

SZAKDOLGOZAT

Magyar Levente Károly

2023



Magyar Agrár-és Élettudományi Egyetem

Budai Campus

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Élelmiszermérnök alapképzési szak

**KÜLÖNBÖZŐ FEHÉRJEFORRÁSOK FELHASZNÁLÁSÁVAL
TÖRTÉNŐ HALTÁP FEJLESZTÉSHEZ SZÜKSÉGES HAL *IN*
VITRO VIZSGÁLATOK**

Belső konzulens: Dr. Antal Otilia Tamara

Tudományos munkatárs

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet,
Táplálkozástudományi Tanszék

Dr. Takács Krisztina

Tudományos főmunkatárs

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet,
Táplálkozástudományi Tanszék

Készítette: Magyar Levente Károly

Budapest

2023

Tartalom

1. Bevezetés	1
2. Célkitűzés	3
3. Irodalmi áttekintés	4
3.1. Szabályozás	4
3.2. A liszt kukac (<i>Tenebrio molitor</i> lárvája)	5
3.2.1. A közönséges lisztbogár (<i>Tenebrio molitor</i>) lárvájának biológiai értéke	6
3.3. A csapósügér.....	8
3.4. A halak emésztőrendszere	10
3.5. A Halak emésztőenzimeit, azok enzimaktivitásai	11
3.5.1. Kísérletek a halenzimek kivonására.....	13
3.6. <i>In vitro</i> emésztési modell és alkalmazása halak esetében	15
3.6.1. Liszt kukac emészthetőségének korábbi vizsgálatai	16
4. Anyagok és módszerek	18
4.1. Anyagok:	18
4.1.1. Csapósügér halak gyomornedve és vékonybélmedve.....	18
4.1.2. A kereskedelmi forgalomban kapható haltáp.....	20
4.1.3. Liszt kukac liszt	21
4.2. Módszerek	21
4.2.1. Pepszin aktivitás mérés (Anson, 1938).....	21
4.2.2. Tripszin aktivitás mérés (Hummel, 1959).....	22
4.2.3. <i>In vitro</i> emésztés	24
4.2.5. Precipitáció (Wessel, 1984)	26
4.2.6. Nátrium-dodecyl szulfát gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	26
5. Kísérleti eredmények és értékelésük	28
5.1. Az enzimsztítás megfelelőségének bizonyítása	28
5.2. Az <i>in vitro</i> modellek felállításához szükséges enzimaktivitások feltérképezése.....	29
5.2.1. A pepszin aktivitás mérés eredményei.....	30
5.2.2. A tripszin aktivitás mérés eredményei.....	31
5.3. A sügér és emlős <i>in vitro</i> emésztési modell összehasonlítása	31
5.3.1. A haltáp csapósügér enzimkivonatokkal történő <i>in vitro</i> emésztése	36
5.3.2. A haltáp sertés pepszinnel és sertés pankreatinnal történő <i>in vitro</i> emésztése	38
5.3.3. A liszt kukac emlős pepszinnel történő <i>in vitro</i> emésztése.....	40
6. Összefoglalás	42
7. Irodalomjegyzék	43

1. Bevezetés

A rovartenyésztés ökológiai fenntarthatósága miatt, egyre gyakrabban próbálják meg a kevésbé gazdaságos, nagy ökológiai lábnyommal rendelkező vagy nehezebben elérhető fehérjeforrásokat kiváltani rovarfehérjével élelmiszerek és takarmányok esetén. Számos kutatás eredményére alapozva az Európai Unió 2017 májusában engedélyezte a rovarfehérje alapú tápok felhasználását a haszonállatok, köztük a víziállatok takarmányozásában (EU 2017/893 rendelete). Hét rovarfaj kapott szabad utat, ezek a fekete katonalégy (*Hermetia illucens*), házilégy (*Musca domestica*), közönséges lisztbogár (*Tenebrio molitor*), alombogár (*Alphitobius diaperinus*), házi tücsök (*Acheta domesticus*), sávós tücsök (*Gryllodes sigillatus*) és földi tücsök (*Gryllus assimilis*). Ez azért hatalmas lépés mert a takarmányozásra jelenleg elérhető legjobb minőségű fehérjeforrás a halliszt, ami a hatalmas kereslet miatt drága és nem fenntartható táplálék forrás (Toviho & Bársony 2020). A Szent István Egyetem rovaripari konferenciáján (Tóth et al. 2018) közzölt eredmények szerint az extrahált szójadara 25%-ban, a szójapogácsa 50%-ban kiváltható fekete katonalégy lárvájának felhasználásával és a halliszt mennyisége is csökkenthető lehet a rovarlisztek használatával. Ez azért lenne előnyös, mert a földeken megtermelt növények hatalmas területet foglalnak el és a vízigényük is igen jelentős. Ezzel szemben a rovarok tenyésztése sokkal kisebb területet és kevesebb vizet igényel. Az ammónia és az olyan üvegházhatású gázok termelése, mint a metán vagy a szén-dioxid is elenyésző. Hatalmas előnyük, hogy különböző szerves hulladékkal táplálkoznak (Toviho & Bársony 2020). Ez azért fontos mert a mezőgazdasági termelés csaknem 27%-a válik hulladékká éves szinten melynek értéke 750 milliárd dollár. (van Huis & Oonincx 2017) A baromfitakarmányozás mellett egyre több kísérlet irányul a rovar alapú fehérje felhasználására a halak takarmányozásában. Toviho és Bársony (2020) értekezésükben arról számolnak, hogy számos halfaj esetében nagy mértékben lehetséges a halliszt kiváltása rovar eredetű készítményekkel. Gebremichael et al. (2020) kísérletükben a lisztukac alkalmazási lehetőségét vizsgálták harcsatáp esetében. Kísérleteik alapján a halliszt teljes mértékben kiváltható lisztukac liszttel a termelési paraméterek jelentős romlása nélkül egynyaras harcsa nevelésénél. Az akvakultúra fejlesztése takarmányipari szempontból elengedhetetlen, hiszen vadon élő halak száma egyre csökken a halliszt nagy mennyiségű előállítás miatt (Wang et al. 2021). A növekvő kereslet miatt a halliszt ára az elmúlt 20 évben csaknem 400%-al növekedett (Belforti et al. 2015). A fenntarthatóság mellett a fejlesztések azért kiemelkedő jelentőségűek mert étrendünk nagyon fontos eleme a hal. Teljes értékű fehérjét, vitaminokat, ásványi

anyagokat tartalmaz. Kiváló zsírsav összetételének (omega-3) köszönhetően hozzájárul a szív- és érrendszeri betegségek megelőzéséhez (Martos et al. 2014). Az omega-3 és 6 zsírsavak humán hatásai szerteágazóak. Jelentősek a szaporodásban, magzati és gyermekkori fejlődésben, a központi idegrendszer, máj és a szem működésében (Machay 2014). A Magyar Dietetikusok Országos Szövetsége (2020) szerint hetente legalább egyszer kellene halat fogyasztanunk. A rengeteg jótékony hatás ellenére is az a trend érzékelhető, hogy Magyarországon az éves halfogyasztás bár kismértékben növekszik, mégis elmarad az európai átlagtól. A világ halfogyasztása éves szinten országonként 1 és 100 kg között változik. Hazánkban ez a szám 2017-ben csak 5,7 kg volt, míg 2021-ben már 6,5 kg az MTI (2021) értekezése alapján. A növekedés megkérdőjelezhetetlen, de ha körbenézünk a kontinensen akkor azt láthatjuk, hogy egyedül Észak-Macedóniát (6,13 kg/év) előzzük meg. A szomszédos országok, akiknek szintén nincs tengerpartja, mint Szlovákia (10,21 kg/év) vagy Ausztria (14,45 kg/év) jócskán lehagynak minket az Our World in Data (2020) felmérése szerint. A csekély fogyasztás több indokkal is magyarázható. Az emberek egy része nincs kibékülve a hal ízével, szagával vagy a szálkától tartózkodik ezért nem is keresi ezeket a termékeket. Sokaknak az elkészítés jelent gondot amiért lemondanak a halas fogásokról. A harmadik ok pedig gazdasági, a halak árait nem minden háztartás tudja kifizetni (Temesi 2016). Ahhoz, hogy a hal, mint élelmiszer mindenki számára elérhető legyen és a globális szinten mutatkozó keresletet ki tudja elégíteni, a haltenyésztés fejlesztése elengedhetetlen. Ezért foglalkozik számos kutatás a fenntartható, rovar alapú haltápok tanulmányozásával (Toviho & Bársony 2020).

2. Célkitűzés

A kísérlet célja, hogy csapósügér (*Perca fluviatilis*) halak korábbi növényi és állati alapú tápját rovarfehérjékkel váltsam fel/egészítsem ki, mely egyrészt a halak emésztési folyamatát segítené, másrészt gazdaságosabb és könnyebben, folyamatosan biztosítható haltápforrás lenne. A kutatás feladata optimalizálni a tápba rakott rovarfehérje mennyiségét és minőségét a megfelelő biológiai hasznosulás szempontjából.

Ehhez tervezem modellezni a tápok, és alapanyagaik emészthetőségét *in vitro* hal emésztési modellek felállításával, amelyekkel megbecsülhetővé válik majd a későbbiekben a takarmányuk biológiai értéke.

Kétféle *in vitro* emésztési modellt tervezek megvalósítani. Az egyiknél az enzimtartalmú halgyomor és halvékonybél kivonatokat használnám fel, míg a másik módszernél kereskedelmi forgalomban kapható tisztított enzimekkel (pl. sertés eredetű) állítanám be a hal fiziológiás körülményeinek megfelelő emésztőenzim aktivitásokat.

A hal eredetű emésztőnedvek esetében is, valamint a tisztított sertés eredetű enzimek esetében is a pepszin és pankreatikus tripszin aktivitását határozom meg.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Szabályozás

Az Európai Parlament és a Tanács 178/2002/EK rendeletének harmadik cikke szerint takarmánynak nevezzük a feldolgozott, részben feldolgozott vagy feldolgozatlan anyagot vagy terméket, többek között adalékot, amelyet állatok orális etetésére szánnak. Ahogyan a bevezetőben is említettem a rovarfehérje alapú takarmányok engedélyezettek a vízi állatok, a kedvtelésből tartott állatok etetésére, valamint a sertések és baromfik táplálására. Fontos, hogy az élelmiszertermelő állatokat az Európai Parlament és Tanácsa által az egyes fertőző szivacsos agyvelőbántalmak megelőzésére vonatkozó szabályok megállapításáról szóló 999/2001/EK rendelet (TSE rendelet) szerinti feldolgozott rovarfehérjével lehet etetni. A takarmány részét képező fehérje előállítására engedélyköteles, ezt az illetékes kormányhivatal állategészségügyi főosztálya engedélyezheti a nem emberi fogyasztásra szánt állati melléktermékekre vonatkozó egészségügyi szabályok megállapításáról szóló 1069/2009/EK rendelet alapján. Az emberi egészség és az állatok egészségének magas fokú védelmére irányuló törekvés az élelmiszerjog alapvető célkitűzése. Szükséges annak biztosítása, hogy valamennyi takarmánytermelő vállalkozás, beleértve az akvakultúrát is, a harmonizált biztonsági követelményeknek megfelelően működjön. A takarmányhigiéniai követelmények meghatározásáról az Európai Parlament és a Tanács 183/2005/EK rendeletében tájékozódhatunk.

A rovarokból származó termékek a 68/2013/EU rendeletben meghatározott alábbi kategóriákba tartozhatnak:

9.16.1. Szárazföldi, gerinctelen, élő állatok

Élő szárazföldi gerinctelen állatok bármely fejlődési szakaszban, a növények, az állatok, illetve az emberek egészségére kedvezőtlen hatást gyakorló fajok kivételével.

9.16.2. Szárazföldi, gerinctelen, élettelen állatok

Kezeletlen vagy kezelt, de az 1069/2009/EK rendeletben foglaltak szerint fel nem dolgozott élettelen szárazföldi gerinctelen állatok a növények, az állatok, illetve az emberek egészségére kedvezőtlen hatást gyakorló fajok kivételével, bármely fejlődési szakaszban.

9.4.1. Feldolgozott állati fehérje

Bármely fejlődési szakaszban lévő szárazföldi állatok – az emberekre és állatokra patogén fajoktól eltérő fajokhoz tartozó gerinctelen állatokat is beleértve – egész testéből vagy annak részeiből hőkezeléssel, szárítással és darálással nyert termék, amelyből a zsírt

esetlegesen extrahálással vagy fizikai úton részlegesen eltávolították. Az extraháláshoz használt oldószer 0,1% hexánt tartalmazhat.

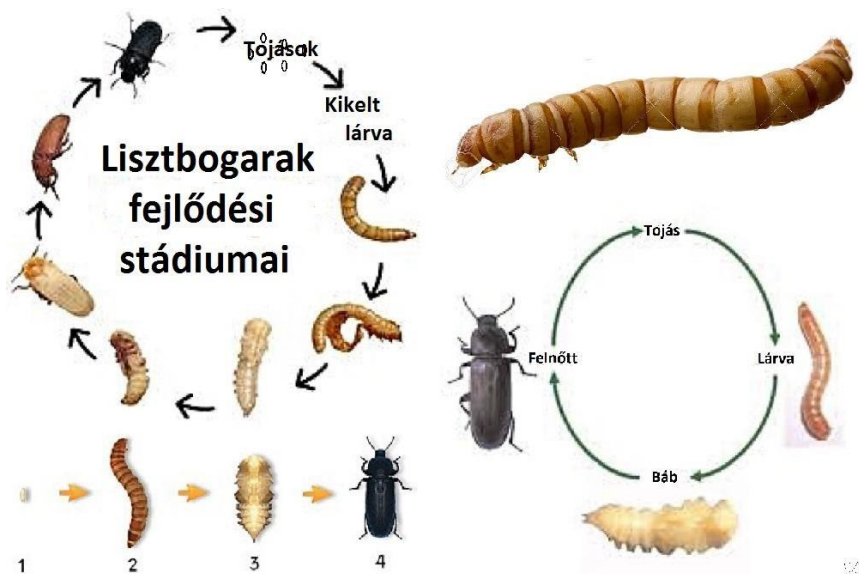
A haszonállatok takarmányának előállításához felhasznált nyersanyag csak az engedélyezett rovarokból készülhet. Ezek a (142/2011/EU rendelet X. Melléklet II. Fejezet szerint):

Fekete katonalégy (*Hermetia illucens*), közönséges házilégy (*Musca domestica*), közönséges lisztbogár (*Tenebrio molitor*), penészevő gabonabogár (*Alphitobius diaperinus*), házi tücsök (*Acheta domestica*), sávós tücsök (*Grylloides sigillatus*), banántücsök (*Gryllus assimilis*), selyemlepke (*Bombyx mori*)

3.2. A lisztkukac (*Tenebrio molitor* lárvája)

Egyre többször olvashatunk híreket a közönséges lisztbogár (*Tenebrio molitor*) lárvájáról és annak felhasználásáról. Nem meglepő, hiszen a lisztkukac volt az első rovar melyet az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA 2021) emberi fogyasztásra is alkalmasnak ítélte. A szárított lárva, illetve a belőle készült por az új élelmiszerek kategóriába tartoznak így forgalmazásuk uniós szinten szabályozott. Azonban az élelmiszeripari felhasználásuk előtt is találkozhattunk ezekkel a sárgásbarna hosszúkás lárvákkal, mint díszállat eleség vagy takarmány alapanyag, de a természetben sem ritkák ezek a fényes barna rovarok. Legtöbben mégis raktári kártevőként ismerjük, hiszen petéit a lisztbe vagy más gabona alapú élelmiszerbe rakja. Az ember jelenlétének köszönhetően ma már valamennyi földrészen megtalálható (<https://terraplaza.com/magazin/hu/izeltlabuak-hu/tenebrio-molitor-a-csodabogar/3872/>).

A nőtények életük során akár 500 petét is képesek lerakni. A fehér, bab formájú petékből 1-2 hét alatt kelnek ki a lárvák, de körülményektől függően ez akár 4 hétig is eltarthat (<https://protiberia.com/en/mealworm/>). Végleges méretüket nagyjából 10-12 hét alatt érik el 25-28°C-os környezetben és növekedésük során többször vedlenek. Ebben az életszakaszban nevezzük őket lisztkukacnak. Az utolsó vedlés után fehér bábbá alakulnak. Ebben az időszakban tehetetlenek, hiszen nincs se szájszervük, sem végbélnyílásuk, és mozgásra is képtelenek. Körülbelül 1-3 hét után a báb átalakul világos barna, kifejlett rovarrá mely az idő múlásával egyre sötétebb lesz, ezt láthatjuk az 1. ábrán.



1. ábra: A lisztbogarak fejlődési stádiumai (<https://zsibizoo.hu/halaink-taplalasa-elo-eleseggel-sajat-tenyeszetek-kialakitasa-2>)

Táplálékuk gabonák, illetve nedves élelmiszerek, például zöldségek. A felnőtt nőstény egyedek rovarrá válásuk után 10-14 nappal már képesek petéket rakni. A lisztbogár hatékony tenyésztéshez elengedhetetlen a megfelelő takarmány és környezet biztosítása. Az optimális hőmérséklet 25-28°C, a relatív páratartalom pedig 60-75% körül ideális. Alacsonyabb hőmérséklet esetén a fejlődés időtartama a többszörösére nőhet (Hetényi 2023).

3.2.1. A közönséges lisztbogár (*Tenebrio molitor*) lárvájának biológiai értéke

A rovarok élelmiszerként, illetve takarmányként való felhasználása mellett több nyomós indokot szoktak emlegetni. A gazdaságos és környezetkímélő előállítás, a minimális területigény és a belső összetétel is ilyen pozitívumok (Toviho & Bársony 2020). Itt megemlíthetjük a magas fehérje tartalmat és a kiváló zsírsav összetételt (Siemianowska et al. 2013). Az 1. táblázatban a szárított lisztbogár táplálékanyag-tartalma látható.

