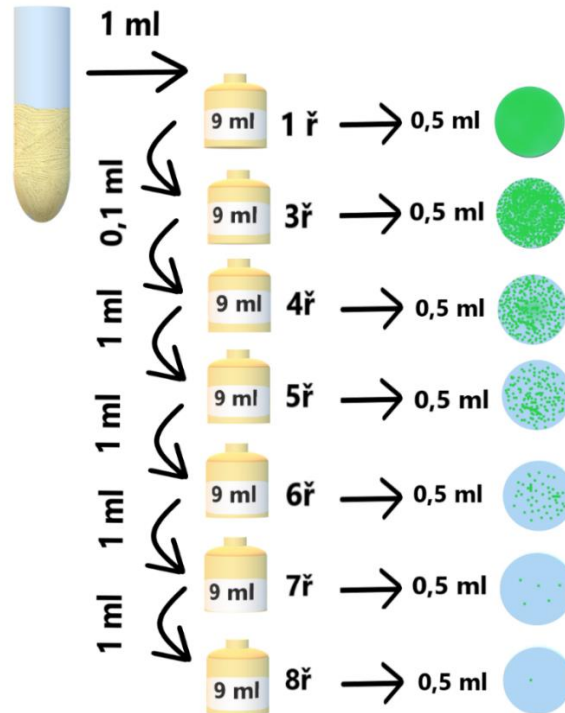
Po skončení kultivace bifidobakterií v kultivačním médiu, bylo z jednotlivých zkumavek s médiem odebráno pomocí sterilní injekční jehly 1 ml do 9 ml vialky s médiem určeným pro ředící řadu, čímž nám vzniklo 1. ředění. Z tohoto ředění bylo odebráno 0,1 ml a vloženo do další vialky s 9 ml ředícího média, čímž bylo docíleno vzniku 3. ředění. Následná 4. až 7. ředění vznikla odebráním 1 ml z předcházející vialky a vložení do další vialky s 9 ml ředícího média. U ředící řady určené pro kultivační médium Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem, bylo ředění provedeno až do 8. stupně (obr. 10). Vzorky z ředících řad byly injekčními stříkačkami nanášeny na Petriho misky a přelity modifikovaným Wilkins-Chalgren agarem s přísadou sojového peptonu. Celý proces probíhal ve sterilním prostředí u hořícího kahanu. Kultivace byla provedena za anaerobních podmínek pomocí aerostatu 48 hodin při teplotě 37 °C.

Po kultivaci byly kolonie spočítány na počítadle. Získané hodnoty byly dvakrát násobeny kvůli aplikaci 0,5 ml na Petriho misky, přičemž vzorec je vztažen na 1 ml. Celkové množství bakterií ve vzorku bylo vypočítáno podle vzorce:

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

P1, P2 = počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných Petriho miskách,

F = převrácená hodnota vyššího ředění.



Obrázek 10: Znárodnění provedení ředící řady do 8 ředění.

Měření optické denzity média

Po kultivaci bifidobakterií na médiích s hmyzími moučkami byla dále stanovena optická denzita, která je přímo úměrná nárůstu bakterií v médiu. Byl použit přístroj Specol 1300 a vlnová délka 620 nm. Nulová hodnota byla nastavena oproti sterilnímu kultivačnímu médiu. Do dalších kyvet bylo postupně pipetováno 1,5 ml zaočkovaného kultivačního média se šváby, cvrčky, moučnými červy a WSP.

Růstová křivka

Abychom získali informaci o nárůstu množství biomasy bifidobakterií na mediích s hmyzí moučkou v závislosti na čase, využili jsme metodu růstové křivky. Bifidobakterie byly naočkovány do médií se čtyřmi typy uhlíku a Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem, který sloužil jako standartní prostředí pro růst bifidobakterií na ideálním médiu. Média byla připravována stejným způsobem jako media pro kultivační stanovení (uvedeno výše). První měření bylo provedeno ihned po zaočkování v čase 0 minut, následujících šest měření bylo prováděno po 30 minutách a posledních deset měření po jedné hodině. Po každém měření se zkumavky ukládaly do vodní lázně při teplotě 37 °C, což je optimální teplota pro růst bifidobakterií. Postupný růst bakterií byl stanoven spektrofotometricky sledováním změn absorbance kultury při 620 nm. za pomoci denzitometru McFarland (typ DEN-1B). Jedná se o optickou metodu, která měří množství světla pohlceného vzorkem v závislosti na vlnové délce. Tento přístroj byl využit z důvodu snadné manipulace a rychlého dosažení výsledků.

4.2.4 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly dále statisticky vyhodnoceny pomocí programu STATISTIKA 12. Významnost rozdílu využitelnosti medií s obsahem čtyř různých druhů uhlíku bifidobakteriemi byla vyhodnocována t -testem při hladině významnosti $p < 0,01$ a $p < 0,05$. Kde byly následně porovnávána média s hmyzem a s WSP, které má ideální složení živného média a bylo sestaveno tak, aby v něm bifidobakterie rostly co nejlépe.

5 Výsledky

5.1 Identifikace bifidobakterií

Orientační identifikace bifidobakterií na úrovni rodů provedená pomocí enzymu fruktozo-6-fosfát fosfoketolázy, kdy došlo k barevné změně použitých roztoků ze žluté na fialovou (obr 11). Tato barevná změna značí pozitivní výsledek zkoušky a je indikátorem rodu *Bifidobacterium spp.*. Identifikace na úrovni kmene pomocí MALDI-TOF vyšla také pozitivně. Z celkových 6 identifikovaných kmenů, došlo k identifikaci s vysokým skórem u pěti kultur, alespoň v jednom opakování. Vysoké skóre je označené zelenou barvou a pohybuje se v rozmezí hodnot 2,00 – 2,20. Jeden kmen byl identifikován pouze se středním skórem, kde se hodnota identifikace pohybuje v rozmezí od 1,70 – 1,99 a je označeno žlutou barvou. V tomto případě se jednalo o *B. pseudocatenulatum* (obr. 12).



Obrázek 11: Pozitivní zkouška fruktozo-6-fosfát fosfoketolázy.

Název vzorku	ID vzorku	Organismus (nejlepší shoda)	Skóre Hodnota	Organismus (druhá nejlepší shoda)	Skóre Hodnota
P3 (+) (B)	20438 (standardní)	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1.84	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1.77
P4 (+) (B)	20438 (standardní)	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1.97	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1.91
P5 (+++)(B)	15700 (standardní)	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.11	<i>Bifidobacterium indicum</i>	2.08
P6 (+++)(B)	15700 (standardní)	<i>Bifidobacterium indicum</i>	2.12	<i>Bifidobacterium breve</i>	2.11
P7 (+) (A)	20083 (standardní)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.89	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	1.85
P8 (+++)(A)	20083 (standardní)	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.03	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2.02
P9 (+++)(A)	15707 (standardní)	<i>Bifidobacterium longum</i>	2.00	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.98
P10 (+) (A)	15707 (standardní)	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.82	<i>Bifidobacterium longum</i>	1.79
P11 (+++)(A)	Lon (standardní)	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.15	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1.86
P12 (+++)(A)	Lon (standardní)	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.20	<i>Bifidobacterium animalis</i>	1.98
P13 (+++)(A)	20082 (standardní)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.19	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.19
P14 (+++)(A)	20082 (standardní)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.15	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	2.15

Obrázek 12: Výsledek MALDI-TOF.

