

Antal Otilia Tamara, Nagy András, Takács Krisztina

Hal *in vitro* emésztési modellek kidolgozása haltenyésztés fenntarthatóságának elősegítése céljából

A szerzők elérhetősége

Antal Otilia Tamara | tudományos munkatárs
antal.otilia.tamara@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8321-5039> | levelező szerző

Nagy András | tudományos főmunkatárs
nagy.andras.dr@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-5458-2665>

Takács Krisztina | tudományos főmunkatárs
takacs.krisztina@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-7230-6346>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszertudományi Kutatócsoport
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

A takarmány aminosav- és zsírsavösszetétele jelentősen befolyásolja a halhús érzékszervi és technológiai tulajdonságait. A takarmányok fehérjetartalma elsődlegesen fontos, mert ellentétben a növényekkel, az állatok, beleértve a halakat is, csak fehérjékből képesek a testfehérjéjüket felépíteni. Az aminosavak egy részét a halak szervezete nem képes előállítani, ezeket a takarmányból veszik fel. A haltáp állati és növényi eredetű fehérjeforrásai eltérő összetételben tartalmazzák a különböző aminosavakat, és minden fehérje emészthetősége más. A haltáppokkal szembeni elvárás a jó emészthetőség, a fenntartható és gazdaságos beszerezhetőség. A kutatók új, alternatív fehérjedús takarmányalapanyagok (pl. rovarliszt) bevonásával próbálják fejleszteni a tápok biológiai értékét, hogy ezzel elérjék a halak megfelelő növekedését, a halminőség javítását.

A bevezetésre kerülő haltakarmányok minőségének igazolására *in vitro* hal emésztési modellek fejlesztése a cél, amely nagy kihívást jelent a kutatók számára. A halak nagy diverzitása, az emésztési folyamat komplexitása, az emésztést befolyásoló tényezők sokfélesége, az *in vivo* fiziológiás körülmények imitálása rendkívül nehéz feladat.

Kulcsszavak: haltakarmány, *in vitro* emésztési modell

Haltakarmányozás

A halak fehérjét, zsírokat, energiát, vitaminokat és ásványi anyagokat igényelnek táplálékukban alapvető élettani funkcióik (növekedés, szaporodás stb.) normális működésének fenntartásához. A tápokkal szemben alapvető minőségi feltételek: a hozzáférhető

tápanyagtartalom, az emészthetőség, a peszticidektől és egyéb mérgeanyagoktól való mentesség. Az emészthető és a metabolizálható energia kedvező arányban kiváló növekedést tesz lehetővé, nagy mennyiségű zsír felhalmozódását mellőzve. Általában a halak növekedése egyenesen arányos a táp fehérjetartalmával, a haltest szárazanyag tartalmának kb. 70%-át adják a fehérjék, ezért ezek a haltápok

legfontosabb vegyületei, egyben a haltáp minőségi mutatói. Ugyanakkor a fehérje a legköltségesebb haltáp összetevő (Wang et al., 2021).

A fehérjetartalom optimális szintje függ a fajtól, az életkortól, a vízhőmérséklettől, a napi adag nagyságától, az etetési gyakoriságtól, a fehérje minőségétől, vagyis az aminosav összetételétől és a nem-fehérje eredetű energia mennyiségétől (Hancz, 2011).

A kereskedelmi forgalomban kapható vízi állatoknak szánt takarmány összetétele a fő fehérjeforrás szempontjából hagyományosan a **halliszt**tól függ. A halliszt elérhetőségének csökkenése, és a költségének a növekedése, az alternatív választási lehetőségek keresését ösztönzi. Ugyanakkor a halliszt alkalmazása mint fő fehérjeforrás nem környezetbarát (Toviho & Bársony, 2020).

Az **állati eredetű fehérjék** -amelyek többnyire az élelmiszeripar melléktermékei (pl. baromfiliszt, hús- és csontliszt, toll-liszt) - alkalmasak a halliszt kiváltására. Ezek a fehérjeforrások azonban költségesek és korlátozottan hozzáférhetőek.