1. Táblázat: A szárított lisztbogár tápanyag összetétele (Ravzanaadii et al. 2012)

Komponensek	(%)
Nedvességtartalom	5,33
Nyers fehérje	46,44
Nyers zsír	32,7
Nyers rost	4,58
Nyers hamu	2,86

A lisztkukac legnagyobb részét a fehérje és a zsír teszi ki. A nagy mennyiségű zsír miatt a szárított termék avasodásra hajlamos, de zsírtalanított formában tovább eltartható. A rosttartalom is számottevő, itt meg kell említenünk a kitint is mely a külső vázat alkotó poliszacharid. A kitin a lárvában és a kifejlett rovarban is megtalálható. Ez az ellenálló komponens jelentősen befolyásolja a *Tenebrio molitor* tartalmú haltáp emészthetőségét. A kitin akadályozhatja a tápanyagok emésztését azáltal, hogy megzavarja az emésztőenzimek aktivitását. Ugyanakkor egyes halak képesek a kitin lebontását segítő enzim termelésére. A csapósügér esetében a hasnyálmirigyben termelődik kitináz enzim azonban a sügér kitin-emésztési képessége még így is igen alacsony marad. A magas rost és kitintartalom miatt csökken a táplálék tranzit ideje ezért a tápanyagok rövidebb ideig vannak kitéve az emésztőenzimek működésének, így kevesebb értékes komponens tud hasznosulni. Kutatások alapján a kitin képes kötődni a lipidekhez és az epéhez ezzel csökkentve a lipidek emészthetőségét (Tran et al. 2022).

A zsírsavak összetételét tekintve a hosszú szénláncú zsírsavak közül kiemelkedő arányban található meg az olajsav, a linolsav és a palmitinsav. Összességében a telítetlen zsírsavak vannak túlsúlyban. Az esszenciális omega-6 zsírsavakat is nagy mennyiségben tartalmazza, melyek a sejtmembrán lipidtartalmának építőkövei. A lisztkukacban található zsírsavak telítetlenségi foka nagyon hasonló a baromfik és a halak összetételéhez (Ravzanaadii et al. 2012). Siemianowska et al. (2013) kutatásuk során a friss lisztkukac omega-3/omega-6 arányát 6,76-nak találták. A rovarok takarmányozásának megváltoztatása eredményezhet jobb zsírsav összetételt, ugyanakkor gazdaságilag előnytelen és nem javítja a táplált halak növekedési teljesítményét (Tran et al. 2023). Lawal et al. (2021) kísérlete is erről számol be, melyben a 10% chiamoag és lenmag tartalmú takarmánnyal táplált lárvák zsírsav összetétele kedvezőbb volt az omega-3 és omega-6 zsírsavak arányát tekintve.

2. Táblázat: A lisztkukac aminosav összetétele (Ravzanaadii et al. 2012.)

Aminosav	g / 100 g fehérje
Cisztein (CYS)	0,517
Metionin (MET)	0,672
Aszparaginsav (ASP)	3,591
Treonin (THR)	1,807
Szerin (SER)	2,091
Glutaminsav (GLU)	5,676
Glicin (GLY)	2,41
Alanin (ALA)	3,685
Valin (VAL)	2,439
Izoleucin (Ile)	3,556
Leucin (Leu)	3,405
Tirozin (Tyr)	3,46
Fenilalanin (Phe)	1,759
Lizin (Lys)	2,906
Hisztidin (His)	1,527
Arginin (Arg)	2,434
Prolin (Pro)	3,019

Ahogy az 1. táblázatban láthattuk, a szárított lisztbogár lárva magas fehérje tartalma miatt alkalmasnak tűnhet a csapósünger takarmányozására. A 2. táblázatban a lisztkukac fehérje aminosav összetétele figyelhető meg. Mind a 9 esszenciális aminosav (hisztidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofán, valin) megtalálható benne tehát komplett fehérjének tekinthetjük. Az esszenciális aminosavak olyan aminosavak melyeket szervezetünk nem, vagy csak elégtelen mennyiségben képes szintetizálni ezért táplálkozás útján kell felvennünk őket a hiánytünetek elkerülése végett. Legkisebb arányban a cisztein (0,517) és metionin (0,672) található meg benne. A metionin esszenciális aminosav ezért ebben az esetben limitáló aminosavként van jelen az összetételben. *A limitáló aminosav olyan esszenciális aminosav egy adott fehérjében, amely a FAO/WHO által javasolt referenciafehérje (elsősorban tyúktojásfehérje) aminosav-összetételében szereplő, megfelelő aminosavhoz viszonyítva a legkisebb százalékos arányban fordul elő* (Gubicskóné Kisbenedek & Szabó 2015).

3.3. A csapósünger

A csapósünger a sugarasúszójú halak (*Actinopterygii*) osztályába, ezen belül a sügéralakúak (*Perciformes*) rendjébe és a süngerfélék (*Percidae*) családjába tartozik. A *Perca* nemben három süngerfajt különböztetünk meg melyek biológiailag nagyon hasonlóak, csupán egy-két külső jegyben, illetve földrajzi elterjedésben térnek el egymástól. Ezek a fajok az Észak-Amerikában jellemző *Perca flavescens*, az Ázsiában honos *Perca schrenki* és a Linné

által először leírt *Perca* faj, a *Perca fluviatilis*, az európai csapósügér, mely hazánkban is őshonos (<https://halak.ewk.hu/suger/>). A *Perca fluviatilis* fajjal Eurázián kívül találkozhatunk még Ausztráliában, Új-zélandon és Dél-Afrikában is (Orban et al. 2007). Széleskörű elterjedését a vizek hőmérsékletével szembeni tág tűrése tette lehetővé (4-31°C). Melegkedvelő fajnak számít, bár szaporodása alacsony hőmérsékleten történik (4-14°C), növekedésre pedig csak 14°C fölött képes (Hancz 2007). Édesvízi hal, mely a lassú folyású vizekben, illetve a tavakban (40 m mélységig) található meg. Közepes oxigénigényű faj, számára elegendő az 5-6 mg/l O₂ jelenléte a vízben. Teste oldalról lapított, hossza ritkán haladja meg a 20-25 cm-t (Hankó 1945). Fésűs (ktenoid) pikkelyei apróak de igen erősek (Hancz 2007).



2. ábra: *Perca fluviatilis* (<https://hessenfischer.net/fisch-des-jahres-2023-der-flussbarsch-perca-fluviatilis/>)

Színezete a háti részen szürkészöld, a hasa felé haladva inkább sárgás árnyalatú (2. ábra). A fejtől a farokúszóig a hal oldalán 5-9 keresztirányú fekete sávot figyelhetünk meg (<http://www.arcanum.com/hu/>). Hátán kettő, elkülönült hátúszó található melyek közül az elülső 13-15 éles tüskét rejt és két utolsó sugara között pávaszem-folt figyelhető meg. A csapósügér, ha fenyegetve érzi magát, égnek állítja hátúszóját így védekezik esetleges támadója ellen. Ezért érdemes figyelniük, hogyan tartjuk kezünkben a szúrós úszójú halat. Hasi úszói, valamint farokúszója a fajra jellemző vörös színt mutatnak (https://nas.er.usgs.gov/queries/greatlakes/FactSheet.aspx?Species_ID=3636&Potential=Y&Ttype=2), ezért könnyen megkülönböztethető ragadozó társaitól, például a süllőtől, kősüllőtől.

Fiatal korukban lárvákkal, puhatestűekkel, rovarokkal, illetve ikrákkal táplálkoznak, ezutóbbi miatt nemkívánatos vendégek a halgazdaságokban. A felnőtt egyedek étlapját a puhatestűeken és rovarokon kívül kisebb-nagyobb halak, esetenként békák teszik ki (<https://horgaszat.hu/csapo-suger-perca-fluviatilis/>). Általában csapatokba verődve úzik

áldozatukat a sekélyebb vizű területeken. Bár átlagos testtömege csak 200-300 g, ereje és dinamikus mozgása miatt kedvelt sporthalnak számít a horgászok körében.

Sajnos növekedése lassú, így hiába a rendkívül jó húsminőség a magyarországi tógazdasági haltermelés mellékhalaként tartjuk számon. Nyugat-Európában nagyobb hangsúlyt kap az értékesítése. A természetes halászat megszűnése óta Magyarországon ritkán találkozunk vele pedig a piaci igény egyre nagyobb a csapósügér iránt (Molnár et al. 2020).

3.4. A halak emésztőrendszere

A halak emésztésének és anyagcsere folyamatainak vizsgálatok fontos éssben tartanunk azt a tényt, hogy vízben élő szervezetek így sokkal szorosabb kapcsolat van az élőlény és környezete között a szárazföldi gerincesekkel szemben. A halak poikilotherm állatok, életfolyamataik sebessége nagyban függ a környezet hőmérsékletétől (Hancz 2007). Az abiotikus változók közül a víz hőmérséklete kiemelkedő fontosságú, mivel szabályozza a takarmányfelvételt, és az emésztési folyamatokat, ezáltal a növekedésre is hatással van. (Fiogbé & Kestemont, 2003). Ebből következik az a tény is, hogy energiaszükségletük növekszik a víz hőmérsékletének emelkedésével. Igen nehéz meghatározni, de azt tudhatjuk, hogy a melegvérű állatokéhoz képest a halak anyagcseréjének energiaszükséglete nagyjából tizede, huszada lehet (Hancz 2007).

Táplálkozásmód szerint két nagy csoportot különböztetünk meg. Ezek a békés halak és a ragadozó halak. A békés halakon belül léteznek növényevők (pl. amur), mindenevők (pl. ponty) és apróállat evők (pl. garda). Számunkra a ragadozók csoportja a fontosabb hiszen a csapósügér is ide tartozik. Ebben a kategóriában megkülönböztetünk fakultatív ragadozót is, ilyen a harcsa.

A táplálék útja az előbélben kezdődik mely magában foglalja a szájat és a garatot, illetve a nyelőcsövet. A ragadozó halak esetében a prédá elejtése érdekében éles, gyökér nélküli, ránőtt fogak találhatóak szájüregükben (Hancz 2007). Az emésztési folyamatok már a garatüregben, valamint a nyelőcsőben elkezdődnek hiszen ezeken a területeken is termelődik mukózus nyálka. Ragadozó halak emésztőrendszerében ezt követően a táplálék egy tágulékony, zsákszerű gyomorba jut. A gyomor elülső részét (gyomorszáj) ahol a táplálék belép cardiális résznek, a hátsó traktust, ami a táplálék továbbjutását szabályozza pylorusnak nevezzük. A gyomor cardiális mirigyek mukózus nyálkát, pylorus mirigyek pedig gyomornedvet termelnek, amely egyrészt a gyomortartalom pH-értékét csökkenti sósav termelése révén, másrészt emésztőenzimet (pepszin) is tartalmaz (Horváth 2000). A halak esetében gyomormirigyben egy féle sejt (oxyntikus-peptikus sejtek) termeli a savat és az enzimeket, köztük a pepszint is ellentétben az emlősök mirigyeivel, ahol ezt két sejt végzi (Rust 2002). A proteázok közül a

tripszin a hasnyálmirigyben termelődik és a béllumenben, valamint a pylorus függelékben aktiválódik (Rust 2002). Jelentős mennyiségű emésztőenzimet tartalmaz a ragadozó halak gyomorbélcsatornájának speciális szakasza, a pylorus függelék (Horváth László és mtsai. 2000). A pylorus függelék tulajdonképpen az előbél meghosszabbítása, hasonló felépítésű, mint a belek, funkcióját tekintve a szénhidrátok és zsírok felszívódásának helye és egyes enzimek szekréciója is itt történik (Harpaz & Uni 1999, Rust 2002). A vékonybél hossza és tagoltsága nagyban függ az adott faj táplálkozási szokásaitól, a ragadozóké rövidebb míg a békés halaké hosszabb és tekervényesebb (Hancz 2007). Itt történik a tápanyagokból az értékes komponensek felszívódása. Ellentétben az emberi bélrendszerrel a halaknál gyakorlatilag nem figyelhető meg vastagbél csak az utolsó szakasza, a rectum. Itt táplálóanyag-abszorpció már nem megy végbe (Horváth 2000). A máj legfontosabb feladata az emésztés szempontjából az epe termelése. A hasnyálmirigy nedvtermelése az emésztőenzimeken kívül tartalmazza az ezen fehérjék optimális működéshez szükséges ionokat, illetve a béltartalom kémhatását befolyásoló anyagokat. Az enzimtermelés az éppen alkalmazott takarmányozás függvénye. Például a fehérjedús táplálék hatására nő a proteolitikus aktivitás, azonban a takarmánynak mindig alkalmazkodnia kell az adott faj táplálkozási fiziológiai adottságaihoz (Hancz 2007).

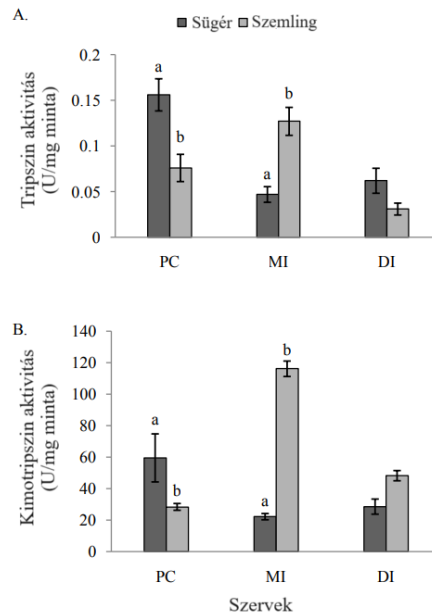
3.5. A Halak emésztőenzimeit, azok enzimaktivitásait

Az enzimek olyan speciális fehérjék melyek a szerves reakciók katalízisére szolgálnak. Hatékony molekuláris egységek, amelyek az élet fenntartásához elengedhetetlen kémiai átalakulásokban játszanak szerepet (Oliveira et al. 2014). A tápanyagok hasznosulása a megfelelő emésztőenzimek jelenlététől és mennyiségétől függ (Langeland et al. 2013). Az állatok növekedésének ütemét is nagyban befolyásolja az adott enzim készlet és az emésztőrendszer állapota. Lemieux et al. (1999) kísérletükben arra keresték a választ, hogy az emésztőenzimek meghatározzák-e a tőkehal (*Gadus morhua*) növekedési sebességét és a táplálkozás hatékonyságát. Következtetésükben arra jutottak, hogy az emésztés szintjén a tripszin az egyetlen mért enzim, amelyről feltételezhető, hogy potenciálisan korlátozza a tőkehal növekedési sebességét. A halak képesek étrendjük megváltoztatására az év különböző szakaszaiban a rendelkezésre álló táplálék függvényében. Az emésztőenzim-mintázat a halakban ennek megfelelően változik (Harpaz & Uni 1999). A halakat általában táplálkozási szokásaik szerint szokták rendszerezni. Eszerint megkülönböztetünk ragadozó, mindenevő és növényevő fajokat. Úgy gondolnánk, hogy életmódjuk az emésztőenzim aktivitásában is tükröződik, de ez nem mindig van így. Egyes tanulmányok arról számolnak be, hogy a táplálkozási szokások és az emésztőenzimek aktivitása közötti kapcsolat nem mindig

egyértelmű. A kutatások szerint a ragadozó halak is rendelkeznek α -amiláz aktivitással annak ellenére, hogy természetes étrendjükben nem található meg a keményítő (Langeland et al. 2013). A halak emésztőnedvével kapcsolatos kutatások segíthetnek megismerni emésztésük fiziológiáját, így választ kaphatunk számos táplálkozási kérdésre, ami segítséget nyújthat a mesterséges takarmányok összetételét a halak táplálkozási szükségleteihez igazítani (Furné et al. 2005). Langeland et al. (2013) kutatásukban a csapósügérben (*Perca fluviatilis*) és a sarki szemlingben (*Salvelinus alpinus*) található emésztőenzimek aktivitását vizsgálták. A kísérlet eredményei alapján nem tapasztaltak változást a különböző korú és méretű csapósügér egyedek emésztőenzim összetétele között. A *Perca fluviatilis* ivadékként túlnyomórészt planktonnal táplálkozik és ahogy növekszik úgy válik egyre dominánsabb részévé a hal az étrendjének. Értékelésük szerint a vizsgált példányok döntő részben már áttérhettek a hús alapú étrendre ezért nem tapasztaltak változást a szénhidrát emésztéséért felelős enzimek mértékében.

A ragadozó halak esetében a zsírban gazdag táplálkozás miatt jóval magasabb lipáz aktivitás figyelhető meg, mint a mindenevő vagy a növényevő fajoknál. (Furné és mtsai. 2005.) Langeland et al. (2013) értekezésében a csapósügér vizsgálatánál is ez figyelhető meg. A lipáz aktivitása a gyomor-bélrendszerben csaknem huszonháromszorosa volt az összes szénhidrátot emésztő enzimmel szemben.

A 3. ábra a sügér és a szemling pepszin, valamint tripszin aktivitását mutatja be az emésztés egyes szerveiben. Megfigyelhető, hogy a két faj enzimaktivitása és a legmagasabb aktivitás helye is eltérést mutat. Ez valószínűleg az eltérő élettérnek és a különböző étrendnek köszönhető. A szemling Észak-Amerika tengeröbleiben, folyóiban és tavaiban jellemző, táplálékát plankton, kisebb halak és puhatestűek teszik ki (Johnston 2008), míg a csapósügér az édesvízi tavak és folyók lakója.



3. ábra: A sügér és a szemling tripszin és kimotripszin aktivitása az egyes szervekben (pylorus függelék (PC), középbél (MI), disztális bél (DI)) (Langeland et al., 2013)

Jól látható, hogy a csapósügér fehérjebontó enzimeinek aktivitása a pylorus függelékben volt a legmagasabb. A két enzim közül a kimotripszin nagyságrendekkel nagyobb eredményeket mutatott a tripszinnel szemben. Összefoglalva, mindkét fajra a magas lipáz- és proteáz-aktivitás, valamint a szénhidrát bontó enzimek alacsony aktivitása volt jellemző, ami összefüggésbe hozható húsevő táplálkozási szokásaikkal (Langeland et al. 2013).