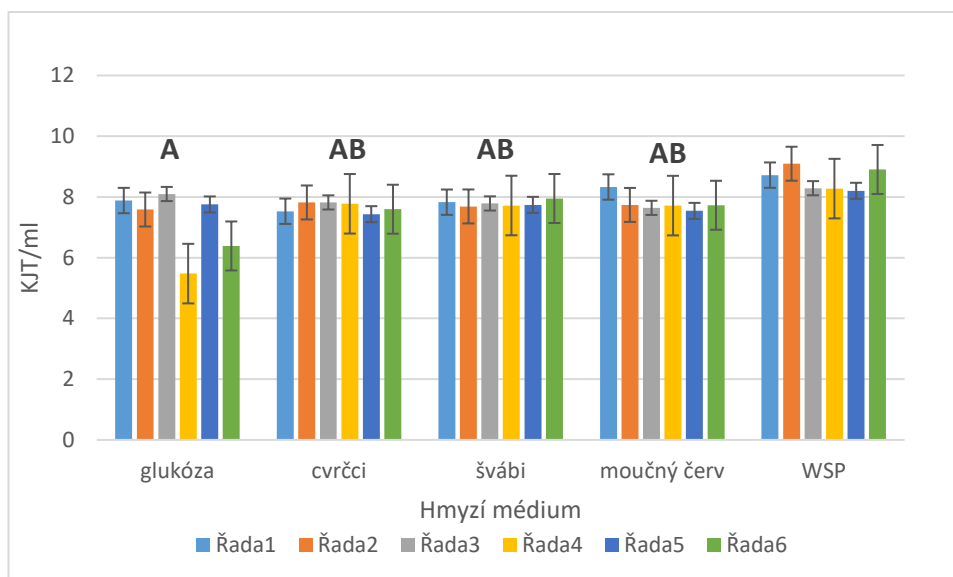
5.2 Růst bifidobakterií v médiu s hmyzí moučkou

Stanovení počtu bifidobakterií po kultivaci pomocí plotnové metody na Petriho miskách ukázala, že nejvyšší bakteriální nárůst byl zaznamenán na Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem (WSP) $8,58 \pm 0,38$ log KTJ/ml, ostatní varianty v podobě medií s hmyzí moučkou a glukózou měly nižší nárůst. Mezi WSP a médii s hmyzem byl zaznamenán statisticky významný rozdíl při hladině významnosti $p < 0,01$ a $p < 0,05$. Média s cvrčky, šváby, moučnými červy mezi sebou nejevily statisticky významný rozdíl při hladině významnosti $p < 0,01$ ani $p < 0,05$. Ze tří medií s hmyzem byl zaznamenán nejvyšší nárůst bifidobakterií na médiu s šváby ($7,78 \pm 0,09$ log KTJ/ml) (tab. 10, obr. 13).

Tabulka 10: Růst bifidobakterií na pěti různých médiích. Hodnocených pomocí kultivace kmenů log KTJ/ml \pm směrodatná odchylka (SD) a absorbance \pm SD.

Typ media	log KTJ/ml	Absorbance
Cvrčci	$7,66 \pm 0,17$ ^{AB}	$0,24 \pm 0,11$ ^{AB}
Švábi	$7,78 \pm 0,09$ ^{AB}	$0,24 \pm 0,07$ ^{AB}
Mouční červy	$7,78 \pm 0,28$ ^{AB}	$0,25 \pm 0,08$ ^{AB}
WSP	$8,58 \pm 0,38$	$1,22 \pm 0,31$
Glukóza	$7,2 \pm 1,04$ ^A	-

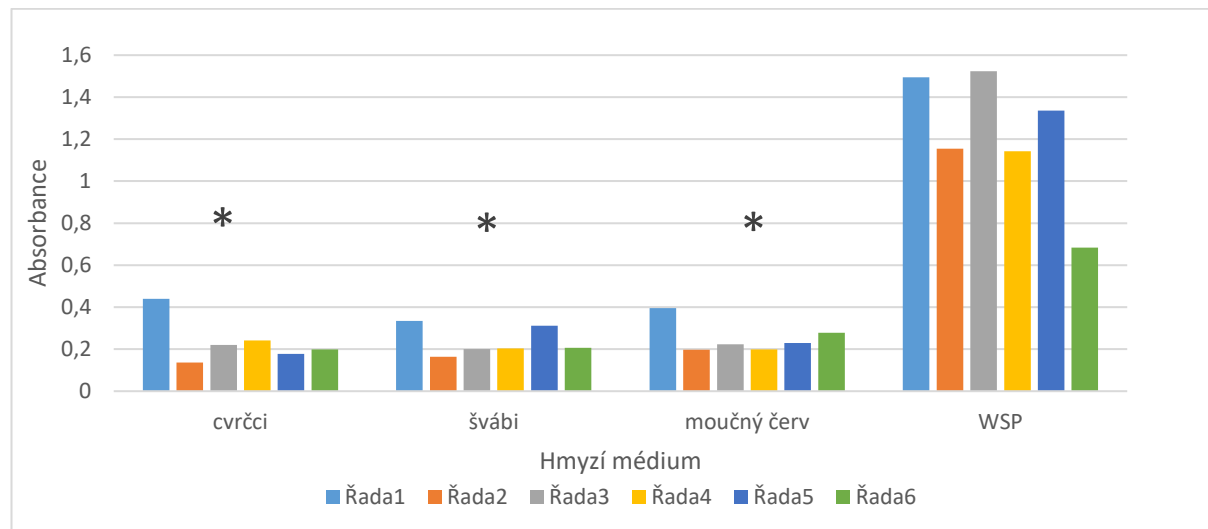
Data log KTJ/ml jsou vyjádřena průměrem šesti bakteriálních kultur \pm SD; Absorbance je vyjádřena jako optická denzita při 620 nm průměrem šesti bakteriálních kultur \pm SD. ^A Statisticky významný rozdíl s porovnáním s Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem ($p < 0,05$); ^B Statisticky významný rozdíl s porovnáním s Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem ($p < 0,01$).



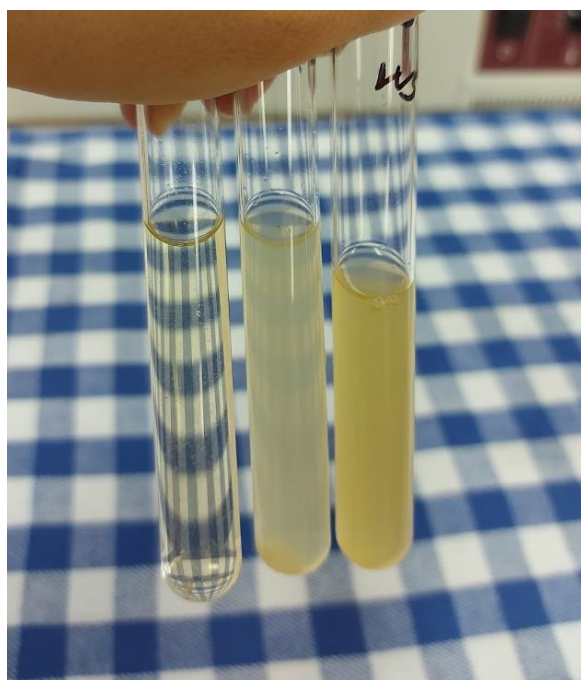
Obrázek 13: Porovnání jednotlivých medií stanovené řadou. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr KTJ/ml \pm SD. Řada 1 - *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, řada 2 - *B. breve*, řada 3 - *B. adolescentis*, řada 4 - *B. longum*, řada 5 - *B. animalis*, řada 6 - *B. bifidum*. ^A Statisticky významný rozdíl s porovnáním s Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem ($p < 0,05$); ^B Statisticky významný rozdíl s porovnáním s Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem ($p < 0,01$).