A **növényi eredetű fehérjék**, mint a szójabab, csillagfűrt, repce, borsó, kukoricaglutén, búzaglutén és gyapotmag lisztjei jelentős figyelmet kaptak halliszt-helyettesítőként ezek könnyebb hozzáférhetősége, alacsony áraik és magas fehérjetartalmuk miatt.

A növényi alapú takarmányokban a fehérje mennyiség és az esszenciális aminosav egyensúly általában elégtelen, anti-nutritív komponenseket tartalmaznak, és a hallisztre jellemző bizonyos összetevők (pl. taurin és hidroxiprolin) hiányoznak belőlük, ami rossz növekedési teljesítménnyel, bélgyulladással és a halhús ízének romlásával kapcsolatos potenciális gondokat okozhat (Toviho & Bársony, 2020). Mindezek korlátozzák a halliszt helyettesítőként való alkalmazásukat.

A haltápban lévő állati és növényi eredetű fehérjeforrások különböző aminosavakat eltérő összetételben tartalmaznak. Ugyanakkor, minden fehérje emészthetősége eltérő, és a halak igénye is különbözik. Mindemellett a megfelelő haltáp-összetétel iránti növekvő igények, a dráguló és nehezen hozzáférhető takarmánytápok miatt egyre inkább szükség van új takarmányalapanyagok keresésére, innovatív tápreceptúrák kidolgozására.

A haltápban lévő növényi és állati alapú fehérjeforrások alternatív fehérjeforrásokkal (pl. rovarliszt; baktériumokból, élesztőgombákból, mikroalgákból és ehető gombákból készült egysejtű fehérjék) történő felváltása vagy kiegészítése erre megoldás lehetne (Wang et al., 2021).

A rovarok fenntartható tápanyagforrásként történő alkalmazásával kapcsolatos érdeklődés az egész világon különösen nagy figyelmet kapott (Toviho &

Bársony, 2020).

A megfelelő fehérje forrás arány (rovar fehérje és esetleg növényi fehérje és halliszt) alkalmazása a tápban, lehet legalább olyan hatékony mint a halliszt kizárólagos alkalmazása, és ugyanakkor így gazdaságosabb, fenntarthatóbb, könnyebb és folyamatos lehetne a hozzáférés a táphoz; ezenkívül kedvezőbbé teheti a halak emésztési folyamatát, az anyagcserefolyamatait, a takarmányhasznosítást, ami pozitív hatással lehet a halak növekedésére, és javíthatja a hal minőségét (jobb érzékszervi és technológiai minőség) is (Wood et al., 2004; Haug et al., 2008, Wulff et al., 2012). A rovarok feldolgozása (pl. zsirtalanítás, kitin eltávolítás, technológiai kezelés) szintén növelheti a táp minőségét (íz, emészthetőség), de mérlegelni kell a költség és a táp biológiai értékét növelő hatékonyság közötti összefüggést (Henry et al., 2015).

***In vitro* hal emésztés modellezése - a haltakarmányok minősítése céljából**

A különböző takarmánykészítmények emészthetőségének a hal növekedésére és minőségére gyakorolt hatását rendszerint *in vivo* halállat kísérletekkel vizsgálják, de az ilyen jellegű vizsgálatok időigényesek és drágák, éppen ezért gyors *in vitro* emésztési modellek felállítására van szükség a hal emésztés szimulálására.

Ezek a modellek az új haltenyésztési módok kidolgozása során választ adnak arra, hogy a takarmány vajon milyen élettani hatással van a halra, és hogy milyen módon igazíthatjuk ezt az információt a növekedéshez és a hal szöveti fehérjeinek minőségéhez. Amikor a takarmány belép a gyomor-bélrendszerbe, a pyloric ceca a gyomor után az első szerv, amely érintkezésbe kerül a takarmánnyal. Ha a takarmány megváltozik, a pyloric ceca-nak alkalmazkodnia kell az új takarmánykomponensek kezeléséhez. Az ilyen adaptációk közé tartoznak olyan morfológiai változások, mint például a bélgyulladás, vagy a kiválasztott enzim aktivitásoknak és szintjeiknek változásai (Wulff et al., 2012). A halak emésztőrendszerének élettani vonásai tehát képesek bizonyos mértékig alkalmazkodni a tápanyag igény és az étrend változásaihoz (Kumar et al., 2019).