3.5.1. Kísérletek a halenzimek kivonására

Kolkowski és mtsai. (2000) négy féle étrend esetében vizsgálták az emésztőenzimek aktivitásának változását a csapósügérekben. A fiatal sügerek kezdeti átlag tömege 587 ± 35 mg, méretük 38 ± 6 mm volt. Kommersz tápként egy kereskedelmi forgalomban is kapható pizstráng takarmányt használtak (Zeigler number 2 crumble; Zeigler Brothers, Inc., Gardners, Pennsylvania). 47 nap után a $2,76 \pm 0,1$ g súlyt értek el a vizsgált egyedek. A felboncolt halak gyomrát és beleit egyenként lemérték majd kétszer homogenizálták (30 mp, 15mp) 0,5 mL pufferben (HCl-glicin puffer; pH 2,5 és tris-HCl puffer, pH 7,3). A vizsgálatig a kivonatokat fagyasztva (-80°C) tárolták. A vizsgálatához a mintákat jégen engedték fel, majd újra homogenizálták (20 mp) és centrifugálták (10 perc, 4°C , 4000 g). A tripszin méréshez BAPNA-t (benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid), a pepszinhez 2,5%-os szarvasmarha eritrocita hemoglobint használtak szubsztrátként glicin-HCl pufferben (pH 2,5). A különböző halfajok pepszin aktivitás maximuma eltérő körülmények között jön létre, de általánosságban elmondható, hogy pH 2 körül magasabb az aktivitás (Oliveira 2015). A gyomor és a bél

kivonatok fehérje koncentrációjának mérése Bradford (1976) módszere szerint történt. Tripszin esetében $9,67 \pm 4,7 \mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ oldódó fehérje $\cdot\text{min}^{-1}$, pepszin esetében pedig $0,20 \pm 0,06 \text{ mM}$ felszabadult tyrosine $\cdot\text{mg}^{-1}$ oldódó fehérje $\cdot\text{h}^{-1}$ (25°C) volt az eredmény a kommersz táp esetében.

Abd El-Gawad és mtsai. (2019) emésztési kutatásukban $32 \pm 1,0 \text{ g}$ tömegű és $13,5 \pm 0,6 \text{ cm}$ testhosszal rendelkező fejlettebb halakkal dolgoztak. A sügereket 60 napig táplálták szintén kereskedelemben is kapható ragadozó, illetve mindenevő halak számára készített táppal (Purina® AquaMax® Grower 400). A mintákat a belekből vették, amiket kétszer mostak át foszfát pufferral (pH 7,4). Az oldatokat homogenizálták, majd centrifugálták (10 perc, 4°C , 13000 g). Ezután a felülúszót levették és fagyasztva tárolták (-80°C). A tripszinaktivitást egy kereskedelmi csomag (BioVision, USA) alapján határozták meg. A mintákat 50 μl tripszin pufferral készítették el, majd 1 μl 50 \times kimotripszin inhibitor oldatot adtak hozzá, és 10 percig inkubálták szobahőmérsékleten. Az inkubációt követően 50 μl reakciómixet (48 μl puffer és 2 μl tripszin szubsztrát) adtak minden mintához és 25°C -on inkubálták fénytől elzárva. Az abszorbanciát 405 nm-en mérték. A tripszin aktivitása 30 nap után 4,67 mU/ml, 60 nap után pedig 7,25 mU/ml körül alakult (diagramról leolvasva).

Langeland és mtsai. (2013) kutatásukban egy kereskedelmi izonitrogén tartalmú takarmányt használtak a sügerek enzimaktivitásának méréséhez. A halak átlagosan 6 g testsúllyal rendelkeztek. A boncolás során a közébbelet és a disztális belet és a pylorus függelékét távolították el a halakból és később ezekből a szervekből mérték tripszin aktivitást. A kivonatok hideg puffer (0,2 M Tris-HCl, 0,05 M CaCl₂, pH 8,0) jelenlétében homogenizálták. A pylorus függelék esetében a puffer mellet enterokináz oldat (25 μg enterokináz mL⁻¹) is jelen volt melyet a tripszinogén tripszinné alakítása miatt kellett alkalmazni. A mintákat centrifugálták (10 perc, 15 800 g), majd fagyasztva (-80°C) tárolták. A tripszin aktivitás méréshez BAPNA-t használtak szubsztrátként, majd az abszorbanciát 390 nm-en mérték 25°C -on. A mérések után az összes tripszin aktivitást 0,24 U/mg mintának állapították meg.

A halak enzimaktivitásának vizsgálata és azok összehasonlítása nehézkes folyamat. Amint láthatjuk az egyes kutatások által produkált eredmények eltérőek, ez köszönhető lehet az eltérő természeti körülményeknek, valamint az eltérő mérési protokolloknak. A víz hőmérséklete, savassága és a benne oldott oxigén mennyisége is jelentős hatással van a proteáz aktivitásra (Wang és mtsai. 2021).

3.6. *In vitro* emésztési modell és alkalmazása halak esetében

Az emésztés során számos biokémiai folyamat játszódik le így modellezése nem egyszerű feladat. Az élelmiszer-tápanyagok hatása kiemelt fontosságú a szervezet egészségére tekintve, ami a gyomorbélrendszerben zajló emésztési folyamatoktól függ (Ji és mtsai. 2022). Ezért az elfogyasztott tápanyagok átalakulásának és hasznosulásának elemzésére nagy szükség van számos kutatási területen.

Az *in vitro* emésztési modellek használata az elmúlt 40 év során egy eredményes és elterjedt módszerré vált, amit mind az élelmiszertudomány, mind a gyógyszerkutatás használ (Lucas-González és mtsai. 2018). Az *in vitro* vizsgálatok között megkülönböztetünk statikus és dinamikus modelleket. A legegyszerűbb módszer a statikus modell használata, ilyenkor az emésztési kivánt tápanyagot lombikba vagy kémcsőbe tesszük ezután az egyes fázisoknak (szájüregi, gyomori, bélrendszeri) megfelelően adjuk hozzá az emésztőfolyadékot és az enzimeket. A pH értéket is a fázisok szerint állítjuk be. A dinamikus modell képes az emésztési folyamatos változó jellemzőinek szimulálására (pl. enzim aktivitás változás), ezért egy sokkal bonyolultabb, számítógép által vezérelt rendszer. A statikus modellel ellentétben képes a gyomor tartalmának keveredését és ürülését is modellezni viszont egy sokkal időigényesebb és költségesebb folyamat (Wang és mtsai. 2021).

A halak esetében ilyen standardizált módszert még nem dolgoztak ki a kutatók, ami a fajok sokszínűségének is köszönhető (Wang et al. 2021). Azonban az utóbbi években megnőtt az érdeklődés a statikus modellek iránt az akvakultúra területén is (Moyano 2015). Egy ilyen költséghatékony, pontos és gyors módszer megkönnyítené a minőségellenőrzést a takarmányiparban, illetve a lehetséges új tápok fejlesztését (Bassompierre et al. 1997, Moyano et al. 2001).

Jelenleg 2 féle megközelítés létezik a hal *in vitro* emésztési modellek kidolgozása során. A gyakoribb módszer mikor az adott halfajból kinyert emésztőenzimokkal modellezik az emésztést és az enzimaktivitást (Kolkovski és mtsai. 2000, Martínez-Montaña és mtsai. 2012). A másik módszer lényege, hogy a kereskedelmi forgalomban is kapható enzimekkel modellezik az emésztés folyamatát (Moyano és Savoie 2001). A modellezés sokkal pontosabb, ha hal emésztőenzimmal dolgozunk (Alarcón et al. 1997), de ennek a beszerzése körülményes lehet. Mivel hal emésztőenzimek nem kaphatók kereskedelmi forgalomban, a tenyésztett egyedekből kell számos példányt feláldozni, hogy kivonjuk a modellhez szükséges enzimeket. A halakból kivont emésztőnedv alkalmazása, kevésbé reprodukálható, mint a kereskedelmi forgalomban található emésztőenzimek használata, mivel a halkivonatban található enzimek mennyiségét,

minőségét és aktivitását befolyásolja a halak mérete, tápláléka, a tenyésztés körülményei és hogy mikor és milyen gyakran etették őket.

Ezért a kereskedelmi forgalomban kapható emésztőenzimekkel felépített modell hatékony módszer lehet a különböző típusú tápok összehasonlítására, például, ha a hallisztet helyettesítő összetevők emészthetőségét teszteljük. A legígéretesebb takarmányokat érdemes lehet az adott halfaj enzimeivel, *in vitro* vizsgálni, mielőtt *in vivo*, halakon teszteljük a tápokat. Bár az *in vitro* emésztési modellek sosem tudják teljes mértékben reprodukálni az *in vivo* emésztést, és az *in vitro*, hal gyomor és bélnedvet alkalmazó modellek a tenyésztett halak elpusztítását igénylik, előnyös lehet az alkalmazásuk az alábbi okok miatt:

- az interindividuális variabilitás nem befolyásolja az eredményt, így könnyebb következtetéseket levonni
- az emésztés folyamán, az emésztményből folyamatosan lehet mintát venni, míg *in vivo* kísérlet esetén, a mintavételi időpontban a halat fel kell boncolni, így ugyanabból a halból később nem tudunk mintát venni.
- a környezeti tényezők (pl. nappal-éjszaka időtartama; stressz tényezők (pl. túlzsúfoltság)) nincsenek hatással az *in vitro* emésztésre, míg *in vivo* befolyásolhatják az emészthetőséget

Moyano és munkatársai (2001) kutatásunk során a hal enzimek és kereskedelemben kapható emlős enzimek fehérjebontását vizsgálták. A hal enzimeket aranydurbincsből (*Sparus aurata*) nyerték ki. A vizsgálat során halliszt, kazein és szójaliszt emésztését figyelték. A két módszer elvégzése után a fehérjék hidrolizálhatósága szempontjából nagyon hasonló elrendeződést figyeltek meg. Ez is azt mutatja, hogy a kereskedelmi emlős enzimek használatával lehetséges egy megbízható módszer kifejlesztése.

A legtöbb *in vitro* kutatás a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) vizsgálatára irányul (Moyano et al. 2014). A csapósünger enzimaktivitását több kutatás is részletezi (Abd El-Gawad és mtsai. 2019, Langeland et al. 2013), de *in vitro* emésztési modellt még nem állítottak fel erre fajra, ezért eredményeim meghatározóak lehetnek a további kutatás szempontjából.

3.6.1. Liszt kukac emészthetőségének korábbi vizsgálatai

A hal takarmányok fejlesztésének lehetőségeit vizsgáló értekezések száma az utóbbi időben jelentősen megnőtt. Számos kutatás számol be arról, hogy milyen alternatív, fenntarthatóbb erőforrásokat használhatnánk az akvakultúrák fajok takarmányozásában (Toviho

& Bársony 2020, Tilami et al. 2020). A lehetséges rovarok közül kiemelt figyelmet kap a közönséges lisztbogár lárvája (*Tenebrio molitor*). Az ebből a rovarból készült por különböző arányokban történő hal tápba keverésével több kutatás is foglalkozik (Ido et al. 2019, Henry et al. 2018). A lisztukac felhasználhatóságát számos halfaj esetében vizsgálták.

A csapósünger esetében Tran és munkatársai (2022, 2023) készítettek átfogó kutatást a *Tenebrio molitor* takarmányban való felhasználhatóságáról. Tran és munkatársai (2022) 105 napos etetés során vizsgálták a halak növekedését az eredeti táp 6,8 %, 13,5 % és 20,3 % zsírtalanított lisztukac kiegészítésével. Az eredmények azt mutatták, hogy a lisztukac halliszthez képesti 25%-os kiegészítésével a süngerek növekedési teljesítménye megegyező volt az alap táppal etetett halakéval. Ugyanakkor a tanulmány szerint a halliszt 50%-nál nagyobb mértékű kiegészítés nem mutatott ígéretes eredményeket.

A *Tenebrio molitor* emészthetőségét célzó *in vivo* vizsgálatokat számos más halfajjal is elvégezték már. Belforti et al. (2015) szivárványos pisztrángokkal vizsgálták a teljes értékű lisztukac emészthetőségét. A kiegészítés mértéke 25% és 50% volt az eredeti tápához képest. Megfigyelésük alapján a halak súlygyarapodásában nem volt változás, azonban a takarmányhasznosítási arány magasabb volt az alap takarmánnyal táplált halak esetében. Az 50%-ban kiegészített táp esetében jelentősen rosszabb volt a fehérjék emészthetősége. A hal húsának omega-3/omega-6 zsírsav aránya a kiegészítés mértékével ellentétesen változott.

A pisztráng mellett több kutatás fókuszál a harcsa (*Silurus glanis*) takarmányának lisztukaccal való kiegészítésének lehetőségeire. Gebremichael et al. (2020) a halliszt tartalmú táp kiegészítését 33, 66 és 100%-ban végezték el lisztukac liszttel. A kutatás egy hónapos ideje alatt a halak súlyának változásában nem volt szignifikáns különbség, a 33%-ban kiegészített táp eredményezte a legnagyobb súlygyarapodást.

Afrikai harcsával (*Clarias gariepinus*) végzett kísérlet során hasonlóról számolt be Ng et al. (2001) ahol a 40%-ban lisztukaccal helyettesített táp esetében nem tapasztaltak különbséget a növekedés ütemében a halliszt alapú takarmánnyal szemben. A hét hetes kutatás során a 80 %-os kiegészítés sem mutatott sokkal rosszabb eredményt a növekedést és a tápanyag hasznosítást tekintve.

A lisztukac liszttel végzett hal *in vivo* kutatások nagyon különbözőek lehetnek. Más körülmények, más időtartam és faj, amit az egyes vizsgálatok használnak. Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a lisztukac lisztnek, mint esetleges haltáp összetevő van jelentősége, azonban az akvakultúrába történő beillesztéshez és folyamatos használathoz még több kutatás elvégzése szükséges.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Anyagok:

4.1.1. Csapósügér halak gyomornedve és vékonybélmedve

Csapósügér halak poolozott (10 db egyedből származó) gyomornedvét és vékonybélmedvét, a MATE ÉTTI Táplálkozástudományi Tanszék (TTT) bocsátotta rendelkezésemre. A TTT korábbi vizsgálatai szerint a 20°C-on tartott halak esetében volt a halak emésztőenzimkészletének aktivitása a legoptimálisabb, ezért a halak emésztésének modellezésénél a 20°C-on tartott halak emésztőnedveit használtam fel.

Ezen emésztőnedvekről szerzett információim a következők:

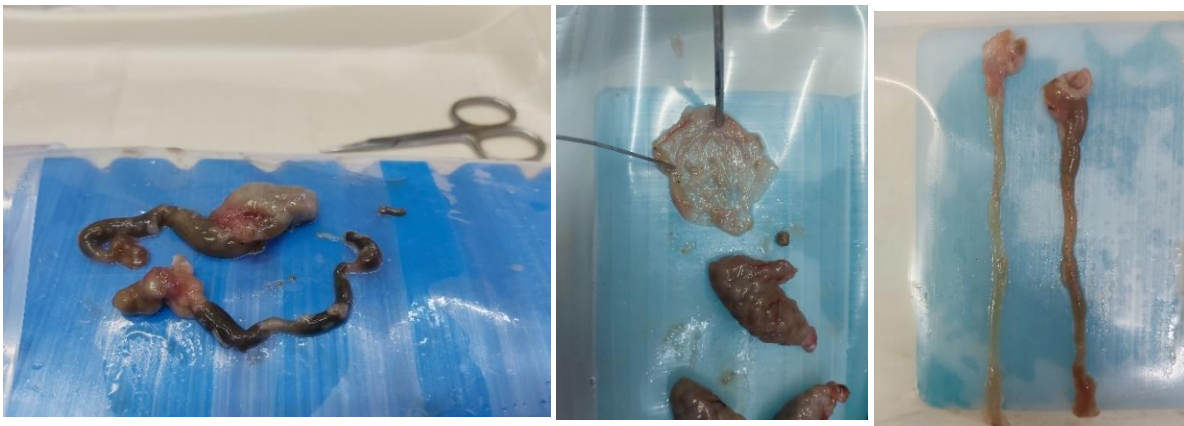
A csapósügér halak (10 db) teljes emésztőrendszerét a Debreceni Egyetem, Állattenyésztési Tanszéke biztosította. A halak és azok tartási paraméterei: 1 éves korúak, tömegük 50-60g, 10 cm hosszúak, Hal Biológia Laborban tartották 9 kg/m³ denzitásban 150 literes akváriumban (4.ábra).



4. ábra: Csapósügér halak medencében való tartása

A halak fehérjében és zsírban gazdag kereskedelmi forgalomban kapható haltápot kaptak (lásd 4.1.2. pont). A halak az első etetés után 4 órával kapták meg a második adag élelmüket, majd az ezt követő 4. órában, azaz az első etetéstől számított 8. órában vágták le őket.

A 8. órában történő vágás megválasztásának célja az volt, hogy a gyomorba és a vékonybélbe egyaránt ez idő alatt a táplálék el tudjon jutni, így be tudjon indulni az enzimettermelés, és mérhetővé váljon az emésztőenzimek aktivitása.



5. ábra: Csapósügér halak boncolása, emésztőrendszerének eltávolítása

A gyomrot (5. ábra) hosszanti irányban felválták Almeida és mtsi (2018) módszere szerint-, és a benne lévő tartalmát 1 ml 2,5 pH-jú desztillált vízben (1 halra vonatkoztatva) kimosták. A vékonybélmintát (5. ábra) tartalmát a bél hosszanti irányában kinyomkodták, majd a vékonybél szövetet is hosszanti irányban felválták - Almeida és mtsi (2018) módszere szerint és a maradék vékonybél tartalmát 1 ml pufferben (1 halra vonatkoztatva) hozzámosták. A vékonybél esetén Fuchise et al. (2011) cikk alapján használt puffert (50mM TrisHCl, ami tartalmaz 0,5 M NaCl-ot és 20mM CaCl-ot (pH 7,8) alkalmazták. Az így pufferben felvett gyomor ill. vékonybél szuszpenziót pufferben turaxolták (30 sec), majd kevertették (BioSan Multi Bio RS-24) 1 órán át hűtőben (4°C-on) homogenizálás és az enzimek kellő kivonása céljából), majd centrifugálták (12000 rpm, 15 min, 4°C). Centrifugálással a sejtörmelékeket, zsírt, tápot és egyéb anyagokat eltávolították. A tiszta felülúszót pedig mélyhűtőben tárolták a további vizsgálatokig.

Az enzimaktivitás mérésekhez nem volt cél az enzimek további tisztítása, mert fiziológiai körülmények között próbálták mérni az aktivitást, hisz az *in vitro* hal emésztési modellezésnél ebben formában (adott pufferben mosott felülúszó kivonatokat) kívánták felhasználni.


A 10 db. hal tisztított gyomor és vékonybélemészőnedveit összeöntötték (poolozták), külön-külön, amiket az enzimaktivitás mérésekhez használtam fel.