Výsledky měření optické denzity zaočkovaných a kultivovaných medií, vyšly obdobně jako hodnoty růstu bifidobakterií kultivačním stanovením. Největší denzita byla naměřena na WSP ($1,22 \pm 0,31$ absorbance \pm SD). Bifidobakterie na kultivačních médiích s hmyzem rostly opět velmi podobně a nebyl mezi nimi zaznamenán statisticky významný rozdíl při hladině

významnosti $p < 0,01$ ani $p < 0,05$. Nejvyšší hodnota na mediu s hmyzí moučkou byla zaznamenána při růstu bifidobakterií na moučných červech ($0,25 \pm 0,08$ absorbance \pm SD). Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán při hladině významnosti $p < 0,01$ a $p < 0,05$ mezi hmyzími medii a WSP (tab 10, obr 14). Rozdíl nárůstu bifidobakterií na mediích s hmyzem a WSP byl patrný již při pohledu pouhým okem (obr. 15).



Obrázek 14: Porovnání jednotlivých medií hodnocených optickou densitou při 620 nm přístrojem Specol. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr absorbance. Řada 1 - *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, řada 2 - *B. breve*, řada 3 - *B. adolescentis*, řada 4 - *B. longum*, řada 5 - *B. animalis*, řada 6 - *B. bifidum*. * Statisticky významný rozdíl s porovnáním s Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem ($p < 0,05$) i ($p < 0,01$).



Obrázek 15: Rozdíl nárůstu bifidobakterií na jednotlivých mediích. V levo čisté nezaočkované médium s hmyzem, střed médium s hmyzem po 24 hodinové kultivaci bifidobakterií, v pravu WSP po 24 hodinové kultivaci bifidobakterií.

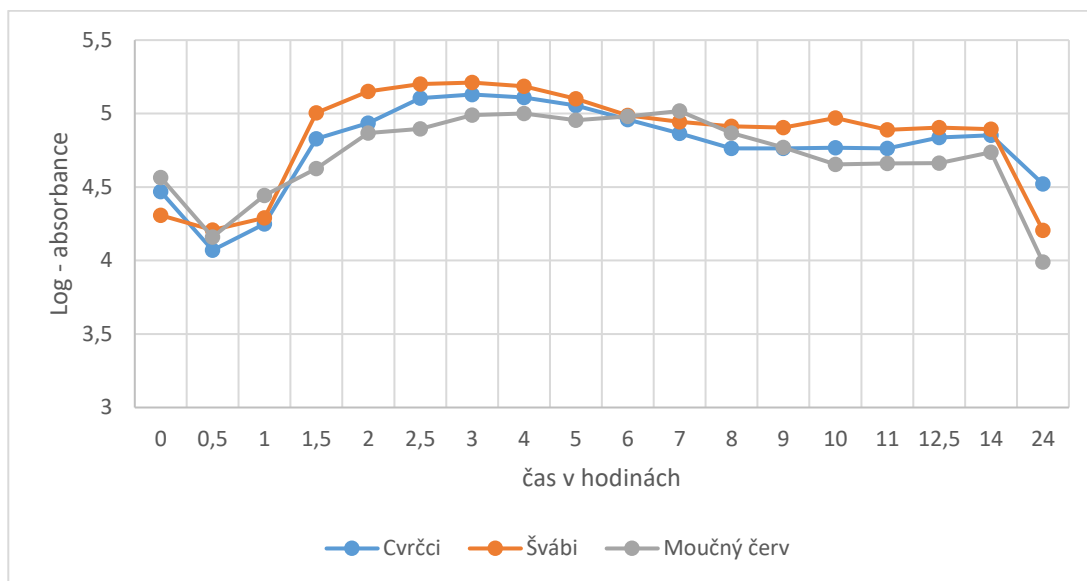
Růst jednotlivých bifidobakteriálních kmenů se na mediích s hmyzem výrazně nelišil. Nejlépe dokázal využít hmyzí moučku jako jediný zdroj uhlíku *B. pseudocatenulatum* a *B. animalis* (tab. 10).

Tabulka 10: Průměr růstu bifidobakteriálních kmenů na mediích s hmyzem (absorbance ± SD).

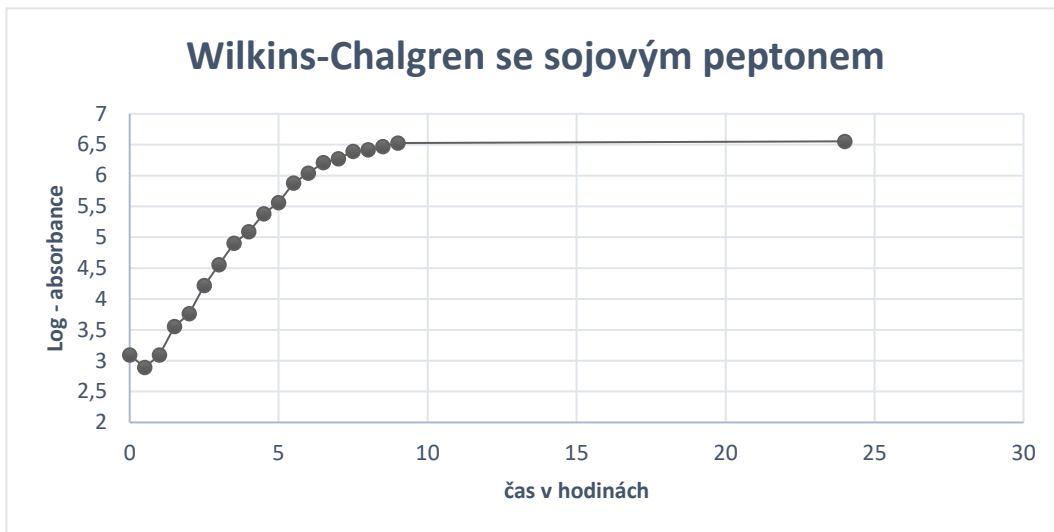
Kmen	Absorbance průměr ± SD
<i>B. pseudocatenulatum</i>	0,39 ± 0,04
<i>B. breve</i>	0,17 ± 0,02
<i>B. adolescentis</i>	0,21 ± 0,01
<i>B. longum</i>	0,22 ± 0,02
<i>B. animalis</i>	0,24 ± 0,06
<i>B. bifidum</i>	0,23 ± 0,04

Data absorbance jsou vyjádřena jako optická denzita při 620 nm. Data jsou průměrem jednotlivých kmenů bifidobakterií na medii s hmyzem a WSP ± SD.

Výsledky růstových křivek podpořily výsledky z měření plotnové kultivace i optické denzity. Ze získaných hodnot je zřejmé, že bifidobakterie nejsou schopné plně využít hmyzí moučku, jako jediný zdroj uhlíku (obr. 16). Když tyto hodnoty opět porovnáme s ideálním médiem WSP je vidět výrazný rozdíl (obr. 17). Z důvodu minimálního růstu bifidobakterií na hmyzích médiích nebyla spočítána specifická růstová rychlost, jež je parametr kvantitativně charakterizující exponenciální fázi růstu.



Obrázek 16: Růstová křivka bifidobakterií na médiu ze cvrčka, švába a moučného červa



Obrázek 17: Růstová křivka bifidobakterií na ideálním médiu Wilkins-Chalgren se sojovým peptonem.