A halak emésztőrendszere

Az *in vitro* hal emésztési modellek kidolgozása előtt meg kell ismernünk a halak emésztésének élettani folyamatait, az emésztőrendszerüket. A halfajok száma meghaladja a 20000-et, az emésztőrendszerük anatómiája eltérő.

A fejbél a szájat és a garatot foglalja magában. Az előbél részei a nyelőcső és a gyomor (Olsson, 2011). Az emésztés helyszíne a halak esetében a nyelőcső hátulsó része, a gyomor (a különböző halfajok gyomrának mérete és alakja jelentős mértékben eltér; vannak halfajok ahol pedig nincs gyomor), a középbél (~vékonybél, 3 része: proximális, közép és disztális bél, nincs olyan egyértelmű makroszkopikus jelleg, mely elválasztaná e hármat egymástól. A felosztás sokszor tetszőleges, mindegyik körülbelül egyharmadnak felel meg.) és az utóbél (rectum, ~vastagbélnek, végbélnek feleltethető meg), valamint a pylorus-függelékek (pyloric ceca). A pylorus-függelékek zsákszerű képződmények, a felszívó felületet növelik meg, ugyanakkor az áthaladási időt is meghosszabbítják. A gyomor végén találhatóak, a proximális bélnek a kiterjesztései - epiteliális rétegük nem különbözik a bél többi részétől - (nem minden fajnál vannak jelen; valódi csontoshalaknál vannak: változó a méretük és számuk; akár 1000 függelék is jelen lehet). Ezek a zsákszerű képződmények béltartalommal telnek meg (tárolás), folytatják a gyomorban megkezdett emésztést, az emésztményből felszabaduló tápanyagokat felszívják, valamint az ürülést a bél irányába szabályozzák (Rust, 2002).

A pylorus-függelékeket gyakran pankreatikus szövet és a hasnyálat valamint az epét szállító vezetékek veszik körbe (Olsson, 2011; Rust, 2002). A pylorust követően nyílik az epevezeték az emésztőrendszerbe (Olsson, 2011).

Az utóbelet gyakran egy szelep (ileorectalis) választja el a bél többi részétől, és a mucosa megjelenése is eltérő ezen rész esetén. A bél általában az anális záróizmossal fejeződik be.

Azoknál a halfajoknál, melyek esetén hiányzik a gyomor (agasztrikus fajok), a nyelőcső egyenesen a vékonybélbe nyílik (Olsson, 2011). A gyomor nélküli fajok esetén a tárolásban szerepet játszó bélgumó („intestinal bulb”) is megjelenhet (Rust, 2002).

A bélgumónak is az élelem tárolásában van szerepe, akár csak a gyomornak, de funkcionális és hisztológiai tulajdonságait tekintve inkább egy nagy pilórus-függelékre hasonlít. A bélgumó több szempontból is különbözik a valódi gyomortól: a fala vastagabb, nem választ ki savat, a végén nincs pylorus. A gyomor nélküli fajok (melyeknek nincs bélgumója) jellegzetesebb vonása az epevezeték belépésének a helye, ami a proximális bélben található, közvetlenül a nyelőcsövet követően. Bélgumó megjelenése esetén az epevezeték nyílása lehet a bélgumó előtt, vagy akár közvetlenül a bélgumóban.

Néhány halfajnak zúzógyomra van. A halak zúzógyomra elhelyezkedhet az igazi gyomrot követően, de az is lehetséges, hogy nem társul valódi gyomorhoz. Az a szerepe, hogy az emésztményt kicsi élelmiszer

részecskékre őrölje.