Előzetes kísérletek alapján a kísérletet végző kutatócsoport megállapította, hogy a csapósüger halak emésztőenzimeinek aktivitása összehangoltan -figyelembe véve a gazdaságossági szempontokat is- 20°C-on volt a leoptimalisabb, így ezen hőmérsékleten tartott halak emésztőenzimeit használtam fel a kutatómunkámban.

4.1.2. A kereskedelmi forgalomban kapható haltáp

A tápot kávédarálóval (Hauser) finom porra daráltam. A táp adatait a 6. ábra mutatja.

AQUA UNI		TROUT 10 kg, 25 kg Bag		
Declaration	2 mm	3 mm	4 mm 6 mm	
Crude protein	47 %	47 %	45 %	
Crude fat	16 %	16 %	16 %	
Crude fiber	1,5 %	2,0 %	2,0 %	
Phosphorus	1,15 %	1,10 %	1,00 %	
Vitamin A	10000 I.U.	10000 I.U.	10000 I.U.	
Vitamin D3	1500 I.U.	1500 I.U.	1500 I.U.	
Vitamin E	200 mg	200 mg	200 mg	
Digestible Energy	18,0 MJ	18,0 MJ	18,0 MJ	
Vitabac	++			

Structure	Composition	Features
	Wheat, Fishmeal SP, Poultry meal, Sunflower concentrate, Fish oil, Blood meal, Rapeseed oil, Rapeseed cake, Hemoglobin powder	<ul style="list-style-type: none"> Extruded, slowly sinking growth feed for salmonids Universally useable, even in unfavorable environmental conditions Fishmeal only in premium quality High quality animal protein from poultry from verified quality Rapeseed oil in food grade Without any soybean meal „GM free“ according to EU-VO 1829/2003

Due to natural variations in the raw materials, the composition crude fiber and phosphorus content may vary compared to the stated values. See label for further information.

Feeding guide (kg feed per 100 kg fish per day)										
Fishsize g	Fishsize cm	Feedsize mm	Water temperature							
			4° C	6° C	8° C	10° C	12° C	14° C	16° C	18° C
15-50	11-16	2	0,9	1,2	1,4	1,6	1,8	2,1	2,2	2,0
50-150	16-22	3	0,7	1,0	1,1	1,3	1,5	1,8	1,9	1,6
150-350	22-31	4	0,6	0,8	0,9	1,1	1,3	1,5	1,6	1,4
350-600	31-36	6	0,5	0,7	0,8	0,9	1,1	1,3	1,4	1,2
>600	>36	6	0,4	0,6	0,7	0,8	1,0	1,1	1,2	1,1

The recommended values are approximate. The amount of feed must be adapted to the relations of production

6. ábra: Csapósüger táp adatai

4.1.3. Liszt kukac liszt

A liszt kukacot a Debreceni Egyetem munkatársai szárítva, ledarált állapotban bocsátották rendelkezésemre. A vizsgálatokhoz nem zsírtalanított állapotban használtam fel. (3. táblázat)

3. Táblázat: A liszt kukac beltartalmi összetevői

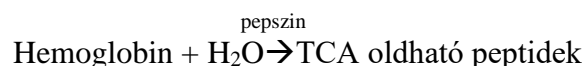
Száranyag (%)	Fehérje (%)	Olaj (%)	Hamu (%)	Nyersrost (%)
33,3	23,1	1,9	1,89	19,2

4.2. Módszerek

4.2.1. Pepszin aktivitás mérés (Anson, 1938)

A csapósünger hal gyomornedvének pepszinaktivitását és a kereskedelmi forgalomban kapható tisztított sertés eredetű pepszin (Sigma P7012) aktivitását mértem.

A módszer elve: A hemoglobinból felszabaduló TCA-oldható tirozin tartalmú peptid kimutatása spektrofotometriás módszerrel 280 nm-en. (pH 2,0, 37°C). 1 Unit (egységnyi) enzim által felszabadított peptid percenkénti felszabadulása $\Delta A_{280}=0,001 -t$ idéz elő.



A pepszin aktivitás méréshez szükséges oldatok:

-5%-os TCA-oldat

-haemoglobin, 2% (w/v), szubsztrát (Sigma, H2500):

-0,1 mg/ml pepszin-oldat (Sigma P7012) 150 mM NaCl (pH=6,5) oldva

A pH beállítása 100 mM NaOH-val történik. Az oldatot magát frissen kell készíteni és 4°C-on vagy jégen kell tárolni.

A méréshez szükséges oldatokat készítését, valamint a pepszinaktivitás mérést a 4. és 5. táblázatok szerint végeztem.

4. Táblázat: Különböző koncentrációjú pepszinoldatok

oldat száma	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Pepszin-oldatok (µg/ml)	5	10	15	20	25	30	35
10 mM HCl (µl)	950	900	850	800	750	700	650
0.1 mg/ml-es pepszin törzsoldat (µl)	50	100	150	200	250	300	350

5. Táblázat: A pepszin aktivitás mérés munkamenete

2 ml-es eppendorfcsovekbe készítettem össze a mérést.											
	Blank1	Blank2	1	2	3	4	5	6	7	3 ism.	5 ism.
hemoglobin	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Inkubálás 37°C-on (vízfürdő/termosztát), 4 percig.											
Pepszin-oldat	-	-	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubálni pontosan 10 percig. Hogy biztosan 10 perc legyen, hagyni kell 30 mp-t minden cső között.											
5%-os TCA	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Reakció leállítása (szobahőmérsékleten).											
Pepszin-oldat	100 µl 3-as	100 µl 5-ös	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A mintákat 6000 g-n kell centrifugálni 30 percig (szobahőn), hogy a hemoglobin kicsapódjon. Új eppendorfcsovekbe kell tenni a felülúszót, majd egy kicsit inkubálni (szobahőn), a hőmérséklet kiegyenlítés végett.											
Az áttetsző felülúszókat kvartz küvetába (fényút 1 cm) kell pipettázni, majd az abszorbanciájukat 280 nm-en megmérni.											

$$\text{Units/mg} = [\text{A}_{280\text{Test}} - \text{A}_{280\text{Blank}}] * 1000 / (\Delta t * X)$$

Δt = a reakció időtartama, vagyis 10 perc

X = a tesztelt pepszin oldat koncentrációja (mg/ml) vagy a tesztelt pepszin tartalmú felülúszó oldat mennyisége (ml)

4.2.2. Tripszin aktivitás mérés (Hummel, 1959)

A csapósüger hal vékonybélnedvének tripszinaktivitását és a kereskedelmi forgalomban kapható tisztított sertés eredetű tripszin (Sigma P7545) aktivitását mértem.

A módszer elve: A felszabaduló p-toluén-szulfonil-L-arginin folyamatos (10 perces) spektrofotometriás módszerrel történő mérése 247 nm-n, pH 8.1-n, 25°C-n.

Egy egység (Unit): Egy Unit hidrolizál 1 µmol TAME-t percenként 25°C-n, pH 8.1 –n.

TAME (p-Toluén-szulfonil-L-Arginin Metil Észter) + H₂O $\xrightarrow{\text{tripszin}}$ p-toluén-szulfonil-L - arginin + metanol

A tripszin aktivitás méréshez szükséges oldatok:

-0.046 M Tris-HCl /0.0115 M CaCl₂ -puffer (pH 8.1)

1.39 g Tris-t, és 0.32 g CaCl₂-t kimértem kb. 240 ml desztillált vízbe. A pH 8.1 állításához 1 M HCl-oldatot használtam (kb. 5.82 ml). A 250ml-es végtérfogatot desztillált vízzel kiegészítve állítottam be.

-10 mM TAME (Sigma T4626)

18.9 mg TAME-t 5 ml desztillált vízben feloldottam. Összeráztam majd a kész oldatot jégen tároltam.

-10 mg/ml pankreatin (Sigma P7545) 1mM HCl-ban oldva

Ebből legalább három hígítást készítettem a 0.25-1.0 mg/ml koncentrációs intervallumban (pl. 0.25, 0.5 és 1.0 mg/ml). Mérés során az oldatokat jégen tároltam

A tripszin aktivitás mérést a 6. táblázat szerint végeztem.

6. Táblázat: A tripszin aktivitás munkamenete

Blank küvettája	Teszt küvettája
Pipetázni mindkét küvettába 1.3 ml Tris-HCl/CaCl ₂ -puffert (pH 8.1) és 150 µl szubsztrátot (10 mM TAME-t) és összekeverni. Inkubálni a spektrofotométerben 3-4 percig amíg a hőmérséklet kiegyenlítődik.	
Figyelem! Az enzim hozzáadása következik, de hozzáadva már indul a reakció (a mérés), erre figyelni kell! Célszerű ezért a blank-et bemérni először!	
Hozzáadni 50 µl 1mM HCl oldatot Összerázni!	Hozzáadni 50 µl tripszin oldatot (pl. 1 mg/ml-es koncentrációjú) Összerázni!

A méréshez Quartz vagy UV kompatibilis műanyag küvettát, (1 cm úthossz) használtam.

Az enzim hozzáadásával azonnal indítottam a kinetikai mérést.

Monitoroztam az abszorbanciát 247 nm-n (25°C-n) legalább 10 percig tartó folyamatos méréssel. Összegyűjtöttem az abszorbancia adatokat 10 mp vagy 20 mp vagy 30 mp-es gyakorisággal.

Ábrázoltam az abszorbanciát (y tengely) az idő függvényében (x tengely) percekben és meghatároztam a görbe kezdeti egyenes szakaszának meredekségét (ΔA_{247}). A maximum lineáris tartományt kellett figyelembe vennem.

(kizárólag legalább 5 percig tartó mérés esetén fogadható el a lineáris szakaszra adott meredekségi adat)

Ha nincs egyenes szakasz meg kell ismételni a mérést kevesebb enzimet felhasználva, 0.5 és 0.25 mg/ml-es konc.jú tripszin/vagy pankreatin oldatokkal is!

TAME Units/mg= $(\Delta A_{247} * 1000 * 1.5) / 540 * X$ ahol:

A_{247} : a görbe kezdeti lineáris része, [unit abszorbancia/perc]

$\Delta A_{247} = A_{\text{Test}} - A_{\text{Blank}}$ /perc

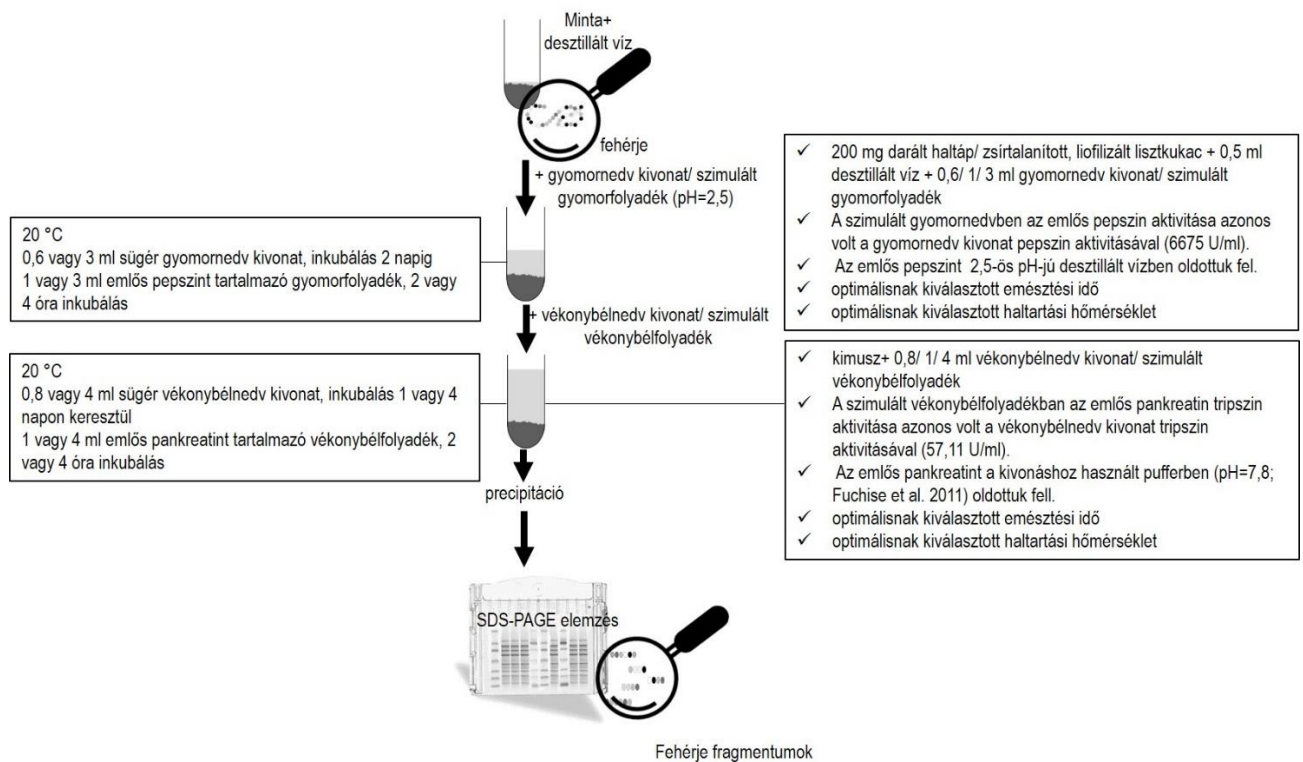
540: a TAME moláris extinciók együtthatója 247 nm-nél.

1.5: a reakció térfogata (ml) (Tris-HCl/CaCl₂-puffer + TAME + Enzim)

X: a tripszin mennyisége a végső reakcióelegyben (küvetta) [mg]

4.2.3. *In vitro* emésztés

A haltápok, és alapanyagaik emészthetőségét kétféle *in vitro* módon modelleztem (7. ábra). Az emésztési hőmérséklet biztosítására rázóinkubátort használtam (8. ábra).



7. ábra: Csapósüveg *in vitro* emésztési modellek



8. ábra: *In vitro* emésztési modellek inkubátorban történő kivitelezése

4.2.4.1. *In vitro* emésztés modellezése csapósünger eredetű emésztőnedvekkel

200 mg tápot 500 µl desztillált vízzel elegyítettem, majd a halból nyert gyomornedvet adtam az oldathoz (0,6 ml vagy 3 ml). A gyomorszakaszt 1, 2 vagy 3 napos inkubációval modelleztem. A gyomoremésztési idő lejárata után a halból nyert vékonybélnedvet hozzáadtam az emésztményhez (0,8 ml vagy 4 ml), ezzel elindítottam a vékonybélszakasz 1 vagy 4 napon át tartó szimulációját. Az emésztés 20°C-on történt.

Emésztést követően a mintákat centrifugáltam (15 ml-es centrifugacső, 4100 rpm, szobahő, 15 perc). A centriugálással kapott üledéket (P) és a felülúszót (FÚ) precipitáltam (4.2.5. pontban), majd így használtam fel őket az SDS-PAGE vizsgálatokhoz (4.2.6 pont).

4.2.4.2. *In vitro* emésztés modellezése sertés eredetű emésztőenzimekkel

200 mg tápot 500 µl desztillált vízzel elegyítettem, majd a kereskedelmi forgalomban kapható, tisztított, sertés eredetű pepszin-tartalmú (Sigma P7012) szimulált gyomornedvet hozzáadtam az oldathoz (1 ml vagy 3 ml). A gyomorszakaszt 2 vagy 4 órás inkubációval modelleztem. A gyomoremésztési idő lejárata után a kereskedelmi forgalomban kapható, tisztított, sertés eredetű pankreatin-tartalmú (Sigma P7545) vékonybélnedvet adtam az emésztményhez (1 ml vagy 4 ml), ezzel elindítottam a vékonybélszakasz 2 vagy 4 órán át tartó szimulációját. Az emésztés 20°C-on történt.

A gyomornedv és vékonybélmedv pepszin és tripszin aktivitását a 20°-on tenyésztett halak enzim kivonatában mért aktivitásnak megfelelően állítottam be. A gyomornedv esetén a pepszint 2,5-ös pH-jú desztillált vízben oldottam fel, míg a vékonybélmedv esetén a Fuchise és mtsi. (2011) által leírt puffert (50 mM Tris-HCl, ami tartalmaz 0,5 M NaCl-ot és 20 mM CaCl-ot (pH 7,8) használtam fel. Emésztést követően a mintákat centrifugáltam (15 ml-es centrifugacső, 4100 rpm, szobahő, 15 perc). A centriugálással kapott üledéket (P) és a felülúszót (FÚ) precipitáltam (4.2.5. pontban), majd így használtam fel őket az SDS-PAGE vizsgálatokhoz (4.2.6 pont).

4.2.5. Precipitáció (Wessel, 1984)

A megemésztett mintákat -70°C-on tároltam, majd szobahőn felengedtem őket a precipitáció előtt.

Az üledéket (P) és a felülúszót (FÚ), külön-külön precipitáltam a következő módon: 2 ml metanol hozzáadása után, vortexeltem az oldatokat, majd 2 percig centrifugáltam. Ezután 500 µl kloroformot adtam hozzá, majd vortexelés után ismét 2 perc időtartamú centrifugálást végeztem. Ezt követően 1,5 ml desztillált vizet adtam az oldathoz, majd vortexelés után ismét 2 percig centrifugáltam. Centrifugálás után a felső vizes fázist eltávolítottam, majd 1,5 ml metanolt adagoltam hozzá, és ezt követő vortexelés után 5 percig centrifugáltam. A metanol eltávolítása végett szobahőn szárítottam a mintákat. Minden esetben a centrifugálás paraméterei: 15 ml-es centrifugacső, 4100 rpm, szobahő.

4.2.6. Nátrium-dodecil szulfát gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) módszert alkalmaztam az emésztett haltáp és alapanyag minta molekulatömeg szerinti fehérje-eloszlásának, így az anyagok emészthetőségének meghatározására.

Erre a célra vertikális gélelektroforézis rendszert alkalmaztam, mely a 9.ábrán látható (Bio-Rad Mini Protean 3 Cell). BioRad power PAC1000 feszültségadó készüléket alkalmazva, a beállított paraméterek a következők voltak: U= 200 V konstans; I=54 mA, P=11W, futtatás idő =60 perc.