6 Diskuze

Díky stále rostoucí populaci se předpokládá, že jedlý hmyz do budoucna bude nedílnou součástí lidské stravy jako hlavního zdroje proteinu. A to nejen v oblastech, kde je již v současné době běžnou součástí jídelníčků tamní populace, ale jeho konzumace vzroste také v západních zemích, Evropu nevyjímaje. Tento fakt je odůvodněn hned několika předpoklady, kterými jsou snaha o udržitelné hospodářství, omezení budoucího nedostatku potravin a tím související hladomor. Jedním z hlavních důvodů je také snížení ekologické stopy na produkci proteinu, tím i omezení vyčerpávání půdní kapacity a snížení spotřeby vody nutné k produkci na kilogram proteinu (Oonincx & de Boer 2012; Gahukar 2016).

Určité složky stravy, které jsou pro člověka nestravitelné např. oligosacharidy, jsou dobře tráveny bakteriemi, které tyto složky přeměňují na energii a jiné metabolity (Kasubuchi et al. 2015). Z tohoto pohledu jsou nejvýznamnějšími bakteriemi v lidském těle rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Tyto dva rody jsou nejvíce prozkoumanými probiotiky z hlediska lidského zdraví a mají schopnost využívat prebiotického materiálu (Dahiya et al. 2017).

Námi dosažené výsledky nepotvrdily hypotézu, že hmyz může působit prebioticky. Nejvýraznější nárůst kolonií byl zaznamenán na bujónu Wilkins-Chalgren s přidávkou sojového peptonu, kde hodnota byla $8,58 \pm 0,38$ log KTJ/ml. To bylo způsobeno složením živného média, které bylo sestaveno pro ideální růst bifidobakterií. Oproti tomu živná média s obsahem hmyzího chitinu nebyla nijak obohacována o živiny. Zjištěné výsledky nevykazovaly výrazný růst na médiích s hmyzem. K podobným hodnotám výzkumu dospěla i *in vitro* studie Kowalczewski et al. (2021), která primárně hodnotila nutriční hodnotu a biologickou aktivitu bezlepkového chleba obohaceného cvrčím práškem a mimo jiné i vliv tohoto chleba na několik bakteriálních rodů. V rámci této studie bylo provedeno *in vitro* trávení, po kterém byl proveden účinek tohoto chleba na bakteriální rody *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Escherichia coli*. Získané výsledky ukazují, že zde nebyl pozorován žádný inhibiční účinek chleba obohaceného cvrčky. Lze tedy předpokládat, že přidání cvrččí moučky do potravin nebrání růstu mikrobiomu. V našem případě hmyzí moučka neprošla procesem trávení a z návaznosti na tuto studii je pravděpodobné, že by tento krok nemusel mít značnější vliv ani v našem případě. Studie Dong et al. (2020) se zabývala vlivem chitinu z krevet na složení střevní mikrobioty. Bylo zjištěno, že chitinové frakce významně nemění celkový počet druhů nebo množství střevní mikrobioty. To je ve shodě s námi dosaženými výsledky obdobně jako ve studii Kowalczewski et al. (2021). Jsou zde ovšem výzkumy Borrelli et al. (2017); Stull et al. (2018); Carvalho et al. (2019), které ukazují, že hmyzí moučka může podporovat růst určitých bakteriálních rodů.

Námi testovaný moučný červ nejevil významný vliv na růst bifidobakterií oproti ostatním testovaným druhům hmyzu. Podle Carvalho et al. (2019), vykazuje *Bifidobacterium* spp. podobné výsledky růstu jak na *in vitro* natrávené hmyzí moučce, tak i na nenatrávené. Výrazný růst bifidobakterií byl zaznamenán pouze na kontrole stejně jako v našem testu. Obecně měla ovšem tato moučka pozitivní dopad na střevní bakterie, jelikož podporovala růst *Bacteroidaceae* a *Prevotellaceae*. Možným důvodem snížené využitelnosti moučky z moučného červa bifidobakteriemi oproti *Bacteroidaceae* a *Prevotellaceae* může být ten, že moučný červ má poměrně vysoké zastoupení proteinů. *Bacteroidaceae* a *Prevotellaceae* je

díky svým proteolytickým vlastnostem mohou využívat k vlastnímu růstu oproti bifidobakteriím (Gibson & Macfarlane 1988; Griswold et al. 1999).

Přestože jsme nezjistili prebiotický efekt testovaných vzorků na bifidobakterie, výsledky dvou nedávných studií Borrelli et al. (2017); Stull et al. (2018), naopak uvádějí, že hmyzí prášek nejenže nenarušuje mikrobiom střev, ale dokonce může být potencionálním prebiotikem. Tyto dvě studie tak podporují hypotézu naší práce. Bylo také zjištěno, že strava obohacená o cvrčky má prebiotický efekt na bifidobakterie, jejichž obsah vzrostl ve vzorcích stolice téměř 6×, ve srovnání s běžnou stravou. Ze sledovaných kmenů, zde byl největší nárůst zaznamenán u kmene *B. animalis*. Nicméně tyto výsledky jsou v přímém rozporu s výsledky, které jsme zjistili my, kdy cvrččí moučka neměla nijak významný vliv na nárůst *B. animalis*. Naproti tomu *B. pseudocatenulatum* měl absorpční téměř dvounásobnou a jeho využitelnost média se cvrččí moučkou byla výrazně vyšší jak u *B. animalis*.

Takto výrazná aktivita může být zapříčiněna přítomností chitináz, které dle genomové sekvence publikované Pokusaeva et al. (2011) obsahují především *B. pseudocatenulatum* (DSM 20 438) a *B. longum subsp. longum* (NCC 2 705). Na rozdíl od *B. pseudocatenulatum*, je *B. longum subsp. longum* jiného sbírkového kmenu, než byl využit v této práci (ATCC 15 707) a je možné, že obsahuje méně aktivní chitinázu. Hodnota optické denzity *B. longum subsp. longum* v této práci byla $0,22 \pm 0,02$ absorbance \pm SD, což je jednou ze středních hodnot a od ostatních kmenů se výrazně nelišila.

Jak ukazují výsledky Borrelli et al. (2017), chitin může mít prebiotické vlastnosti v *in vivo* podmínkách na nosnicích. Bylo zjištěno, že chitin jako jeden z hlavních biopolymerů v hmyzí moučce, spolu s bakteriemi ve střevech nosnic, mohou spolupracovat a tvořit SCFA. Fermentovatelný chitin jako potenciální prebiotikum může u nosnic podporovat mikrobiotu a zdraví nosnic. Je zde nutno podotknout, že tato studie se zaměřila na bakterie kmény *Bacteroides plebeius*, *Elusimicrobium minutum*, *Alkaliphilus transvaalensis*, *Christensenella minuta*, *Vallitalea guaymasensis* a *Flavonifractor plautii* a ne na bifidobakterie a že nosnice mají acidickou chitinázu v žaludku a ve střevě, která štěpí chitin za vzniku chitooligosacharidů (COS), které jsou pro bakterie lépe stravitelné (Tabata et al. 2017).