Bizonyos fajok belének egy része (pl. cápák, ráják, tüdőshalak, porcos- vértés halak (pl. tokfélék)) spirális redőket tartalmaz, ami megkönnyíti a különböző bélrégiók megkülönböztetését (Olsson, 2011). A spirális redők tulajdonképpen a mucosa (és submucosa) hajtogatódásai, melyek a bél mentén, spirális mintázatban haladnak végig, megnövelve az epiteliális (felszívó) felületet, anélkül, hogy a bél hosszára hatással lennének. A spirális redők ugyanakkor az emésztmény haladását is lelassítják (Olsson, 2011).

Néhány halfaj (pl. cápák, ráják, tüdőshalak) esetén azonban az utóbél lezárása a kloakának nevezett üregben végződik, amibe az emésztő-, húgy- és ivarvezetékek nyílnak (Olsson, 2011).

Járulékos emésztőszervek a hasnyálmirigy, az epehólyag és a máj (Olsson, 2011; Rust, 2002). A halak hasnyálmirigye képezhet egy jól meghatározott szervet (pl. csuka, cápák, tokhal, angolna) vagy lehet diffúz (a leggyakoribb eset). Ez utóbbi esetben a pankreatikus csomók lehetnek szétszórva a zsírszövetben, a mesenteriumban, a májban, az epevezeték, az epehólyag, a pylorus-függelékek és a bél körül, valamint más helyeken. Amikor a hasnyálmirigy egy egyedi szerv formájában van jelen, képezhet egy vagy két szervet. Az elhelyezkedése lehet a lép közelében, a portális véna mentén, a máj előtt, a bél mentén vagy más, a bélhez közeli területeken. A hasnyálmirigy vezetékai lehetnek közösek az epehólyagból induló vezetékkel (mely esetben közös epevezetékéről beszélünk) és/vagy lehetnek különálló vezetékek. Az exokrin pankreatikus szövet egyedi szigeteihez számos kicsi vezeték társulhat, melyek a teljes bél hosszában vezetnek a lumenbe (Rust, 2002).

A legtöbb halnak (de nem az összesnek) van epehólyagja. A halak mája lehet egyetlen szerv, de rendeződhet két vagy több különálló lebenybe is.

A tápanyagok emésztését emésztőenzimek segítik az adott bélszakaszoknak megfelelő pH tartományban (1. táblázat). Az emésztőenzimeknek több izoformája is lehet, eltérő aktivitással, pH optimummal, vagy szubsztrát-specifitással; amelyek akár a különböző környezeti tényezőkhöz való adaptációknak köszönhetőek. A gyomorban a pH 2-5; míg a bélben, a pylorus után 7-8. A gyomorban, a hasnyálmirigyben termelődnek az emésztőenzimek, melyeket az 1. táblázatban foglaltunk össze (Olsson, 2011; Rust, 2002). A gyomornélküli halak esetében a bélgumó - a gyomorral ellentétben - nem tartalmaz savat vagy pepszinogént kiválasztó epiteliális sejteket, a fehérjék lebontásáért elsősorban a tripszin felelős, mely a pilórus-függelékekben és a bél lumenében fejti ki hatását (Olsson, 2011).

1. táblázat A halak néhány emésztőenzimének általános tulajdonságai (Rust, 2002)