A vertikális gélelektroforézis során az akrilamid és biszakrilamid tartalmú futtatógél és a gyűjtőgél koncentrációja 15%, illetve 6% volt (Laemmli, 1970). A minták hígítását 10% 2-beta-merkaptóetanolt tartalmazó Laemmli-féle mintaoldó pufferral (BioRad) végeztem, majd 5 percig forraltam a mintafelvétel előtt. A gél zsebeibe a minták felvitele előtt futtató-puffert

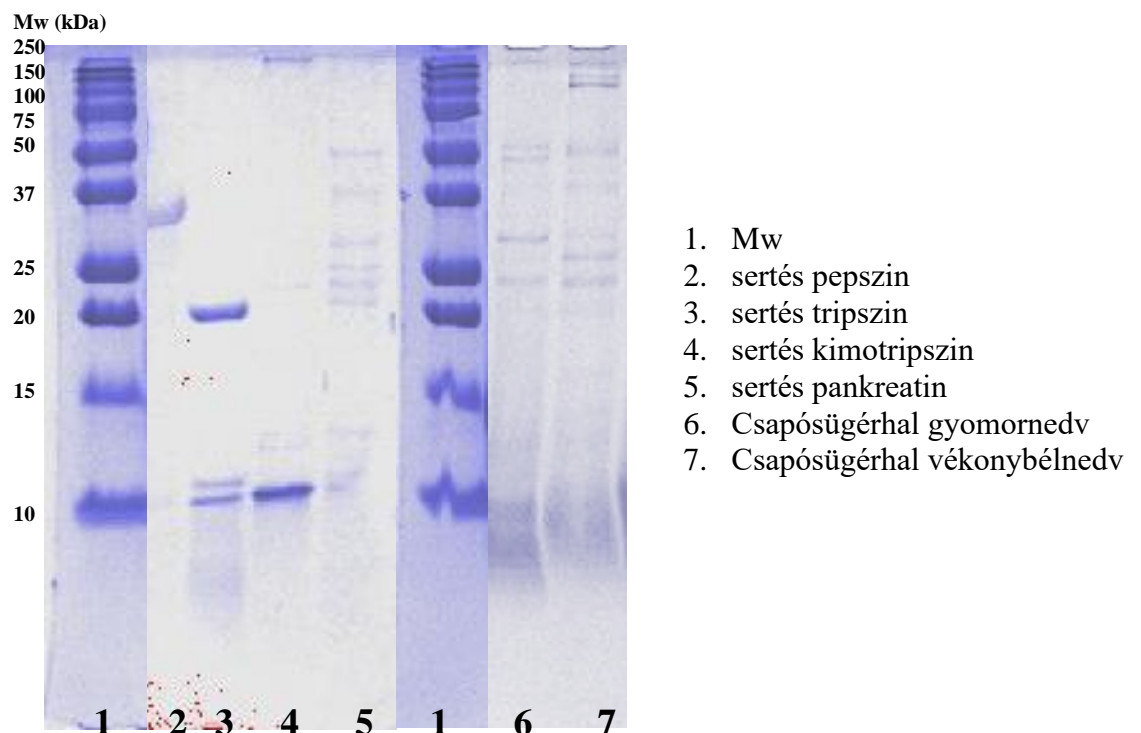
(0,025M Tris + 0,0035M SDS + 0,193 M Glicin) pipettáztam. Az elektroforézis befejezése után a szeparált fehérjéket 20 percig fixáltam 20% triklór-ecetsav (TCA) oldatban. A maradék TCA eltávolításához háromszor 10 percig rázattam a géleket PAGE-mosó/differenciáló oldatban (850 ml desztillált víz+50 ml 96% ecetsav + 100 ml 96% etanol). Ezután 10 percig, 25°C-on Coomassie Brilliant Blue R-250 festékoldatban (0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250 + 10 ml 96% ecetsav+50 ml 96% Etil-alkohol +50 ml desztillált víz) rázattam a gélt , majd 10% ecetsav-oldattal távolítottam el a háttérben maradt felesleges festéket.

A gélek kiértékelése BIO-RAD Gel Doc 2000 rendszerrel történt.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. Az enzimmtisztítás megfelelőségének bizonyítása

A rendelkezésemre bocsátott csapósüger emésztőnedvek esetében ellenőrzést végeztem, hogy a kinyert emésztőnedvek valóban tartalmazzák-e az emésztőenzimeket, azaz megfelelő volt-e a gyomorból, illetve a vékonybélből a nedvek tisztítása. Sertés eredetű tisztított enzimekkel hasonlítottam össze a csapósüger hal gyomornedvét és vékonybélnedvének fehérjekészletét SDS-PAGE módszerrel (9. ábra).



9. ábra: csapósüger emésztőnedvek enzimekészletének összehasonlítása a tisztított sertés eredetű enzimekkel szemben SDS-PAGE módszerrel

Megállapítottam, hogy sikeres volt a kivonási lépés, ugyanis a sertés eredetű tisztított enzimeknek megfelelő sávokban kaptam fehérjemintázatot a halnedvek esetében is. Ezzel bizonyítottuk, hogy a boncolási és az alkalmazott kinyerési módszer alkalmas volt nedvekben található enzimek kinyerésére (enzimkivonat előállítására).

Az figyelhető meg a képen, hogy a halgyomornedvben és a halvékonybélnedvben lévő enzimsávok között nem nagyon látható különbség. A gyomorban is megjelennek a pankreatin enzimek, amelyek közül a proteinázok a peptidkötések 10 %-át képesek hidrolizálni (Ugolev & Kuz'mina, 1993). Lipáz és amiláz aktivitása is kimutatható a gyomorban, (Barrington 1957)

de mivel ezek az enzimek hasnyálmirigy eredetű enzimek ezért valószínűleg a regurgitáció miatt vannak jelen a gyomorban (Kuz'mina & Golovanova, 2001).

Számomra az bizonyított, hogy a hal emésztőnedvekből mérhető lett a pepszin, illetve a tripszin aktivitás, amelyek meghatározása az *in vitro* emésztési modellek felállításához volt szükséges.

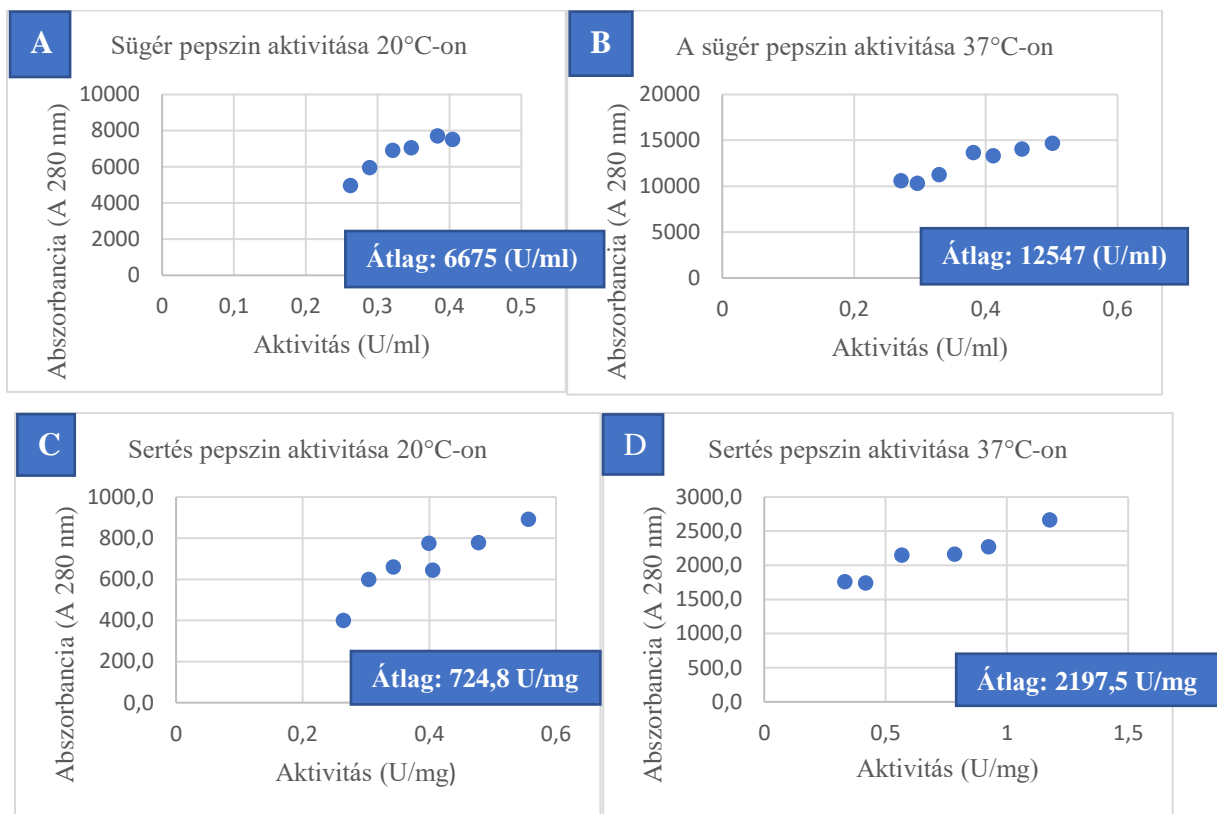
5.2. Az *in vitro* modellek felállításához szükséges enzimaktivitások feltérképezése

A fehérje emészthetőség standardizált modellel (Minekus et al., 2014; Brodkorb et al., 2019) történő vizsgálata esetén a legfontosabb emésztőenzimek a pepszin és a pankreatikus tripszin, melyek aktivitása alapján az emésztési modellt felállítják. Azért, hogy az emlős enzimen alapuló csapósügér *in vitro* emésztési modell minél jobban megközelítse a megcélzott halfajra jellemző körülményeket, megmértem a csapósügér emésztőnedv kivonatok, valamint a rendelkezésünkre álló emlős enzimek pepszin és tripszin aktivitását 20 és 37°C-on egyaránt.

A protokoll szerint a pepszin aktivitást 37°C-on kell mérni Bár a sügérre nem jellemző a 37°C-os testhőmérséklet, ezen a hőmérsékleten is megmértem és összehasonlítottam a sügér és sertés pepszin aktivitásokat. A vízi állatok emésztését modellező *in vitro* protokollok sok esetben 37°C-ot alkalmaznak (Moyano et al., 2015), annak ellenére, hogy ezekre a szervezetekre nem jellemző a 37°C -os testhőmérséklet. Bár a magas hőmérséklet alkalmazása élettani szempontból nem megalapozott, a reakció magasabb hőmérsékleten lerövidül (Moyano et al., 2015).

Mindemellett a hosszú reakcióidők is, *in vitro*, gondot okozhatnak, miszerint az emésztmény befertőződhet baktériumokkal vagy a reakciótermékek gátolhatják az emésztőenzimeket (Moyano et al., 2015). Az is hátrány lehet hosszú inkubációs idők esetén, hogy az enzimek hidrolizálják önmagukat, hiszen statikus *in vitro* modellek esetén nem folyamatos az enzim szekréció, mint ahogy az *in vivo*, étkezés után tapasztalható (Moyano et al., 2015).

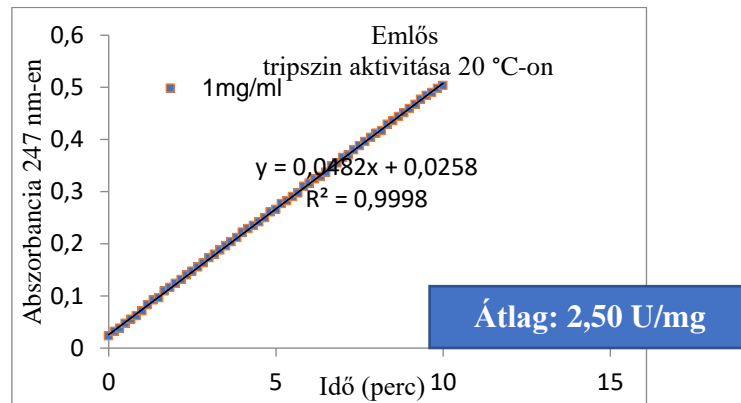
5.2.1. A pepszin aktivitás mérés eredményei



10. ábra: Pepszin aktivitás mérés eredményei 20 °C-on és 37 °C-on: csapósüger gyomornedv (A, B) és a sertés pepszin esetében (C, D)

A süger pepszin 20 és 37°C-on is nagyobb aktivitást mutatott, mint az emlős pepszin (10. ábra). Az emlős pepszin (10./C, D ábra) és a süger pepszin (10./A, B) esetén is magasabb aktivitást mértünk 37°C-on mint 18 vagy 20°C-on. A 18°C-on tenyésztett süger esetében 37°C-on történő mérés során nagyobb aktivitást (18984 ± 2408 U/ml) mértünk, mint a 20°C-on tenyésztett halaknál (10./B ábra). A süger pepszin aktivitása 20°C-on (10./A ábra) magasabbnak mutatkozott mint 18°C-os körülmények között (5920 ± 1247 U/ml).

5.2.2. A tripszin aktivitás mérés eredményei



11. ábra: Emlős tripszin aktivitás mérés eredménye 20 °C-on

Az emlős tripszin aktivitása 20°C-on (11. ábra) vizsgálva jóval kisebb eredményt adott, mint a 18°C-on ($56,11 \pm 9,43$ U/ml) vagy 20°C-on ($57,11 \pm 10,6$ U/ml) mért sügér tripszin aktivitása.

5.3. A sügér és emlős *in vitro* emésztési modell összehasonlítása

Elsődleges cél az, hogy számos potenciális tápösszetevőt és kész tápokot össze lehessen hasonlítani. Erre egy standardizált *in vitro* módszer megfelelő és hasznos lenne.

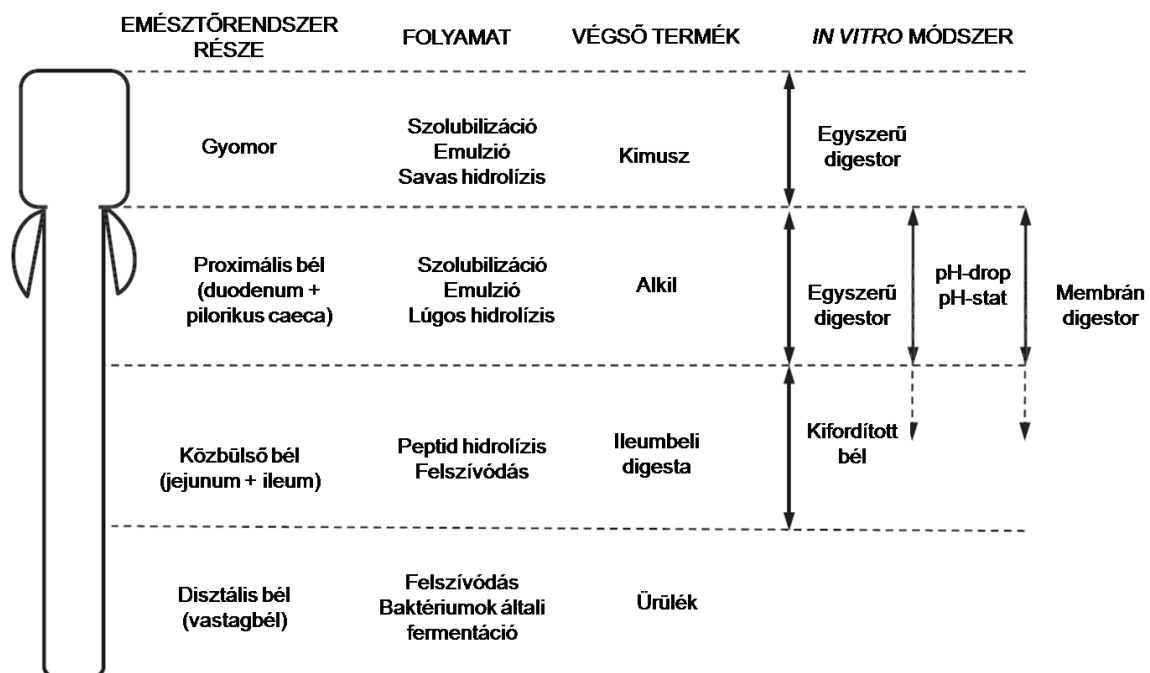
2011-ben indult el az ún. COST INFOGEST FA1005 Akció „Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process” címmel, amelynek feladata volt vezető európai intézetekből álló hálózat felépítése egy közös cél: az élelmiszerek emésztése, és a tápcsatornában történő lebomlási folyamatok teljes megismerése érdekében. A résztvevők különböző szakmai háttérrel rendelkező tudós kollegákból (élelmiszermérnökök, gastroenterológusok, táplálkozástudományi szakemberek, immunológusok, élelmiszeripari szakemberek...stb.) álltak, így a téma több szemszögből is megközelíthetővé vált. A COST 4 éves periódusa alatt megszületett számos *in vitro* emésztési protokoll összefésült változata, az ún. harmonizált protokoll, melyben az eddig ismert előnyöket, hátrányokat figyelembe vették, valamint a valós körülményeket a legjobban megközelítették. Publikálásra is került az INFOGEST protokoll (Minekus et al., 2014; Brodkorb et al., 2019), amelynek újdonsága, hogy az enzimes bontást a módszer meghatározott aktivitással végzi.

Mivel a halak esetében nem született egységes konszenzus az emésztési modellre vonatkozóan, így ebből a humán emésztésre vonatkozó egyezményes protokollból kiindulva építenénk fel a hal emésztési modelleket. Éppen ezért célunk, hogy specifikusan mérjük a halak gyomor és béltartalmának enzimaktivitását (COST Infogest *in vitro* humán emésztési

modellezésnek megfelelően, Brodkorb et al., 2019). A mért aktivitásoknak ismeretében összeállíthatjuk az említett két típusú *in vitro* emésztési modellt.

A halak esetén még mindig nincs laboratóriumok közötti vizsgálat az akvakultúrában alkalmazott *in vitro* emészthetőségi módszerek elemzésére és standardizálására (Moyano és mtsai 2015). Az egyedüli publikáció, melynek célja a kefeszegély membrán tisztásának és a lúgos foszfatáz mennyiségi meghatározásának standardizációja a halakban, és említést tesz a többi emésztőenzimről is, a Gisbert és mtsai (2018) által írt tanulmány.

A halak emésztésének modellezése során különböző konfigurációkat alkalmaznak (Moyano és mtsai 2015). Ezek az 12. ábrán bemutatott *in vitro* módszerekből és ezek kombinálásából állnak.