Chitinolytické enzymy se ovšem u lidské populace vyskytují přibližně u 80 % přičemž většina jedinců nemá tyto enzymy plně aktivní (Boot et al. 2005; Paoletti et al. 2007). Tím pádem nemůže dojít k naštěpení na polysacharidy, které by byly následně střevním bakteriálním společenstvím využity. Důkazem toho, že bifidobakterie mohou využívat naštěpený chitin, je studie Józefiak et al. (2020) provedená na brojlerech. Brojlerům byl podáván potměník moučný (*Tenebrio molitor*) a potměník brazilský (*Zophobas morio*) a pozorován jejich vliv na mikrobiom. Podávání potměníka brazilského vedlo k významnému zvýšení relativního množství rodu *Bifidobacteriaceae* s nejvyšším zastoupením *Bifidobacterium pseudolongum*. Tyto výsledky naznačují, že pro jedince, se schopností štěpení chitinu, by chitin mohl být potenciálním prebiotikem. Studie Selenius et al. (2018) došla k poznatku, že prebiotické účinky chitinu při konzumaci hmyzu závisí nejen na tom, jak dobře je chitin štěpen trávicími enzymy, ale také na jak dlouhé řetězce jsou molekuly derivovány a jakého druhu jsou postranní řetězce. COS sledované v práci Selenius et al. (2018) působily prebioticky na *Lactobacillus rhamnosus* a inhibovaly růst *Escherichia coli*. Tato studie podporuje výsledky Lee et al. (2002) kde byl zkoumán prebiotický potenciál COS na růst bakterií. COS stimulovaly růst většiny *Lactobacillus* ssp. a *B. bifidum* KCTC 3440. Dále bylo zjištěno, že množství růstu a specifická rychlost růstu

B. bifidum se zvyšuje se zvyšující se koncentrací COS. Studie Šimůnek et al. (2010), také prokázala, že COS nevykazuje inhibiční účinek na bifidobakterie a zde byla dokonce pozorována zvýšená rychlost růstu v případě *B. bifidum*, *B. catenulatum* a *B. infantis*. Z našich výsledků, zaznamenávající růstovou křivku, byl patrný pouze neinhibiční účinek, ale ne prebiotický a specifická růstová rychlost z našich nízkých hodnot nebyla spočítána. Důvodem, proč v našem měření nebyl zaznamenán prebiotický efekt může být, že jsme používali čistou hmyzí moučku a ne COS jako ve studii Lee et al. (2002).

Dle dostupných údajů a z našich analýz je patrné, že hmyzí chitin nepůsobí inhibičním účinkem na růst bifidobakteriálních kultur. Tyto kultury ovšem nejsou schopny využívat chitin z hmyzích mouček jako jediný zdroj uhlíku. Jedná se pro ně o příliš složitou strukturu, kterou tyto mikroorganismy nedokáží naštěpit. Jako zdroj prebiotik pro bifidobakterie je možné využívat naštěpený hmyzí chitin, který ovšem většina lidské populace naštěpit nedokáže, z důvodu absence či snížené aktivity chitinolytických enzymů.

7 Závěr

Cílem práce bylo zjistit, jak chitin v těle jedlého hmyzu může ovlivňovat *in vitro* růst bifidobakterií a mít tak prebiotický účinek. Výsledky naznačují, že chitin obsažený v hmyzí moučce nepůsobí na námi testované kmeny bifidobakterií a nebyl zaznamenán prebiotický účinek.

Hmyz jako potrava budoucnosti má i tak velký potenciál, především z pohledu nahrazení současných bílkovinných zdrojů a také jako udržitelná potravina. V návaznosti na tuto práci, by bylo zajímavé provést *in vitro* trávení hmyzí moučky pomocí lidské AMCase a na takto natráveném materiálu sledovat růst bifidobakteriálních kmenů. Především z toho důvodu, aby bylo patrné, jak chitin mohou využívat střevní mikroorganismy lidí, kteří mají funkční chitinolytické enzymy a zda by pro tyto osoby mohl být hmyz prebiotikem.

8 Literatura

- Adámek M, Adámková A, Kouřimská L, Mlček J, Vojáčková K, Orsavová J, Bučková M, Faměra O, Búran M. 2020. Sensory evaluation and acceptance of food made of edible insects. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences* **14**:921–928.
- Adámková A, Mlček J, Kouřimská L, Borkovcová M, Bušina T, Adámek M, Bednářová M, Krajsa J. 2017. Nutritional potential of selected insect species reared on the island of Sumatra. *International Journal of Environmental Research and Public Health* (e521) DOI: 10.3390/ijerph14050521.
- Adi J-L, Martinez JJI. 2017. The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. *Journal of Food Composition and Analysis* **62**:184–188.
- Adrangi S, Faramarzi MA. 2013. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances* **31**:1786–1795.
- Agrawal S, Kelkenberg M, Begum K, Steinfeld L, Williams CE, Kramer KJ, Beeman RW, Park Y, Muthukrishnan S, Merzendorfer H. 2014. Two essential peritrophic matrix proteins mediate matrix barrier functions in the insect midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **49**:24–34.
- Al-Khafaji AH, Jepsen SD, Christensen KR, Vignsnæs LK. 2020. The potential of human milk oligosaccharides to impact the microbiota-gut-brain axis through modulation of the gut microbiota. *Journal of Functional Foods* **74**:104–176.
- Arumugam M et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**:174–180.
- Bäckhed F et al. 2015. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe* **17**:690–703.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI, Backhed F. 2005. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *American Association for the Advancement of Science* **307**:1915–1920.
- Beddington J. 2010. Global food and farming futures. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (e365) DOI: 10.1098/rstb.2010.0181.
- Bednářová M, Borkovcová M, Mlček J, Rop O, Zeman L. 2013. Edible insects - Species suitable for entomophagy under condition of Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **61**:587–593.
- Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Human Development* **86**:13–15.
- Bierbaum S, Nickel R, Koch A, Lau S, Deichmann KA, Wahn U, Superti-Furga A, Heinzmann A. 2005. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **172**:1505–1509.
- Blaut M. 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition* **41**:11–16.
- Boot RG, Blommaert EFC, Swart E, Ghauharali-van der Vlugt K, Bijl N, Moe C, Place A, Aerts JMFG. 2001. Identification of a Novel Acidic Mammalian Chitinase Distinct from Chitotriosidase. *Journal of Biological Chemistry* **276**:6770–6778.
- Boot RG, Bussink AP, Verhoek M, de Boer PAJ, Moorman AFM, Aerts JMFG. 2005. Marked differences in tissue-specific expression of chitinases in mouse and man. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **53**:1283–1292.
- Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F, Chiariotti L, Nizza A, Lembo F, Fioretti A. 2017. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut

- microbiota composition and SCFAs production in laying hens. *Scientific Reports* (e16269) DOI: 10.1038/s41598-017-16560-6.
- Boudot C, Courtioux B. 2021. Nutritional and environmental interests of entomophagy. *Actualites Pharmaceutiques* **60**:31–34.
- Brzezinska MS, Jankiewicz U, Walczak M. 2013. Biodegradation of chitinous substances and chitinase production by the soil actinomycete *Streptomyces rimosus*. *International Biodeterioration and Biodegradation* **84**:104-110.
- Bukkens SGF. 1997. The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food Nutrition* **36**:287–319.
- Bussink AP, Speijer D, Aerts JMFG, Boot RG. 2007. Evolution of mammalian chitinase(-like) members of family 18 glycosyl hydrolases. *Genetics* **177**:959–970.
- Bussink AP, van Eijk M, Renkema GH, Aerts JM, Boot RG. 2006. The Biology of the Gaucher Cell: The Cradle of Human Chitinases. *International Review of Cytology* **252**:71-128.
- Bustamante M, Oomah BD, Oliveira WP, Burgos-Díaz C, Rubilar M, Shene C. 2020. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. *Folia Microbiologica* **65**:245-264.
- Cannon PF, Hywel-Jones NL, Maczey N, Norbu L, Tshitila, Samdup T, Lhendup P. 2009. Steps towards sustainable harvest of *Ophiocordyceps sinensis* in Bhutan. *Biodiversity and Conservation* **18**:2263–2281.
- Carvalho NM, Walton GE, Poveda CG, Silva SN, Amorim M, Madureira AR, Pintado ME, Gibson GR, Jauregi P. 2019. Study of in vitro digestion of *Tenebrio molitor* flour for evaluation of its impact on the human gut microbiota. *Journal of Functional Foods* **59**:101–109.
- Cerritos R. 2009. Insects as food: An ecological, social and economical approach. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4**:1-10.
- Chen HC, Chang CC, Mau WJ, Yen LS. 2002. Evaluation of *N*-acetylchitooligosaccharides as the main carbon sources for the growth of intestinal bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **209**:53–56.
- Cheng LK, O’Grady G, Du P, Egbuji JU, Windsor JA, Pullan AJ. 2010. Gastrointestinal system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **2**:65–79.
- Chu DM, Ma J, Prince AL, Antony KM, Seferovic MD, Aagaard KM. 2017. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nature Medicine* **23**:314–326.
- Clark GL, Smith AF. 1936. X-ray diffraction studies of chitin, chitosan, and derivatives. *Journal of Physical Chemistry* **40**:863–879.
- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. 2016. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Scientific Reports* (e23129) DOI: 10.1038/srep23129.
- Cummings JH, Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* **70**:443–459.
- Cummings JH, MacFarlane GT. 1997. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition* **16**:3-11.
- Dahiya DK, Renuka, Puniya M, Shandilya UK, Dhewa T, Kumar N, Kumar S, Puniya AK, Shukla P. 2017. Gut microbiota modulation and its relationship with obesity using prebiotic fibers and probiotics: A review. *Frontiers in Microbiology* (e563) DOI: 10.3389/fmicb.2017.00563.
- de Keersmaecker SCJ, Verhoeven TLA, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. 2006. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella*

- typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters* **259**:89–96.
- Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology* **10**:37–54.
- Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* **27**:997–1010.
- Dinan TG, Cryan JF. 2012. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology* **37**:1369–1378.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:11971–11975.
- Dong L, Ariëns RMC, Tomassen MM, Wichers HJ, Govers C. 2020. In Vitro Studies Toward the Use of Chitin as Nutraceutical: Impact on the Intestinal Epithelium, Macrophages, and Microbiota. *Molecular Nutrition and Food Research* **64**:1-11.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, LesDethlefsen, Michael S, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2016. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Journal of Spacecraft Technology* **27**:25–30.
- Eizaguirre I, Urkia NG, Asensio AB, Zubillaga I, Zubillaga P, Vidales C, Garcia-Arenzana JM, Aldazabal P. 2002. Probiotic supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *Journal of Pediatric Surgery* **37**:699–702.
- Fandi KG, Ghazali HM, Yazid AM, Raha AR. 2001. Purification and N-terminal amino acid sequence of fructose-6-phosphate phosphoketolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Letters in Applied Microbiology* **32**:235–239.
- FAO. 2010. Forest insects as food: humans bite back. RAP Publication, Bangkok Thailand.
- Farah D, Abdullah SH, Muhammad I, Iqbal QJ. 2016. Chitinase production in organisms: A review. *Punjab Univ. J. Zool* **31**:101–106.
- Fernández L, Langa S, Martín V, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. 2013a. The microbiota of human milk in healthy women. *Cellular and Molecular Biology* **59**:31–42.
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. 2013b. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* **69**:1–10.
- Finke MD. 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology* **26**:105–115.
- Finke MD. 2013. Complete Nutrient Content of Four Species of Feeder Insects. *Zoo Biology* **32**:27–36.
- Fioramonti J, Theodorou V, Bueno L. 2003. Probiotics: What are they? What are their effects on gut physiology? *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology* **17**:711–724.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**:365–378.
- Gahukar RT. 2011. Entomophagy and human food security. *International Journal of Tropical Insect Science* **31**:129–144.
- Gahukar RT. 2016. *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Academic Press. United States.
- Garrido D, Ruiz-Moyano S, Lemay DG, Sela DA, German JB, Mills DA. 2015. Comparative transcriptomics reveals key differences in the response to milk oligosaccharides of infant gut-associated bifidobacteria. *Scientific Reports* (e13517) DOI: 10.1038/srep13517.
- Gerber PJ, Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Organization Food and Agriculture. 2013. Tackling climate change through livestock: A global assessment of emissions and mitigation opportunities. FAO, Rome.

- Ghosh S, Jung C, Meyer-Rochow VB. 2016. Nutritional value and chemical composition of larvae, pupae, and adults of worker honey bee, *Apis mellifera ligustica* as a sustainable food source. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **19**:487–495.
- Gianfrancesco F, Musumeci S. 2004. The evolutionary conservation of the human chitotriosidase gene in rodents and primates. *Cytogenetic and Genome Research* **105**:54–56.
- Gibson GR et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **14**:491–502.
- Gibson SAW, Macfarlane GT. 1988. Studies on the proteolytic activity of *Bacteroides fragilis*. *Journal of General Microbiology* **134**:19–27.
- Griswold KE, White BA, Mackie RI. 1999. Diversity of extracellular proteolytic activities among *Prevotella* species from the rumen. *Current Microbiology* **39**:187–194.
- Guarner F et al. 2008. World Gastroenterology Organisation practice guideline: Probiotics and prebiotics. *South African Gastroenterology Review* **6**:14–25.
- Gupta N, Jangid AK, Pooja D, Kulhari H. 2019. Inulin: A novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications. *International Journal of Biological Macromolecules* **132**:852–863.
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, Javed S. 2013. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences* **5**:21–29.
- Hanboonsong Y, Jamjanya T, Durst PB. 2013. Six-legged livestock: edible insect farming, collection and market in Thailand. FAO. Bangkok.
- Havenaar R. 2011. Intestinal health functions of colonic microbial metabolites: A review. *Beneficial Microbes* **2**:103–114.
- Heshmati F, Yazdanparast SA, Moosavi SA, Dargahi H. 2011. Aspects of bacterial colonization in newborn babies. *African Journal of Microbiology Research* **5**:2234–2240.
- Hodkinson ID. 1992. Global Insect Diversity Revisited. *Journal of Tropical Ecology* **8**:505–508.
- Hooper L v., Midwedt T, Gordon JI. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* **22**:283–307.
- House J. 2016. Consumer acceptance of insect-based foods in the Netherlands: Academic and commercial implications. *Appetite* **107**:47–58.
- Huis A van. 2003. Insects as food in Sub-Saharan Africa. *Insect Science and its Application* **23**:163–185.
- Huis A van. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology* **58**:563–583.
- Huis A van, Itterbeeck J van, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. 2013. Edible insects Future prospects for food and feed security. FAO. Rome.
- Hyun SH, Kwon KH, Park KH, Jeong HC, Kwon O, Tindwa H, Han YS. 2012. Evaluation of nutritional status of an edible grasshopper, *Oxya chinensis formosana*. *Entomological Research* **42**:284–290.
- Islam SU. 2016. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine* (e2658) DOI: 10.1097/MD.0000000000002658.
- Jang MK, Kong BG, Jeong Y il, Lee CH, Nah JW. 2004. Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **42**:3423–3432.
- Johnstone C, Hendry C, Farley A, McLafferty E. 2014. The digestive system: part 1. *Nursing standard* **28**:37–45.