Enzim	Szintézis helye	Aktivitás helye	pH optimum	Szubsztrát/ működés	Termék(ek)
Pepszin	Gyomor „oxynticopeptic” sejtei (savat is termelnek)	Gyomor lumen	Savas	Nem specifikus endoproteáz, melyet a savas közeg aktivál	Peptidek
Tripszin	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelékek lumene	Semleges	Az enterokináz által aktivált endoproteáz. A bázisos oldallánccal rendelkező aminosavak melletti peptid kötések hidrolizisét katalizálja	Peptidek
Kimotripszin	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelékek lumene	Semleges	A tripszin által aktivált endoproteáz. A hidrofób oldallánccal rendelkező aminosavak melletti peptid kötések hidrolizisét katalizálja	Peptidek
Elasztáz	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelékek lumene	Semleges	A tripszin által aktivált endoproteáz. A glicin és alanin melletti peptid kötések hidrolizisét katalizálja	Peptidek
Kollagenáz	Exokrin hasnyálmirigy	Bél-lumen, Pilórusz-függelékek lumene	Semleges	A tripszin által aktivált endoproteáz, mely elsősorban a kollagént hasítja	Peptidek
Aminopeptidáz (savas és semleges)	Gyomor, Exokrin hasnyálmirigy, Bélműsejtek (enterocyták)	Gyomor lumen; Bél és a pilórusz-függelékek lumene és kefeszegélye	Savas/ semleges	Exopeptidáz, a peptid lánc N-terminális végéről hasítja az aminosavat	Kis peptidek és szabad aminosavak
Leucin aminopeptidáz (példa semleges aminopeptidázra)	Bélműsejt	Membránal társulva, a kefeszegélyben	Semleges	Exopeptidáz, a peptid lánc N-terminális végéről hasítja a leucint	Kisebb peptidek és szabad leucin
Karboxipeptidáz	Exokrin hasnyálmirigy és bélműsejtek	A bél és a pilórusz-függelékek lumene és kefeszegélye	Semleges	Exopeptidáz, a peptid lánc C-terminális végéről hasítja az aminosavat	Kisebb peptidek és szabad aminosavak
Nem-pankreatikus lipáz vagy gyomor lipáz	A gyomor nyálkahártya (mucosa) gyomormirigyvei	Gyomor lumene	Savas	Elsősorban gyomor eredetű triacilglicerol lipáz	Lásd a triacilglicerol lipázt és foszfolipázt
Pankreatikus lipáz	Exokrin hasnyálmirigy	A bél és a pilórusz-függelékek lumene	Semleges	Több, pankreatikus eredetű lipáz tartozik ide, gyakran az epe sók aktiválják	Lásd a triacilglicerol lipázt és foszfolipázt
Triacilglicerol lipáz	Gyomor, exokrin hasnyálmirigy, bélműsejtek	Gyomor lumen, a bél és a pilórusz-függelékek lumene és kefeszegélye	Savas/ semleges	A triacilglicerol 1 és 3 pozíciójában található zsírsavakat hasítja, néha a kolipázzal együtt	2-monogliceridek és szabad zsírsavak
Monoglicerid lipáz	Bélműsejt	A bél és a pilórusz-függelékek kefeszegélye	Semleges	A 2-monogliceridekről hasítja a zsírsavat	Zsírsavak és glicerol
Foszfolipáz	Exokrin hasnyálmirigy	A bél és a pilórusz-függelékek lumene	Semleges	A foszfolipidekről hasítja a zsírsavakat	Zsírsavak és lizofoszfolipidek
Viasz-észter-hidroláz	Exokrin hasnyálmirigy	A bél és a pilórusz-függelékek lumene	Semleges	A viasz észtereket hidrolizálja	Zsíralkoholok
Amiláz	Bélműsejt, bélfóra, hasnyálmirigy	Bél és bélfóra	Semleges	A keményítőt hidrolizálja	Poliszacharidok és monoszacharidok (cukrok)
Celluláz	Bél mikroflóra, az endogén termelést nem igazolták	Bél lumen	Semleges	A cellulózt hidrolizálja	Glükóz
Kitináz	Gyomor és exokrin hasnyálmirigy	Gyomor lumene, bél és pilórusz-függelékek	Savas vagy semleges	Az N-acetilglükózamin (kitint) hidrolizálja	Poliszacharidok és monoszacharidok (cukrok)

Halak osztályozása táplálkozási szokásaik alapján

A halak eltérő élőhelyeken élnek és nagyon különböző tápanyagforrásokat igényelnek, mindemellett a táplálkozásuk gyakorisága is eltérő (Olsson, 2011). A halak táplálkozási szokásaik alapján lehetnek detritusz fogyasztók, növényevők, mindenevők és húsevők.