12. ábra: Az emésztőrendszerben végbemenő folyamatok és az ezeket modellező *in vitro* módszerek közötti korreláció. Moyano és mtsai (2015) 1. ábrájának a fordítása. A pH-drop módszer esetén a pH csökkenését figyelik, míg a pH-stat alkalmazása során NaOH hozzáadása révén tartják fenn a konstans pH értéket. A membrán reaktorok esetén eltérő pórusméretű (1.000-3.500 Da) dialízis membránt alkalmaznak, melyen keresztül a hidrolízis során felszabaduló aminosavak, redukáló cukrok vagy ásványi anyagok távoznak a rendszerből, egy perisztaltikus pumpa által biztosított folyamatos áramlásnak köszönhetően. A kifordított bél technika során a bél különböző részeit tartják fenn oxigénezett Ringer oldatban, hogy a molekulák mozgását mérijék a sejt membrán barrieren keresztül, különböző körülmények között. A vastagbélbeni fermentáció vizsgálata különösen fontos a növényi eredetű összetevők vizsgálata esetén (Moyano és mtsai 2015).

A modell kialakítása során a megfelelő konfiguráció kiválasztása mellett fontos, hogy a fő működési körülményeket a kiválasztott faj emésztőrendszerének megfelelően válasszuk ki (Moyano és mtsai 2015). A legfontosabb tényezők, melyeket figyelembe kell venni: az enzimek típusa, forrása és mennyisége, a pH, a hőmérséklet és a reakció idő (Moyano és mtsai 2015).

A legtöbb vizsgálat mely a vízi állatok *in vitro* emésztését modellezte, az emésztőrendszer különböző részeiből kinyert enzim kivonatokat használt (Moyano és mtsai 2015). Bizonyos

esetekben, a teljes szervezetet vagy ennek a digestáját használták fel enzim forrásként (Moyano és mtsai 2015). A tanulmányok nagy része emlős vagy baktérium eredetű kereskedelmi forgalomban kapható enzimet használ, és számos publikáció hasonlította össze a két forrásból származó enzimekkel kapott eredményt (Moyano és mtsai 2015). Több kutatócsoport is bizonyította, hogy a hal emésztőenzimek, különösen a proteázok a többi gerincestől eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, főleg a szubsztrátokkal szembeni affinitásra, a reakciósebességre, a hőmérséklet optimumra és az inhibitorokkal szembeni érzékenységre vonatkozóan (Moyano és mtsai 2015). Ezért az adott fajból származó emésztő enzim kivonatok használata a biológiai elérhetőség sokkal pontosabb becslését teszi lehetővé (Moyano és mtsai 2015). A kutatók által alkalmazott enzim mennyiség jelentős mértékben változik és a legtöbb esetben az enzim-szubsztrát arány nincs egyértelműen megadva és élettani szempontból alátámasztva (Moyano és mtsai 2015).

A mérésekhez kiválasztott pH általában 2 vagy 3 a savas fázis során; és 7,5-9 a lúgos szakasz alatt (Moyano és mtsai 2015). A 7,5-9 közötti pH értékek lehet, hogy nem tükrözik a legtöbb faj emésztőrendszerére jellemző körülményt (Moyano és mtsai 2015). A savas fázist alkalmazó modellek esetén a 2-es pH meglehetősen távol áll a valós körülményektől, mivel a halak gyomrában a pH általában jóval magasabb, és ez egyértelműen befolyásolja a pepszin működését és ez által a végeredményt (Moyano és mtsai 2015).

Az emésztés során a mintát általában 15-25 °C között inkubálják, de számos esetben az emlősökre jellemző hőmérsékletet (37 °C) alkalmazzák (Moyano és mtsai 2015). A 40 vagy 45 °C-os hőmérséklet használata nem számottevő (Moyano és mtsai 2015). A mérések időtartama szintén változékony, 5-15 perctől 12, sőt akár 24 óráig terjedhet; de a legtöbb esetben kevesebb, mint 3-4 óra (Moyano és mtsai 2015). A 15 °C-nak élettani alapja van, mivel hasonlít a legtöbb vízi szervezet testhőmérsékletére, de az alkalmazása nagyon lassú reakciót eredményezhet (Moyano és mtsai 2015). A magas hőmérséklet használata élettanilag nem megalapozott, de lehetővé teszi, hogy az eredményeket hamarabb megkapják (Moyano és mtsai 2015). Ezt figyelembe véve, a modellek során alkalmazott reakció idő, a szignifikáns és megbízható eredményekre való igény, valamint a laboratóriumi körülmények közötti megvalósíthatóság közötti kompromisszum következményének tűnik és magas változékonyságot mutat: 10 perctől (pH-drop módszer) 24 óráig (egyszerű digesterok) terjedhet (Moyano és mtsai 2015). A rövidnek bizonyuló reakció idők a zárt, kis reaktorokon alapuló modellek korlátait fedik fel, míg a hosszú ideig tartó inkubáció esetén a baktérium szennyezés, a reakció termékek miatti telítettség és az enzimek autohidrolízise befolyásolhatja az eredményt (Moyano és mtsai 2015).

Moyano és mtsai (2015) szerint a funkcionális gyomorral rendelkező halfajok esetén a gasztrikus fázist is modellezni kell.

Thongprajukaew és mtsai (2013) *Clarias batrachus* (békaharcsa) vékonybeléből vonták ki az emésztőenzimeket. A kivonatot az *in vitro* szénhidrát emészthetőségének vizsgálatára használták. Az amiláz aktivitást mérték, a *Clarias batrachus* esetén 1000 U-ot alkalmaztak. A reakció 25 °C-on, 24 órán keresztül zajlott.

Thongprajukaew és mtsai (2015) *Clarias macrocephalus* (szélesfejű harcsa) enzimek kivonattal fehérje és szénhidrát *in vitro* emészthetőséget vizsgáltak. A *Clarias macrocephalus* esetén 100 U tripszint és 1000 U amiláz használtak. A reakció 25 °C-on, 24 órán keresztül zajlott.

Leaner és Mason (2002) a metil higany biológiai hozzáférhetőségét vizsgálták az *Ictalurus punctatus* (pettyes harcsa vagy csatorna harcsa) gyomor- és bélmedveiben. Az enzim aktivitásról nem számolnak be, az emésztés során a mintát szobahőn inkubálták. A gyomor szakasz során a pH 1-2 között mozgott, a bélmedvek hozzáadását követően felment 8-ra. A gyomor szakasz modellezése 0,5, valamint 3 órán keresztül zajlott. A vékonybélmedvet olyan kimuszhoz adták, melyek esetén a gasztrikus szakasz 3 órás volt; majd 1 vagy 2 órán keresztül modellezték a vékonybél fázist.

Maitra és mtsai (2007) a proteáz inhibitoroknak a *Labeo rohita* (rohu) emésztőenzimeire kifejtett hatását vizsgálták. A *L. rohita* gyomor nélküli pontyfélé. Az emésztőenzimeket a bél elülső- középső részéből vonták ki. A kivonatnak megmérték az összes proteáz és a tripszin aktivitását.

Vörös és mtsai (1997) a *Hypophthalmichthys molitrix* (fehér busa) általi fitoplankton emésztést tanulmányozták *in vitro* kísérletekkel. A bélmedveket a bél első 30 cm-éből gyűjtötték össze. Az enzim aktivitást nem jellemezték. A pH-t nem adják meg. A bélmedv fitoplankton elegyet 25 °C-on inkubálták 0, 2, 4, 8, 15, 30, 60 és 120 percen keresztül.

Sharma és mtsai (2016) 20 növényi összetevő *in vitro* emészthetőségét vizsgálták a pH-stat módszerrel a *Labeo rohita* és a *Cyprinus carpio* (ponty) esetén. Az emésztőenzim kivonatot a halak emésztőrendszeréből és a vele társuló mirigyekből készítették el. Megmérték az össz proteáz aktivitást, valamint a tripszin és kimotripszin aktivitást. 10 g szubsztráthoz 200 µl (0,250 U mg fehérje⁻¹) nyers enzim kivonatot adtak. A kísérletet 25 °C-on végezték el, a pH-t 8-as értéken tartották. Ugyanazon összetevő esetén faj-specifikus emészthetőséget mutattak ki.

Kumar és mtsai (2007) a pontyfélék családjába tartozó 3 faj, a *Catla catla*, a *Labeo rohita* és a *Hypophthalmichthys molitrix* emésztő proteázainak a tulajdonságait és a hatékonyságát vizsgálták. A három fajból származó enzim készítménnyel pH stat hidrolízist hajtottak végre

négy különböző fehérjeforráson. Az enzim kivonatot a teljes emésztőrendszerből (a hepatopancreast is beleértve) készítették. Összes proteáz, tripszin és kimotripszin aktivitást mértek. 0,08 g fehérje tartalmú szubsztráthoz 0,25 U proteáz aktivitású enzim kivonatot adtak, a pH-t 8-as értéken tartották 1 órán keresztül 27 °C-on.

Eid és Matty (1989) *Cyprinus carpio* bélkivonattal vizsgálták különböző fehérje források emészthetőségét. A bél kivonat teljes proteáz aktivitását mérték. A reakciót 2985 BAEE egység (0.399 azocasein egység) teljes bélkivonattal, 37°C-on 24 órán keresztül hajtották végre. A kiindulási pH érték 9,5 volt, ami gyorsan lecsökkent a reakció kezdetekor: 7,5 és 8,2 közötti értékre a vizsgált mintától függően.

Grabner és Hofer (1985) fehérjék *in vitro* emészthetőségét vizsgálták *Cyprinus carpio* (ponty) bél kivonattal. A proteáz aktivitás 370 U·ml⁻¹ volt. A reakció 6,75-ös pH-n, 23 °C-on, 5 órán keresztül zajlott.

Yasumaru és Lemos (2014) szivárványos pisztrángra (*Oncorhynchus mykiss*), *Rachycentron canadum*-ra, és nílusi tilápiára (*Oreochromis niloticus*) vonatkozó faj specifikus, pH-stat alapú *in vitro* fehérje emésztést mutatnak be. A faj specifikus enzim kivonatok hidrolitikus képességét tisztított fehérje szubsztrátumok (hemoglobin a gyomor esetén és kazein a pilorikus caeca/bél esetén) hidrolízisének mérésével (pH-stat módszer) standardizálták. Yasumaru és Lemos (2014) szerint a leggyakrabban a fajspecifikus emésztőenzim kivonatok a tripszin vagy kimotripszin vagy összes lúgos proteáz aktivitás alapján standardizálják, példákat is hoznak fel ilyen publikációkra.

Carter és mtsai (1999) tisztított kereskedelmi forgalomban kapható, valamint atlanti lazacból vagy déli kékúszójú tonhalból nyert enzimekkel mért *in vitro* emészthetőség mérések eredményeit hasonlították össze. A nyers enzim kivonatok tripszin aktivitását az α -N-benzoil-D,L-arginin-p-nitroanilid alapú (BAPNA) módszerrel mérték és az enzim oldatokat ez alapján standardizálták.

Annak ellenére, hogy az *in vivo* vizsgálatok élettani pontosságát az *in vitro* modellek nem érhetik el, az *in vitro* hal emésztési protokollok fontos eszközei lehetnek a takarmányfejlesztésnek. Az interindividuális variabilitásnak és azoknak a környezeti tényezőknek köszönhetően, melyek az emésztést befolyásolják, az *in vitro* emésztés reprodukálhatósága nemcsak nagyobb, mint az állatkísérleteké, de könnyebben is értelmezhető. Ugyanakkor az *in vitro* modellekkel végzett vizsgálatok, általában gyorsabbak, mint az *in vivo* kísérletek, lehetővé téve az állatkísérletekben vizsgált minták előzetes szűrését (csökkentését).

5.3.1. A haltáp csapósüger enzimekivonatokkal történő *in vitro* emésztése

A megetetett halakat óránként levágták a Debreceni Egyetem kutatói, hogy megvizsgálják a táp mikor halad át a gyomorba, majd a gyomorból a vékonybélbe. A cél az volt, hogy mind a gyomorban, mind a vékonybélben találjanak tápot, hogy ezzel biztosítva legyen az enzintermelődés az emésztőrendszerben, így az enzimaktivitás mérés lehetősége. Azt tapasztalták, hogy a táp több órás emésztés után is a gyomorban, illetve a vékonybélben maradt, nem történt teljes kiürülés a vizsgálati idő alatt. Az emésztőrendszerben történő áthaladás során a lemért gyomor és vékonybél tartalmi adatok nagyon szórtak, ami a nagy interindividuális variabilitásra utal. Éppen ezért jelenthetjük ki, hogy nagyon nehéz az *in vivo* körülményeket megfelelő módon leutánozni. A vizsgálat itt 24 órán keresztül zajlott, erre volt lehetőség, de az eredmények alapján az a következtetés vonható le, hogy több napig is emésztí a hal a tápot.

Ugyanakkor Griffiths (1976) kutatásában a *Gobiomorphus eotidianus*-al táplált, 17 °C-on tartott csapósügek (348 mm-405 mm,) esetében arra a következtetésre jutott, hogy 16 óra alatt az elfogyasztott táplálék 88 %-a kiürült a halak szervezetéből. Tapasztalatai alapján a táplálék felvétel utáni pár órában hagyta el a legtöbb táplálék a gyomrot, az áthaladó mennyiség exponenciálisan csökkent. Arról is beszámolt, hogy az éheztetett halak emésztése lassabb, mivel ilyenkor az emésztőenzimek mennyisége lecsökken.

Schneider (1973) értekezése is hasonló eredményeket közöl. Vizsgálatában a halak emésztését több hőmérsékleten (7,8; 14,4; 22,2; 27,2 °C) és különböző méretű (9,7; 28,2; 49,1; 105,8 g) sügekkel vizsgálta. Táplálékként a tűzcselle (*Pimephales promelas*) halfajt alkalmazta. Az eredményei alapján elmondható, hogy a nagyobb egyedek több tápot voltak képesek megemészteni adott idő alatt, mint a kisebb példányok, ez a kapcsolat lineárisnak mutatkozott. A halak a tömegük 2,1 %-nak megfelelő táplálékot kaptak. 7,8 °C-os körülmények között a teljes emésztéshez nagyjából 72 óra volt szükséges a halak méretétől függetlenül. 14,4 °C-on ez az időtartam 24 órára redukálódott, míg 27, 2 °C mellett kevesebb mint 10 óra volt. Ezen kutatások alapján a hőmérsékelt nagyban befolyásolja az emésztés sebességét.

A több napig tartó emésztést próbáltam előmodellezni, hogy meg tudjam becsülni mennyi idő alatt és milyen minőségben emésztődik le a táp. Ebben az az újdonság, hogy a tápot a halból kinyert emésztőenzimokkal emésztettem le, és különböző időket próbáltam beállítani az emésztési idő megállapítására.

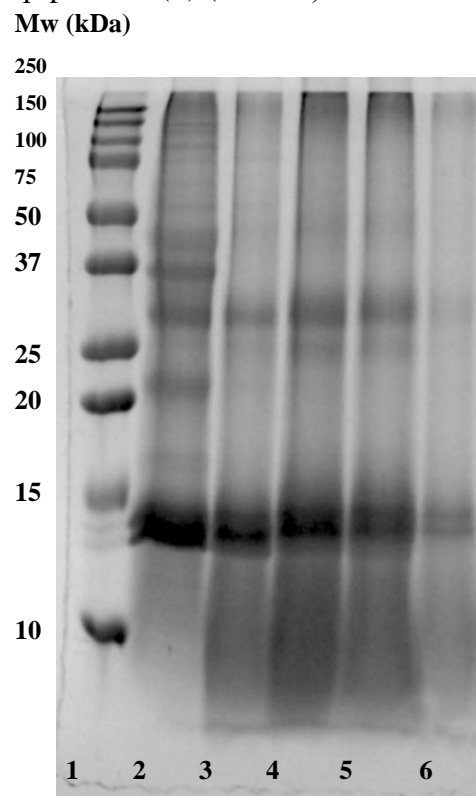
A haltápot halenzimokkal *in vitro* 20°C-on emésztettük meg, ahol a hal pepszin aktivitása 6675 U/ml; a hal pankreatikus tripszin aktivitása: 57,11 U/ml volt.

Wang et al., (2021) ajánlása alapján 0,6 ml gyomornedvet, és 0,8 ml vékonybélnedvet alkalmaztam a modellezéskor, a sügərből kimosott higított gyomornedvekkel.

Azonban ahhoz, hogy az *in vivo* körülményeket kellőképp reprodukáljuk, *in vitro* a nagyobb enzimmennyiség hatását is vizsgáltam. A higított nedvekkel felállítottam egy olyan *in vitro* modellt is, ahol a végtér fogat 3 ml volt gyomortartalomnál, a vékonybél tartalomnál pedig 4 ml. Ez a Wang cikke alapján javasolt ml-nyi mennyiség 5x -ének felel meg (ugyanannyi szubsztráthoz 5x annyi enzimet adtunk) így a szubsztrát és az enzim találkozásának nagyobb esélyt jósoltam.

A gyomor szakasz modellezése 2 napos volt, a vékonybélben való emésztést pedig 1 vagy 4 napos inkubáció esetén vizsgáltam.

Az *in vitro* emésztés után SDS-PAGE módszerrel vizsgáltam az emésztés hatékonyságát a precipitáció után kapott táp-pelleten (P) (14.ábra).



13. ábra: Sügértáp sügér enzimkivonatokkal történő *in vitro* emésztése, a tápfehérjék

1: Mw bomlásának vizsgálata SDS-PAGE-val

2: sügértáp

3: Sügér táp (P), 0,6 ml gyomornedv (2nap)

4: Sügér táp (P), 0,6 ml gyomornedv (2nap) +0,8 ml vékonybélnedv (1nap)

5: Sügér táp (P), 0,6 ml gyomor (2nap) +0,8 ml vékonybélnedv (4 nap)

6: Sügér táp (P), 3 ml gyomor (2nap) +4 ml vékonybélnedv (4 nap)

A 14. ábrán jól látható, hogy minden *in vitro* modell-rendszer esetében a táp fehérjéi bomlásnak indultak. Azonban itt is rövid volt az idő, látszik, hogy nem tudott teljesen

lebomlani a fehérje. A 37 kDa feletti fehérjesávok többsége eltűnt, vagy vesztett intenzitásából, a 22 kDa körül látható erős fehérjesáv pedig teljesen lebomlott. Az emésztés hatására a 15 kDa alatt megjelenő diffúz zónák a lebomlott peptidek jelenlétére utalnak. A tápban két erős fehérjesáv azonban az emésztés hatására sem vesztett intenzitásából, azaz nem bomlott le.