- Józefiak A, Benzertiha A, Kierończyk B, Łukomska A, Wesołowska I, Rawski M. 2020. Improvement of cecal commensal microbiome following the insect additive into chicken diet. *Animals* (e577) DOI: 10.3390/ani10040577.
- Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. 2015. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients* **7**:2839–2849.
- Kaya M, Baran T, Asan-Ozusaglam M, Cakmak YS, Tozak KO, Mol A, Menten A, Sezen G. 2015. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **20**:168–179.
- Korpela K, Vos de WM. 2018. Early life colonization of the human gut: microbes matter everywhere. In *Current Opinion in Microbiology* **44**:70-78.
- Kouřimská L, Adámková A. 2016. Nutritional and sensory quality of edible insects. *NFS Journal* **4**:22–26.
- Kowalczewski PŁ, Gumienna M, Rybicka I, Górna B, Sarbak P, Dziedzic K, Kmiecik D. 2021. Nutritional Value and Biological Activity of Gluten-Free Bread Enriched with Cricket Powder. *Molecules* (e1184) DOI: 10.3390/molecules26041184.
- Kramer KJ, Hopkins TL, Schaefer J. 1995. Applications of solids NMR to the analysis of insect sclerotized structures. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **25**:1067–1080.
- Kulma M, Kouřimská L, Homolková D, Božik M, Plachý V, Vrabec V. 2020a. Effect of developmental stage on the nutritional value of edible insects. A case study with *Blaberus craniifer* and *Zophobas morio*. *Journal of Food Composition and Analysis* (e103570) DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103570.
- Kulma M, Kouřimská L, Plachý V, Božik M, Adámková A, Vrabec V. 2019. Effect of sex on the nutritional value of house cricket, *Acheta domestica* L. *Food Chemistry* **272**:267–272.
- Kulma M, Tůmová V, Fialová A, Kouřimská L. 2020b. Insect consumption in the Czech Republic: what the eye does not see, the heart does not grieve over. *Journal of Insects as Food and Feed* **6**:525–535.
- Lee HW, Park YS, Jung JS, Shin WS. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus* sp. *Anaerobe* **8**:319–324.
- Ley RE et al. 2016. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* **320**:1647-51.
- Li L, Xie B, Dong C, Hu D, Wang M, Liu G, Liu H. 2015. Rearing *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) in the “lunar Palace 1” during a 105-day multi-crew closed integrative BLSS experiment. *Life Sciences in Space Research* **7**:9–14.
- Li L, Zhao Z, Liu H. 2013. Feasibility of feeding yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L.) in bioregenerative life support systems as a source of animal protein for humans. *Acta Astronautica* **92**:103–109.
- Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews* **19**:315–337.
- Liu X, Cooper AMW, Zhang J, Zhu KY. 2019a. Biosynthesis, modifications and degradation of chitin in the formation and turnover of peritrophic matrix in insects. *Journal of Insect Physiology* **114**:109–115.
- Liu Y et al. 2019b. The Perturbation of Infant Gut Microbiota Caused by Cesarean Delivery Is Partially Restored by Exclusive Breastfeeding. *Frontiers in Microbiology* **10**:598.
- Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* **42**:D490–D495.

- Longvah T, Mangthya K, Ramulu P. 2011. Nutrient composition and protein quality evaluation of eri silkworm (*Samia ricinii*) prepupae and pupae. *Food Chemistry* **128**:400–403.
- Looy H, Dunkel F v., Wood JR. 2014. How then shall we eat? Insect-eating attitudes and sustainable foodways. *Agriculture and Human Values* **31**:131–141.
- Macfarlane GT, Macfarlane S. 2012. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of aoac International* **95**:50–60.
- Macfarlane S, Macfarlane GT, Cummings JH. 2006. Review article: Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **24**:701-7014.
- Madan K, Madan M, Sharma S, Paliwal S. 2020. Chitinases: Therapeutic Scaffolds for Allergy and Inflammation. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* **14**:46–57.
- Mancini S, Moruzzo R, Riccioli F, Paci G. 2019. European consumers' readiness to adopt insects as food. *Food Research International* **122**:661-678.
- Mangell P, Nejdfor P, Jeppsson B. 2002. *Lactobacillus plantarum* 299v Inhibits Intestinal Permeability. *Digestive Diseases* **47**:511–516.
- Markowiak P, Ślizewska K. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* (e1021) DIO: 10.3390/nu9091021.
- Maukonen J, Saarela M. 2015. Human gut microbiota: Does diet matter? *Proceedings of the Nutrition Society* **74**:23–36.
- Merzendorfer H, Zimoch L. 2003. Chitin metabolism in insects: Structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *Journal of Experimental Biology* **206**:4393–4412.
- Mohan K, Ganesan AR, Muralisankar T, Jayakumar R, Sathishkumar P, Uthayakumar V, Chandirasekar R, Revathi N. 2020. Recent insights into the extraction, characterization, and bioactivities of chitin and chitosan from insects. *Trends in Food Science and Technology* **105**:17–42.
- Montowska M, Kowalczewski PŁ, Rybicka I, Fornal E. 2019. Nutritional value, protein and peptide composition of edible cricket powders. *Food Chemistry* **289**:130–138.
- Moossavi S, Azad MB. 2020. Origins of human milk microbiota: new evidence and arising questions. *Gut microbes* (e1667722) DIO: 10.1080/19490976.2019.1667722.
- Nakagaki BJ, Defoliart GR. 1991. Comparison of Diets for Mass-Rearing *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) as a Novelty Food, and Comparison of Food Conversion Efficiency with Values Reported for Livestock. *Journal of Economic Entomology* **84**:891–896.
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 2017. Your Digestive System & How it Works. NIDDKD. Maryland, USA. Available from <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/digestive-system-how-it-works> (accessed February, 2021).
- Oonincx DGAB, de Boer IJM. 2012. Environmental Impact of the Production of Mealworms as a Protein Source for Humans – A Life Cycle Assessment. *PLoS ONE* (e51145) DOI: 10.1371/journal.pone.0051145.
- Oonincx DGAB, van Itterbeeck J, Heetkamp MJW, van den Brand H, van Loon JJA, van Huis A. 2010. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *Public Library of Science* **5**:1–7.
- Palframan RJ, Gibson GR, Rastall RA. 2003. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology* **4**:71–75.
- Pandey KR, Naik SR, Vakil B v. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* **52**: 7577-7587.

- Paoletti MG, Norberto L, Damini R, Musumeci S. 2007. Human gastric juice contains chitinase that can degrade chitin. *Annals of Nutrition and Metabolism* **51**:244–251.
- Park BK, Kim MM. 2010. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *International Journal of Molecular Sciences* **11**:5152-5164.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* **100**:1171–1185.
- Payne CLR, Scarborough P, Rayner M, Nonaka K. 2016. Are edible insects more or less “healthy” than commonly consumed meats? A comparison using two nutrient profiling models developed to combat over- and undernutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* **70**:285–291.
- Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes and Nutrition* **6**:285-306.
- Premalatha M, Abbasi T, Abbasi T, Abbasi SA. 2011. Energy-efficient food production to reduce global warming and ecodegradation: The use of edible insects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**:4357–4360.
- Qin J et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**:59–65.
- Raabe D, Romano P, Sachs C, Fabritius H, Al-Sawalmih A, Yi SB, Servos G, Hartwig HG. 2006. Microstructure and crystallographic texture of the chitin-protein network in the biological composite material of the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*. *Materials Science and Engineering A* **421**:143–153.
- Ramos-Elorduy J. 2009. Anthro-entomophagy: Cultures, evolution and sustainability. *Entomological Research* **39**:271–288.
- Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JMFG. 1995. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *Journal of Biological Chemistry* **270**:2198-2202.
- Reyman M et al. 2019. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nature Communications* (e4997) DIO: 10.1038/s41467-019-13014-7.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC. 2019. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms* **7**: 1-14.
- Roberfroid MB. 2007. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. *Journal of Nutrition* **137**:2493–2502.
- Rodríguez JM. 2014. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in Nutrition* **5**:779–784.
- Rumpold BA, Schlüter OK. 2013. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular Nutrition & Food Research* **57**:802–823.
- Scalaferrri F et al. 2013. Gut Microbial Flora, Prebiotics, and Probiotics in IBD: Their Current Usage and Utility. *BioMed Research International* (e435268) DIO: 10.1155/2013/435268
- Schell MA et al. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:14422–14427.
- Schrezenmeir J, Vrese M de. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *American Society for Clinical Nutrition* **73**:1S-4S.
- Selenius O, Korpela J, Salminen S, Gomez Gallego C. 2018. Effect of Chitin and Chitooligosaccharide on In vitro Growth of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Escherichia coli* TG. *Research Article Applied food biotechnology* **5**:163–172.