Mindegyik kategórián belül, további osztályozás lehetséges: a halak lehetnek eurifágok (az elfogyasztott élelem jellege nagyon változatos), sztenofágok (a táplálék változatossága korlátozott) vagy monofágok (csak egy fajta táplálékot fogyasztanak). Az akvakultúrában fontos halak többsége vagy eurifág húsevő/ragadozó (pl. lazac, sügér, keszeg, laposhal, rombuszhal, lepényhal), eurifág mindenevő (pl. pettyes harcsa, tilápia) vagy eurifág növényevő (pl. némelyik pontyféle) (Rust, 2002) (**1. ábra**).

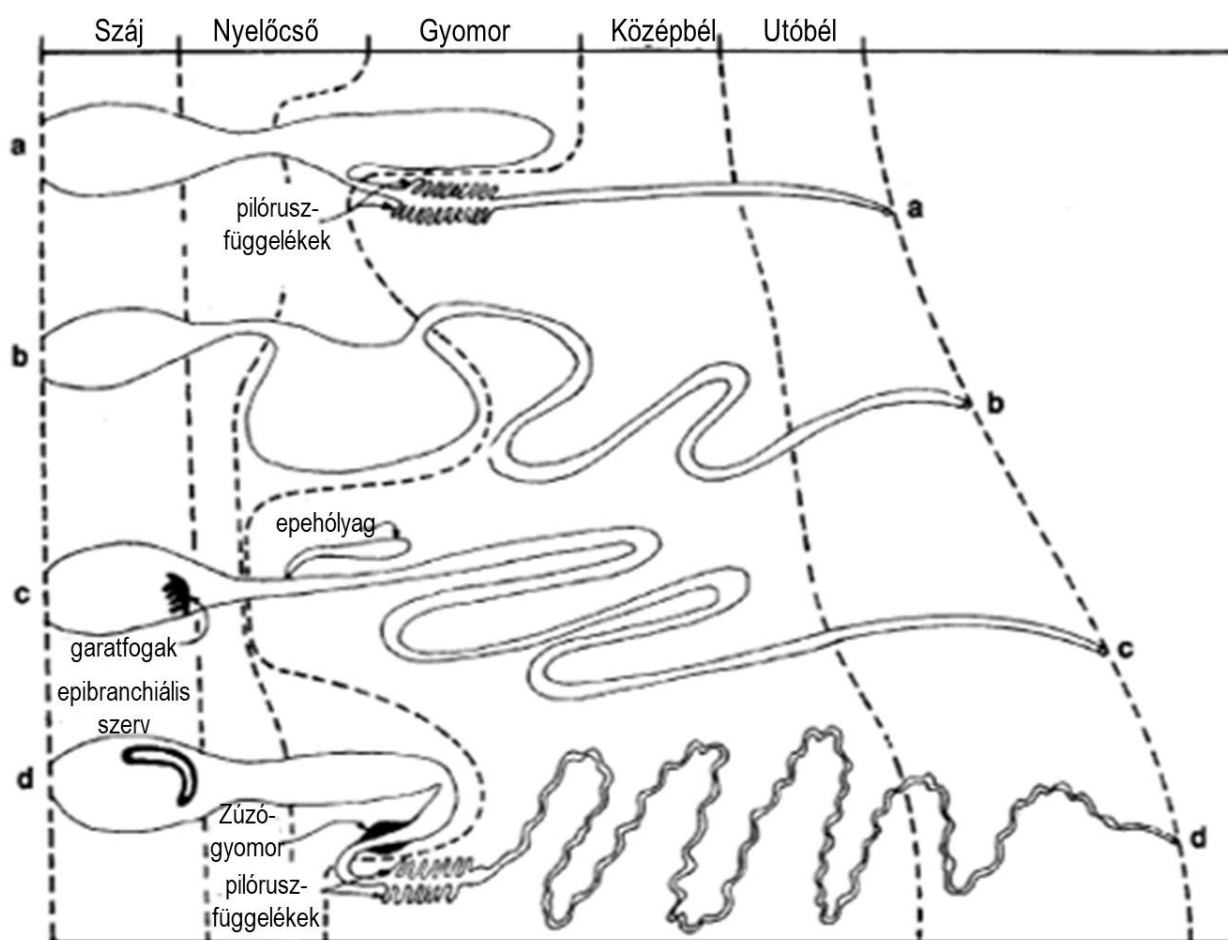
A halak táplálékforrása, valamint az emésztőrendszerük megjelenése és szerepe között közvetlen összefüggés van (**1. ábra**). A húsevőknek a bele rövid, a mindenevőké közepes hosszúságú, míg a növényevőké hosszú (a testhosszhoz viszonyítva). A növényi étrend (növényevő halak) nehezebben