Az ábrán az is látható, hogy a nagyobb enzimmennyiség használata esetében valóban a fehérjeszubsztrához jobban hozzákapcsolódhatott az enzim, és erősebb bomlást eredményezett.

Azonban meg kell jegyezni azt is, hogy csak etetett halakból tudtuk kivonni az emésztőnedven keresztül az enzimeket. Az így kapott kivonatnak viszont így az az hátránya, hogy benne van a táp is, ami a gélen megjelenhet.

5.3.2. A haltáp sertés pepszinnel és sertés pankreatinnal történő *in vitro* emésztése

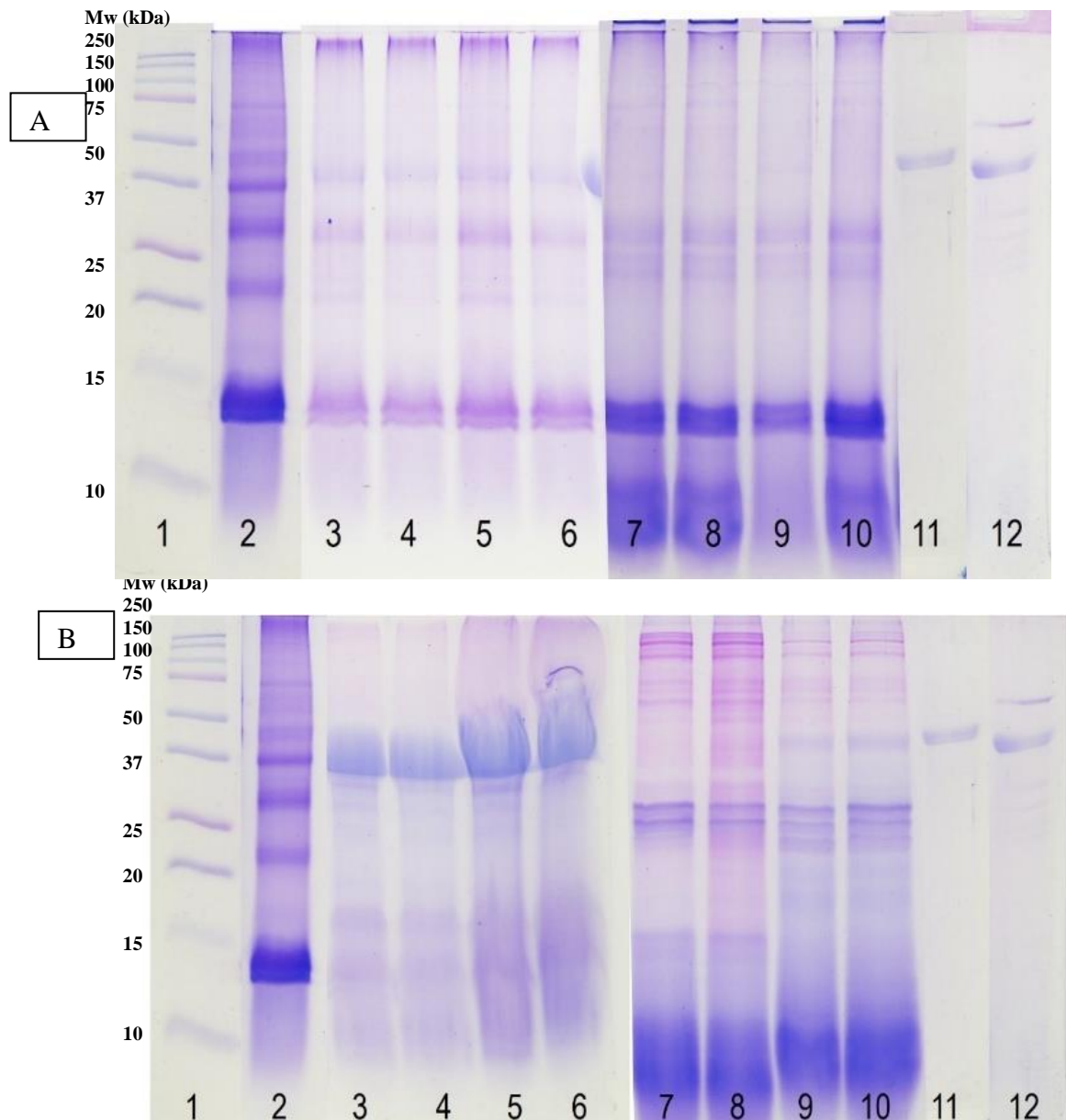
A kereskedelmi forgalomban kapható tisztított enzimekkel (pl. sertés eredetű) összerakott *in vitro* modell alkalmazása révén csökkenthetjük a kísérleti célra felhasználható halak mennyiségét. Ez egy ellenőrzött, reprodukálható (nincsenek inter-individuális különbségek) módja lehet a haltápok emészthetőségének és minőségének jellemzésére előzetes tájékozódásként.

Az emlős enzim teljesen más típusú, mint a hal enzim. Mivel a kereskedelemben nem kapható hal emésztőenzim ezért halból kell közvetlenül kinyerni. Több tanulmány vizsgálta a halakból kinyert, valamint az emlős enzimeket és arra a következtetésre jutottak, hogy a halak kivonatából származó proteázok nagyobb fokú hidrolízisre képesek, mint az emlősök enzimjei. Az emlősök emésztőenzimeit a halakhoz képest érzékenyebbek az inhibitorok jelenlétére (Moyano et al. 2015). Több kutatás szerint az *in vitro* emészthetőségi vizsgálat elvégzése fajspecifikus emésztőenzim-kivonatokkal lehetővé teszi az *in vivo* körülményekkel való összehasonlítást (Wang et al. 2021). Wang et al., (2021) kijelentése ellenére, sok olyan újabb cikk van, melyekben emlős enzimekkel modellezték a hal emésztést. Ilyenek például: Arndt et al., (2015); Silva et al., (2020); Yu et al., (2022); Tibbetts & Patelakis, (2022); Oldham et al., (2023).

Ezenkívül, olyan okból kifolyólag is alkalmazzák, hogy kereskedelmi forgalomban nem elérhető a hal enzim, valamint azért is, mert a halenzimeket nehéz kitisztítani.

Mivel Wang és munkatársai (2021) szerint az emlős enzimek és hal enzimek között különbség van, megvizsgáltam, hogy ez mennyire igaz. Emiatt -akárcsak a halas enzimek esetében is a táp emészthetőségét először rövidebb időperiódusban emésztettem (2 óra vagy 4 óra) (nem feltételeztem, hogy a hal enzimekkel kapott eredmények megalapozhatják az emlős enzimeket alapuló sügér *in vitro* modellt).

Sertés pepszint és sertés pankreatint használtam a sügértáp *in vitro* emésztéséhez. A pepszin aktivitást és a pankreatikus tripszin aktivitást a 20°C-on tartott csapósünger halak mért aktivitásának megfelelően állítottam be (pepszin aktivitás: 6675 U/ml; a hal pankreatikus tripszin aktivitás: 57,11 U/ml). Az emésztést 20°C-on végzettem. Ezzel szemben vannak olyan kutatók is, akik az emésztést 37°C-on végzik, arra hivatkozva, hogy a nagyon lassú emésztés során elszaporodhatnak a baktériumok és az enzimek is inaktiválhatják saját magukat (proteázok lebontják magukat és egymást).



14. ábra: Táp *in vitro* emésztése sertés pepszinnal és sertés pankreatinnal. A tápfehérjék bomlásának vizsgálata -SDS-PAGE-val -az emésztmény üledékében (A) és felülúszóban (B)

- 1: Mw
- 2: táp
- 3: táp, 3 ml gyomornedv, 2 órás gyomor szakasz
- 4: táp, 3 ml gyomornedv, 4 órás gyomor szakasz
- 5: táp, 1 ml gyomornedv, 2 órás gyomor szakasz
- 6: táp, 1 ml gyomornedv, 4 órás gyomor szakasz
- 7: táp, 3 ml gyomornedv, 4 órás gyomor szakasz, 4 ml vékonybélmedv, 2 óra vékonybél szakasz
- 8: táp, 3 ml gyomornedv, 4 órás gyomor szakasz, 4 ml vékonybélmedv, 4 óra vékonybél szakasz
- 9: táp, 3 ml gyomornedv, 4 órás gyomor szakasz, 1 ml vékonybélmedv, 2 óra vékonybél szakasz
- 10: táp, 3 ml gyomornedv, 4 órás gyomor szakasz, 1 ml vékonybélmedv, 4 óra vékonybél szakasz
- 11: pepszin
- 12: pepszin + pankreatin

A 15./A. ábrán jól látható, hogy minden *in vitro* emésztési modell beállítás esetében a táp kisebb mértékű bomlása megtörtént. Az emésztett táp fehérjesávjainál a kiindulási táphoz képest intenzitáscsökkenés tapasztalható. Azonban megállapítható, hogy a kísérleti emésztési idő nem volt elegendő a táp teljes megemésztéséhez. A 7-10. sávokban található minták esetében a gyomor-fázist vékonybél-fázis követte. Ez esetben az emésztés erőteljesebb, amit bizonyítanak a 10 kDa alatt megjelenő diffúz sávokban rejlő lebomlott peptidek.

A 15./B ábrán az emésztés után, a minta centrifugálásával kapott felülúszók láthatóak. A 3-6-os oszlopokban az elhúzódozó fehérjesáv a pepszin jelenlétét feltételezi, míg a 15 kDa körüli és alatti sávok néhány felülúszóba átmosódott peptidfehérjére utalnak. A 7-10 oszlopokban a pankreatin enzimekészlete látható, valamint az alsó diffúz sávok az átmosódott lebomló peptidfehérjéket is tartalmazzák.

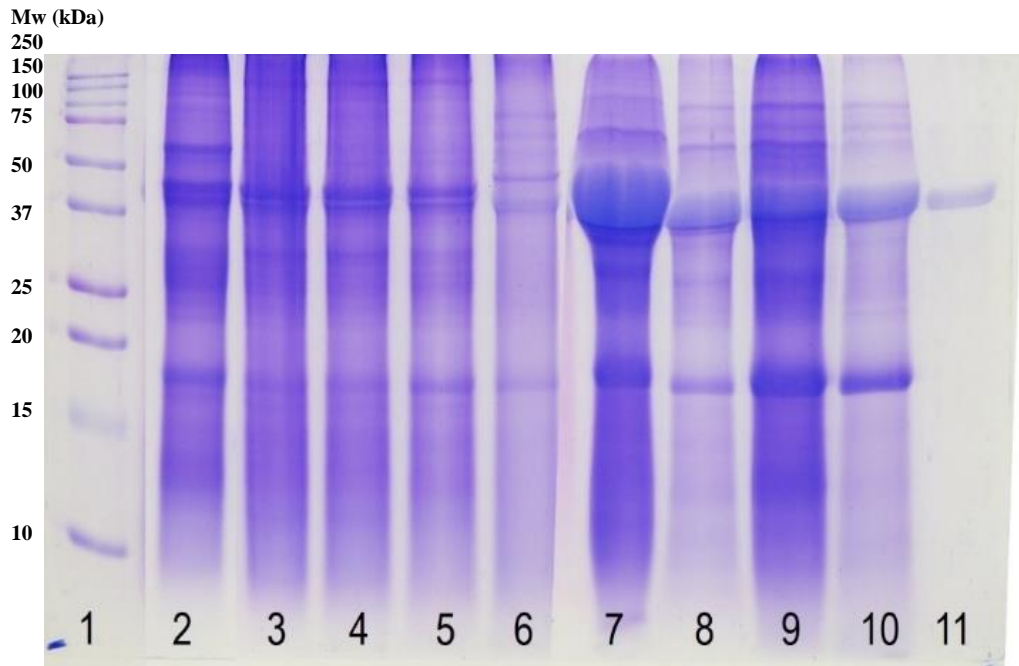
További kísérleti beállítások elvégzésére még szükség lesz a jövőben.

5.3.3. A lisztukac emlős pepszinnel történő *in vitro* emésztése

Mivel bizonyítottam, hogy a táp sertés enzimekkel történő emésztése hasonló eredményeket adott csapósünger emésztőnedv kivonatokkal végzett modellhez, a továbbiakban a takarmány alapanyagok emésztését is (pl. lisztukac) sertés eredetű enzimekkel modelleztem. A teljes modellvizsgálatnál fontos az első lépés, a gyomorszakasz szimulálásának beállítása, így jelen kutatásomban ennek a modellezésére fektettem most hangsúlyt.

A halliszt a haltáp legjobb fehérjeforrása, de drága, és ökológiai és gazdasági szempontból egyre nehezebb hozzáférni. A lisztukac alkalmas lenne felváltani a halliszt egy részét, mivel könnyen fenntartható, könnyen előállítható.

Sertés pepszint és sertés pankreatint használtam a lisztkekac *in vitro* emésztéséhez. A pepszin aktivitást és a pankreatikus tripszin aktivitást a 20°C-on tartott csapósünger halak mért aktivitásának megfelelően állítottam be (pepszin aktivitás: 6675 U/ml; a hal pankreatikus tripszin aktivitás: 57,11 U/ml). A gyomorban zajló emésztést 20°C-on végeztem, 2 óras vagy 4 óras inkubációs idővel



15. ábra: Lisztkekac *in vitro* emésztése sertés pepszinnel

A bomlás vizsgálata -SDS-PAGE-val -az emésztmény üledékében (A) és felülúszóban (B)

- 1: Mw
- 2: Kicsi, nem zsírtalanított lisztkekac
- 3: 3 ml gyomornedv, 2 óras gyomor szakasz, üledék
- 4: 3 ml gyomornedv, 4 óras gyomor szakasz, üledék
- 5: 1 ml gyomornedv, 2 óras gyomor szakasz, üledék
- 6: 1 ml gyomornedv, 4 óras gyomor szakasz, üledék
- 7: 3 ml gyomornedv, 2 óras gyomor szakasz, felülúszó
- 8: 3 ml gyomornedv, 4 óras gyomor szakasz, felülúszó
- 9: 1 ml gyomornedv, 2 óras gyomor szakasz, felülúszó
- 10: 1 ml gyomornedv, 4 óras gyomor szakasz, felülúszó
- 11: pepszin

A 16. ábrán látható, hogy a lisztkekac a gyomor fázisban, a jelen beállított paraméterekkel kivitelezve, nem mutatott bomlást: a kiindulási lisztkekac liszthez képest az emésztett lisztkekac lisztek fehérje-eloszlásai nem különböztek egymástól.

A felülúszóban lévő fehérjék eloszlása hasonló az üledékben lévő fehérje-spetkrumhoz, itt valószínűleg a centrifugálási lépés nem volt megfelelő.

6. Összefoglalás

Az akvakultúra növekedése az elmúlt évtizedekben számottevő volt, ez a tendencia a jelenlegi folyamatok mellett nem fenntartható. A halgazdaságokban használt tápok nagyrészt hallisztból készülnek, ami gazdasági és természetvédelmi szempontból is előnytelen. Ezért az alternatív haltápok kifejlesztése komoly előnyökkel járhat.

Nagyon fontos lépés lenne az akvakultúrák takarmányok fejlesztésében, ha a számos potenciális tápösszetevőt és kész tápokot össze lehetne hasonlítani. Erre egy standardizált *in vitro* módszer megfelelő és hasznos lenne.

A halak esetén még mindig nincs laboratóriumok közötti vizsgálat az akvakultúrában alkalmazott *in vitro* emészthetőségi módszerek elemzésére és standardizálására

Kutatásom során bizonyítottam, hogy a hal emésztőnedvekből mérhető a pepszin, illetve a tripszin aktivitás, amelyek meghatározása az *in vitro* emésztési modellek felállításához elengedhetetlenek.

A sügérből kivont enzimekkel és a sertés enzimekkel a kereskedelmi haltáp *in vitro* emésztése sikeresnek bizonyult. A fehérjék bomlása kimutatható volt SDS-PAGE módszerrel. Ebből kifolyólag lisztukac emészthetőségét emlős enzimekkel modelleztem. A pepszin aktivitást és a pankreatikus tripszin aktivitást a 20°C-on tartott csapósügnél mért aktivitásának megfelelően állítottam be. A lisztukac esetében az SDS-PAGE módszer azonban nem mutatott fehérje bomlást. Ahhoz, hogy a csapósügnél emésztését emlős enzimekkel modellezzük, további vizsgálatokra lesz szükség.

További kutatási cél lehet a halakból kivont gyomor és bélnedvek liofilizálása, amivel koncentráltabb enzimkivonatot nyerhetnénk, így nem hígulna ki az emésztmény az *in vitro* modellnél. Másik lehetőség az emésztőnedv kivonatokból az egyedi enzimek kitisztítása.

Vizsgálni szeretném további rovarlisztek emészthetőségét, valamint a tápok fő alkotóelemének: a hallisztnek az emészthetőségét, ezenkívül a rovarlisztekkel kevert tápok emészthetőségét.

7. Irodalomjegyzék

Abd El-Gawad, E. A., Wang, H. P., & Yao, H. (2019): Diet supplemented with synthetic carotenoids: Effects on growth performance and biochemical and immunological parameters of yellow perch (*Perca flavescens*). *Frontiers in physiology*, 10, 1056.

A Bizottság 68/2013/EU rendelete (2013. Január 16.) A takarmány-alapanyagok jegyzékéről EGT-vonatkozású szöveg, 029 OJ L (2013). <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/68/oj/hun>

A Halaink Táplálása élő Eleséggel, Saját Tenyészetek Kialakítása II. Fejezet. (é. n.). Elérés 2023. október 25., forrás <https://zsibizoo.hu/halaink-taplalasa-elo-eleseggel-sajat-tenyeszetek-kialakitasa-2>

Alarcón, F. J., Díaz, M., & Moyano, F. J. (1997): Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 22, 113-121.

Almeida A.P.G., Zardo E.L., Toni C., Behr E.R., da Silva L.P., Vieira J.P., Loro V.L., Baldisserotto B. (2018): Composition of gastrointestinal content, protease and lipase activities in summer and winter of four freshwater siluriforms (Teleostei: Actinopterygii) with two different feeding habits. *Zoologia* 35: e13286.

Arndt, C., Sommer, U., & Ueberschär, B. (2015). A comparative in-vitro-test on the digestibility of live prey for fish larvae under specific consideration of trypsin. *Aquaculture*, 446, 12–16.