- Senn V, Bassler D, Choudhury R, Scholkmann F, Righini-Grunder F, Vuille-dit-Bile RN, Restin T. 2020. Microbial Colonization From the Fetus to Early Childhood—A Comprehensive Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (e 10:573735) DOI: 10.3389/fcimb.2020.573735.
- Shahrul S, Rastall R. 2011. Prebiotics: Metabolism, Structure, and Function. *Functional Food Review* **3**:93–106.
- Shao Y et al. 2019. Stunted microbiota and opportunistic pathogen colonization in caesarean-section birth. *Nature* **574**:117–121.
- Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X. 2010. What is the Chinese caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* (Ophiocordycipitaceae)? *Mycology* **1**:228–236.
- Šimůnek J, Koppová I, Filip L, Tishchenko G, Bełżecki G. 2010. The Antimicrobial Action of Low-Molar-Mass Chitosan, Chitosan Derivatives and Chitooligosaccharides on Bifidobacteria. *Folia Microbiol* **4**:379–382.
- Smarzyński K, Sarbak P, Musiał S, Jezowski P, Piatek M, Kowalczewski PT. 2019. Nutritional analysis and evaluation of the consumer acceptance of pork pâté enriched with cricket powder-preliminary study. *Open Agriculture* **4**:159–163.
- Smil V. 2002. Eating meat evolution patterns and consequence. *Population and Development Review* **28**:599–639.
- Smit EN, Muskiet FAJ, Boersma ER. 2004. The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: A review. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **71**:241–250.
- Smith ME, Motron DG. 2010. *The Digestive System*. Livingstone: Churchill Livingstone. Birmingham, UK.
- Sonnenburg JL, Xu J, Leip DD, Chen CH, Westover BP, Weatherford J, Buhler JD, Gordon JI. 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *American Association for the Advancement of Science* **307**:1955–1959.
- Stull VJ, Finer E, Bergmans RS, Febvre HP, Longhurst C, Manter DK, Patz JA, Weir TL. 2018. Impact of Edible Cricket Consumption on Gut Microbiota in Healthy Adults, a Double-blind, Randomized Crossover Trial. *Scientific Reports* (e 10762) DOI: 10.1038/s41598-018-29032-2
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Doré J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:4799–4807.
- Suzuki R, Katayama T, Kim BJ, Wakagi T, Shoun H, Ashida H, Yamamoto K, Fushinobu S. 2010. Crystal structures of phosphoketolase: Thiamine diphosphate-dependent dehydration mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **285**:34279–34287.
- Tabata E, Kashimura A, Wakita S, Ohno M, Sakaguchi M, Sugahara Y, Kino Y, Matoska V, Bauer PO, Oyama F. 2017. Gastric and intestinal proteases resistance of chicken acidic chitinase nominates chitin-containing organisms for alternative whole edible diets for poultry. *Scientific Reports* **7**:1–11.
- Tanaka M, Nakayama J. 2017, October 1. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergology International* **66**:515–522.
- Tidjani Alou M, Lagier JC, Raoult D. 2016. Diet influence on the gut microbiota and dysbiosis related to nutritional disorders. *Human Microbiome Journal* **1**:3–11.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. 2007. The Human Microbiome Project. *Nature* **449**:804–810.
- Turroni F et al. 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:1534–1545.

- Turrone F, Ribbera A, Foroni E, van Sinderen D, Ventura M. 2008. Human gut microbiota and bifidobacteria: From composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **94**:35–50.
- Tzompa-Sosa DA, Yi L, van Valenberg HJF, van Boekel MAJS, Lakemond CMM. 2014. Insect lipid profile: Aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International* **62**:1087–1094.
- Vanhonacker F, van Loo EJ, Gellynck X, Verbeke W. 2013. Flemish consumer attitudes towards more sustainable food choices. *Appetite* **62**:7–16.
- Vaughan EE, Heilig HGJ, Ben-Amor K, de Vos WM. 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:477-490.
- Veliz EA, Martínez-Hidalgo P, M. Hirsch A. 2017. Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology* **3**:689–705.
- Wang D, Bai YY, Li JH, Zhang CX. 2004. Nutritional value of the field cricket (*Gryllus testaceus* walker). *Insect Science* **11**:275–283.
- Wang W, Yan X, Li Q, Chen Z, Wang Z, Hu H. 2020. Adapted nano-carriers for gastrointestinal defense components: surface strategies and challenges. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (e102277) DOI: 10.1016/j.femsre.2005.04.009.
- Yadav AK, Tyagi A, Kaushik JK, Saklani AC, Grover S, Batish VK. 2013. Role of surface layer collagen binding protein from indigenous *Lactobacillus plantarum* 91 in adhesion and its anti-adhesion potential against gut pathogen. *Microbiological Research* **168**:639–645.
- Yadav AK, Tyagi A, Kumar A, Panwar S, Grover S, Saklani AC, Hemalatha R, Batish VK. 2017. Adhesion of *Lactobacilli* and their anti-infectivity potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:2042–2056.
- Yen AL. 2009. Edible insects: Traditional knowledge or western phobia? *Entomological Research* **39**:289–298.
- Yen AL. 2015a. Insects as food and feed in the Asia Pacific region: Current perspectives and future directions. *Journal of Insects as Food and Feed* **1**:33–55.
- Yen AL. 2015b. Conservation of *Lepidoptera* used as human food and medicine. *Current Opinion in Insect Science* **12**:102–108.
- Yi L, Lakemond CMM, Sagis LMC, Eisner-Schadler V, Huis A van, Boekel MAJSV. 2013. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry* **141**:3341–3348.
- Young W, Arojju SK, McNeill MR, Rettedal E, Gathercole J, Bell N, Payne P. 2020. Feeding Bugs to Bugs: Edible Insects Modify the Human Gut Microbiome in an in vitro Fermentation Model. *Frontiers in Microbiology* (e1763) DOI: 10.3389/fmicb.2020.01763.
- Zschocke AK. 2017. Mikrobiom: Worauf Sie bei Ihren Patienten achten sollten. *Osteopathische Medizin* **18**:36–39.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

AMCase (acidic mammalian chitinase)

BMK (bakterie mléčného kvašení)

COS (chitooligosacharidy)

CTBS (chitobiáza)

ČR (Česká republika)

EAA (esenciálních aminokyselin)

F6PPK (fruktóza-6-fosfát fosfoketolasa)

FA (mastné kyseliny)

FCR (konverze krmiva)

FOS (fruktooligosacharidy)

GIT (Gastrointestinální trakt)

GOS (galaktooligosacharidy)

CHIT1 (chitináza 1)

IUCN (mezinárodní seznam ochrany přírody)

KTJ (kolonie tvořící jednotky)

LAB (Lactobacillus spp.)

MUFA (nenasycené mastné kyseliny)

PM (peritrofická matrice)

SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem; short chain fatty acids)

SD (směrodatná odchylka)