Az Európai Parlament és a Tanács 999/2001/EK rendelete (2001. Május 22.) egyes fertőző szivacsos agyvelőbántalmak megelőzésére, az ellenük való védekezésre és a felszámolásukra vonatkozó szabályok megállapításáról, 03, 032 DD (2001). <http://data.europa.eu/eli/reg/2001/999/oj/hun>

Az Európai Parlament és A Tanács 178/2002/EK rendelete (2002.Január28.) az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról, 15, 006 DD (2002). <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj/hun>

Az Európai Parlament és a Tanács 183/2005/EK rendelete (2005. Január 12.) a takarmányhigiénia követelményeinek meghatározásáról (EGT vonatkozású szöveg), 035 OJ L (2005). <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/183/oj/hun>

A Bizottság 142/2011/EU rendelete (2011. Február 25.) A nem emberi fogyasztásra szánt állati melléktermékekre és a belőlük származó termékekre vonatkozó egészségügyi szabályok megállapításáról szóló 1069/2009/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet végrehajtásáról, valamint a 97/78/EK tanácsi irányelvnek az egyes minták és tételek határon történő állat-egészségügyi ellenőrzése alóli, az irányelv szerinti mentesítése tekintetében történő végrehajtásáról EGT-vonatkozású szöveg, 054 OJ L (2011). <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/142/oj/hun>

Bassompierre, M., Børresen, T., Sandfeld, P., Rønsholdt, B., Zimmermann, W., & McLean, E. (1997): An evaluation of open and closed systems for in vitro protein digestion of fish meal. *Aquaculture Nutrition*, 3(3), 153-159.

Belforti, M., Gai, F., Lussiana, C., Renna, M., Malfatto, V., Rotolo, L., ... & Gasco, L. (2015): Tenebrio molitor meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets: effects on animal performance, nutrient digestibility and chemical composition of filets. *Italian Journal of Animal Science*, 14(4), 4170.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufou, r C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Martins, C., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Minekus, M., Portmann, R., Santos, C.N., Souchon, I., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. & Recio, I. (2019): INFOGEST Static In Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion. *Nature Protocols*, 14(4):991–1014.

Carter CG, Bransden MP, van Barneveld RJ, Clarke SM. Alternative methods for nutrition research on the southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*: in vitro digestibility. *Aquaculture* 1999; **179**(1-4): 57-70.

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens),Turck D, Castenmiller J, De Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Kearney J, Maciuk A, Mangelsdorf I, McArdleHJ, Naska A, Pelaez C, Pentieva K, Siani A, Thies F, Tsabouri S, Vinceti M, Cubadda F, Frenzel T,Heinonen M, Marchelli R, Neuhäuser-Berthold M, Poulsen M, Prieto Maradona M, Schlatter JR, vanLoveren H, Ververis E and Knutsen HK, 2021. Scientific Opinion on the safety of dried yellowmealworm (*Tenebrio molitor*larva) as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSAJournal* 2021;19(1):6343, 29 pp.<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6343>ISSN:1831-4732©2021

Eid AE, Matty AJ. A simple in vitro method for measuring protein digestibility. *Aquaculture* 1989; **79**: 111–119.

Fish and seafood consumption per capita. (é. n.). Our World in Data. Elérés 2023. október 24., forrás <https://ourworldindata.org/grapher/fish-and-seafood-consumption-per-capita>

Flóra, H. (2023, augusztus 12). *Tenebrio molitor*, a csodabogár. TerraPlaza magazin. <https://terraplaza.com/magazin/hu/izeltlabuak-hu/tenebrio-molitor-a-csodabogar/3872/>

Fuchise, T., Sekizaki, H., Kishimura, H., Klomklo, S., Nalinanon, S., Benjakul, S., & Chun, B. S. (2011). Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis. *Journal of amino acids*, 912382. doi: 10.4061/2011/912382

Furné M., Hidalgo M. C., López A., García-Gallego M., Morales A. E., Domezain A., Domezainé J., Sanz A. (2005): Digestive enzyme activities in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study, *Aquaculture*, Volume 250, Issues 1–2, Pages 391-398, ISSN 0044-8486

Gebremichael A., Stettner G., Varga D., Kucska B. (2020): alternatív fehérjeforrás – lisztkekac (*tenebrio molitor*) alkalmazása harsa (*silurus glanis*) takarmányokban, *Halászatfejlesztés 37 – Fisheries & Aquaculture Development 37* (2020) p.102-103

Gisbert E, Nolasco H, Solovyev M. Towards the standardization of brush border purification and intestinal alkaline phosphatase quantification in fish with notes on other digestive enzymes. *Aquaculture* 2018; 487: 102-108. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.01.004

Griffiths, W. E. (1976): Feeding and gastric evacuation in perch (*Perca fluviatilis* L.).

Grabner M, Hofer R. The digestibility of the proteins of broad bean (*Vicia faba*) and soya bean (*Glycine max*) under *in vitro* conditions simulating the alimentary tracts of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture* 1985; 48: 111–122.

- Gubicskóné K. A., Szabó Z. (2015): Élelmiszer-tudományi ismeretek, Medicina Könyvkiadó Zrt., ISBN 978 963 226 561 2
- Hancz Cs. (2007): Haltenyésztés, Halak biológiai sajátosságai, p. 44-46
- Hancz Cs., Horváth L., Kiss I., Mézes M., Orbán L., Ördög V. Szabó T., Szűcs I., Urbányi B., Váradi L. (2000): Halbiológia és haltenyésztés, Mezőgazda kiadó, p. 72-75
- Hankó, B. (1945). Halak (No. 88.). Magyar Szemle Társaság.
- Johnston, G. (2008). Arctic Charr Aquaculture. John Wiley & Sons.
- Kolkovski, S., Yackey, C., Czesny, S., & Dabrowski, K. (2000): The effect of microdiet supplementation of dietary digestive enzymes and a hormone on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. *North American Journal of Aquaculture*, 62(2), 130-134.
- Kumar S, Garcia-Carreno FL, Chakrabarti R, Toro MAN, Cordova-Murueta JH. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. *Aquaculture Nutrition* 2007; 13(5): 381-388. doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00488.x
- halak.ewk.hu. (é. n.). Sügér. halak. Elérés 2023. október 24., forrás <https://halak.ewk.hu/suger/>
- Harpaz S., Uni Z. (1999): Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Volume 124, Issue 2, p. 155-160, ISSN 1095-6433
- Hart, S.D., Garling, D.L., Malison, J.A., 2006. Yellow perch (*Perca flavescens*) culture guide. <https://www.ncrac.org/files/biblio/YellowPerchPub.pdf> (accessed 2 October 2022).
- Henry, M. A., Gai, F., Enes, P., Peréz-Jiménez, A., & Gasco, L. (2018): Effect of partial dietary replacement of fishmeal by yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae meal on the innate immune response and intestinal antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & shellfish immunology*, 83, 308-313.
- Hetényi, N. (2023). A lisztbogár (*Tenebrio molitor*) nagyüzemi előállítás [Mass production of yellow mealworm]. 72, 163–174.
- Horgaszat.hu. (é. n.). Csapó sügér – (*Perca fluviatilis*) • Horgaszat.hu. Elérés 2023. október 22., forrás <https://horgaszat.hu/csapo-suger-perca-fluviatilis/>
- Ido, A., Hashizume, A., Ohta, T., Takahashi, T., Miura, C., & Miura, T. (2019): Replacement of fish meal by defatted yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) larvae in diet improves growth performance and disease resistance in red seabream (*Pargus major*). *Animals*, 9(3), 100.
- Ji, H., Hu, J., Zuo, S., Zhang, S., Li, M., & Nie, S. (2022): In vitro gastrointestinal digestion and fermentation models and their applications in food carbohydrates. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(19), 5349-5371.
- Kim, Seong Hyeon, Choi, Wonho, Hong, Seong-Jin, & Kim, Nam-Jeong. (2012). Nutritional Value of Mealworm, *Tenebrio molitor* as Food Source. *International Journal of Industrial Entomology*, 25(1), 93–98.
- Kolkovski, S., Yackey, C., Czesny, S., & Dabrowski, K. (2000): The effect of microdiet supplementation of dietary digestive enzymes and a hormone on growth and enzyme activity in yellow perch juveniles. *North American Journal of Aquaculture*, 62(2), 130-134.
- Kumar S, Garcia-Carreno FL, Chakrabarti R, Toro MAN, Cordova-Murueta JH. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial

characterization and protein hydrolysis efficiency. *Aquaculture Nutrition* 2007; 13(5): 381-388. doi: 10.1111/j.1365-2095.2007.00488.x

Laboratory, N. G. L. E. R. (é. n.). NOAA National Center for Research on Aquatic Invasive Species (NCRAIS). Elérés 2023. október 24., forrás https://nas.er.usgs.gov/queries/greatlakes/FactSheet.aspx?Species_ID=3636&Potential=Y&Type=2

Langeland M, Lindberg JE, Lundh T (2013): Digestive Enzyme Activity in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*) and Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*). *J Aquac Res Development* 5: 208 doi:10.4172/2155-9546.1000208

Lawal, K. G., Kavle, R. R., Akanbi, T. O., Miroso, M., & Agyei, D. (2021): Enrichment in specific fatty acids profile of *Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens* larvae through feeding. *Future Foods*, 3, 100016.

Leaner JJ, Mason RP. Factors controlling the bioavailability of ingested methylmercury to channel catfish and Atlantic sturgeon. *Environmental Science & Technology* 2002;36(23):5124-9.

Lemieux, H., Blier, P. & Dutil, JD. (1999): Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*)?, *Fish Physiology and Biochemistry* 20, p. 293–303

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A., & Fernández-López, J. (2018): In vitro digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423-436.

Machay T. (2014) A halak fehérje és aminosav tartalma, biohasznosulása és hatásai (elméleti vonatkozások), *Obesitologia Hungarica*, p.12

Maitra, S, Ramachandran S, Ray AK. In vitro assay of plant protease inhibitors from four different sources on digestive proteases of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), fingerlings. *Aquaculture Research* 2007; 38(2): 156-165. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01640.x

Martínez-Montaña, E. and Lazo, J.P. (2012), In Vitro Protein Digestibility of Dietary Ingredients Throughout Ontogeny of California Halibut, *Paralichthys californicus*, Larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43: 51-62.

Martos É., Varga A., Bakacs M. (2014): Halfogyasztás világszerte és hazánkban, *Obesitologia Hungarica*, p.12

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W. & Brodkorb, A. (2014): A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6):1113–1124

Molnár Á., Homoki D., Bársony P., Stündl L., Remenyik, J., Fehér M. (2020): A medenceszín hatása a csapósügér (*Perca fluviatilis*) termelési és élettani paramétereire, *Halászatfejlesztés*. 37 16-17, 2020.

Moyano F.J., Savoie L. (2001) Comparison of in vitro systems of protein digestion using either mammal or fish proteolytic enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 128 (2), pp. 359 – 368 DOI: 10.1016/S1095-6433(00)00315-9

- Moyano, F.J, de Rodriganez, M.A.S., Diaz, M., Tacon, A.G.J. (2015): Application of in vitro digestibility methods in aquaculture: constraints and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 7(4):223- 242.
- MTI. (2021, december 13). Folyamatosan növekszik a halfogyasztás. [https://Kormany.Hu](https://kormany.hu). <https://kormany.hu/hirek/folyamatosan-novekszik-a-halfogyasztas>
- Ng, W. K., Liew, F. L., Ang, L. P., & Wong, K. W. (2001): Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research*, 32, 273-280.
- Oldham, D., Dufey, W., & Minghetti, M. (2023). Development of an in vitro digestion system to study the bioavailability and bioreactivity of zinc sulfate and Zn-bioplex in fish using the RTgutGC cell line. *ACS Food Science & Technology*, 3(1), 141–149.
- Oliveira V. M., Bezerra R.S., Dias Assis C.R. (2014): Fish pepsin: basic characteristics, extraction, determination and biotechnological applications. *Natural Resources* 4:1, 1-14
- Orban, E., Nevigato, T., Masci, M., Di Lena, G., Casini, I., Caproni, R., ... & Rampacci, M. (2007): Nutritional quality and safety of European perch (*Perca fluviatilis*) from three lakes of Central Italy. *Food Chemistry*, 100(2), 482-490.
- Ravzanaadii, N., Kim, S. H., Choi, W. H., Hong, S. J., & Kim, N. J. (2012): Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. *International Journal of Industrial Entomology*, 25(1), 93-98.
- Research and Breeding of the Mealworm Insect | Protiberia. (é. n.). Elérés 2023. október 24., forrás <https://protiberia.com/en/mealworm/>
- Rust, M.B. (2002): Nutritional Physiology. In: Fish Nutrition. (Szerk. Halver, J.E., Harry, R.W.) Academic Press, San Diego, London, pp. 367-417.
- Sajtóközlemény | MDOSZ. (2020, október 14). <https://mdosz.hu/sajtokozlemeny/>
- Schneider, J. C. (1973): Rate of food digestion by yellow perch (*Perca flavescens*) in relation to size of perch, size and type of food, and temperature. Michigan Department of Natural Resources, Fisheries Division.
- Sharma JG, Kumar A, Saini D, Targay NL, Khangembam BK, Chakrabarti R. *In vitro* digestibility study of some plant protein sources as aquafeed for carps *Labeo rohita* and *Cyprinus carpio* using pH-Stat method. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2016;54(9):606-11.
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K. A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., & Jedras, M. (2013): Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as European novel food.
- Silva, M. S., Prabhu, P. A. J., Ørnsrud, R., Sele, V., Kröckel, S., Sloth, J. J., & Amlund, H. (2020). In vitro digestion method to evaluate solubility of dietary zinc, selenium and manganese in salmonid diets. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 57, 126418.
- Sügerek (Perca Art.) | Brehm: Állatok világa | Kézikönyvtár. (é. n.). Elérés 2023. október 24., forrás <http://www.arcanum.com/hu/online-kiadvanyok/Brehm-brehm-allatok-vilaga-8CCA/halak-pisces-5D43/>
- Temesi, Á. (2016): Miért nem eszik több halat a magyar?—Egyes halfogyasztást befolyásoló tényezők vizsgálata. *GAZDÁLKODÁS: Scientific Journal on Agricultural Economics*, 60(3), 210-224.

- Thongprajukaew K, Kovitvadhi U, Chandang P. Microwave irradiation improves physico-chemical properties of soya meal for economic freshwater fish. *Maejo International Journal of Science and Technology* 2015; 9(1): 43- 53. doi: 10.14456/mijst.2015.11
- Thongprajukaew K, Yawang P, Duda L, Bilanglod H, Dumrongrittamatt T, Tantikitti C, Kovitvadhi U. Physical modification of palm kernel meal improved available carbohydrate, physicochemical properties and *in vitro* digestibility in economic freshwater fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2013;93(15):3832-40. doi:10.1002/jsfa.6314.
- Tibbetts, S. M., & Patelakis, S. J. J. (2022). Apparent digestibility coefficients (ADCs) of intact-cell marine microalgae meal (*Pavlova sp. 459*) for juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Aquaculture*, 546, 737236.
- Tilami, S. K., Turek, J., Červený, D., Lepič, P., Kozák, P., Burkina, V., ... & Mráz, J. (2020): Insect meal as a partial replacement for fish meal in a formulated diet for perch *perca fluviatilis*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(12), 867-878.
- Toviho O., Bársony P. (2020): Insect base-protein: A new opportunity in animal nutrition. *Acta Agraria Debreceniensis*. 1 (May 2020), 129–138.
- Tóth, A., Németh, C., Noori, K., Pintér, R., Pásztor-Husár, K., & Friedrich, L. Opportunities of insect's protein supplementation of chicken's feeding. I. Magyar Rovaripari Konferencia 2018. február 23., 29.
- Tran H. Q., Nguyen T. T., Prokešová M. D., Matoušek J., Tomčala A., Van Doan H., Kiljunen M., Stejskal V. (2023): Insight into bioavailability of various insect meals for European perch (*Perca fluviatilis*): A nutritional and stable isotopic evaluation, *Aquaculture*, Volume 563, Part 2
- Tran H.Q., Prokešová M., Zare M., Matoušek J., Ferrocino I., Gasco L., Stejskal V. (2022): Production performance, nutrient digestibility, serum biochemistry, fillet composition, intestinal microbiota and environmental impacts of European perch (*Perca fluviatilis*) fed defatted mealworm (*Tenebrio molitor*) *Aquaculture*, 547, art. no. 737499. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737499
- van Huis, A., Oonincx, D.G.A.B. (2017): The environmental sustainability of insects as food and feed. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 37, 43
- Vörös L, Oldal I, Présing M, V.-Balogh K. Size-selective filtration and taxon-specific digestion of plankton algae by silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val) *Hydrobiologia* 1997; 342: 223- 228. doi: 10.1023/A:1017039423485.
- Yasumaru F, Lemos D. Species specific *in vitro* protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 2014; **426**:74-84. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.01.012.
- Yu, H., Chen, Y., & Zhu, J. (2022). Osteogenic activities of four calcium-chelating microalgae peptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(14), 6643–6649.
- vhfrgst. (2022, november 24). Fisch des Jahres 2023—Der Flussbarsch (*Perca fluviatilis*). Verband Hessischer Fischer e.V. <https://hessenfischer.net/fisch-des-jahres-2023-der-flussbarsch-perca-fluviatilis/>
- Wang, R., Mohammadi, M., Mahboubi, A., Taherzadeh, M.J. (2021): In-vitro digestion models: a critical review for human and fish and a protocol for invitro digestion in fish. *Bioengineered*, 12(1):3040- 3064

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Antal Otilia Tamara és Dr. Takács Krisztina témavezetőimnek, akik segítségével megismerhettem az *in vitro* emésztéses vizsgálatok folyamatát és számos aspektusát. Köszönöm a fáradtságos munkájukat, amivel a laboratóriumi méréseimet és a szakdolgozatom elkészülését segítették.

NYILATKOZAT

A szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Magyar Levente Károly
A Hallgató Neptun kódja: IQ3SQ6
A dolgozat címe: Különböző fehérjeforrások felhasználásával történő
haltáp fejlesztéshez szükséges hal *in vitro* vizsgálatok
A megjelenés éve: 2023
A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
A konzulens tanszékének a neve: Táplálkozástudományi Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemitulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2023.11.06.



Hallgató aláírása

NYILATKOZAT

Magyar Levente Károly (IQ3SQ6) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt:

Tócsai Krisztina Antal
belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendó.

² A megfelelő aláhúzendó.