emészthető, és ezért szükség lehet a hosszabb bélre (a testhosszhoz viszonyítva), hogy az emésztési idő növekedhessen. Ezen állításokat azonban óvatosan lehet általánosítani, hisz számos kivétel létezik. A növényevők és húsevők bél hosszára vonatkozó eltérések az egyedfejlődés során is megfigyelhetők, amikor az adott faj étrendje megváltozik (kezdetben húsevő, majd később inkább mindenevő táplálkozásra vált). Ez általában a relatív bélhossz változásával társítható. Azonban, több eltérő, valószínűleg fontosabb módja is létezik a bél felszínének a megnövelésére (Olsson, 2011). Ha a bél felszívó felszínének a területét a hal térfogatához viszonyítva vizsgáljuk, a különbségek kisebb mértékben fejeződnek ki, mivel így már figyelembe vesszük a függelékeket, az epiteliális hajtogatódás mértékét, és az olyan specializált képződmények jelenlétét, mint a spirális redő (Rust, 2002).

Az algákat, korallt, puhatestűeket, detrituszt vagy planktonot fogyasztó halak speciális eseteket képviselnek, melyek gyakran nem követik a húsevő, mindenevő vagy növényevő osztályozás esetén megfigyelhető jellegeket. Például a zooplankton (vagy fitoplankton) fogyasztók és a növényevők is rendelkezhetnek zúzógyomorral. Bizonyos fajoknak

gyomruk és zúzógyomruk is van, másoknak csak egyik a kettő közül. Azon halak esetén, melyek sok kalcium karbonátot tartalmazó gerincteleneket (pl. korallok, puhatestűek) fogyasztanak, hiányozhat a savas (gasztrikus) emésztés, annak ellenére, hogy húsevők. Néhány tilápia esetén, melyek vadon élő körülmények között detrituszt, algát és baktériumokat fogyasztanak, nagyon alacsony a gyomornedv pH-ja (<1,5); ami az alga-sejtfalak lízisét elősegítő adaptáció lehet. Más növényevő fajokban is bizonyították az alacsony gyomor pH-t (Rust, 2002).

víz hőmérséklet változása szintén befolyásolhatja az emésztőrendszer morfológiáját. Pl. a rövid távon hideghez hozzászoktatott pettyes harcsa (*Ictalurus punctatus*) esetén a bél hosszának és súlyának a növekedését figyelték meg. A ponty esetén a bél hossza nem változott, de a nyálkahártya felszíni területe megnövekedett. A bél paraméterek növekedése esetleg ellensúlyozhatja a kevésbé hatékony felvételt alacsonyabb hőmérsékleten. Az évszakokra jellemző változások több tényező kombinációjától függenek, beleértve a hőmérsékletet és a táplálék elérhetőségét,



1. ábra: A tipikus hal emésztőrendszer tagoltság vázlatos ábrázolása. a) eurifág ragadozó y alakú gyomorral (pl. lazac, pisztráng), b) eurifág mindenevő (főleg állati eredetű élelmet fogyaszt) kidudorodó (zsák-alakú) gyomorral (pl. harcsa, tilápia), c) eurifág mindenevő (főleg növényeket fogyaszt); nincs gyomor (ponty és aranyhal), d) sztenofág planktonevő; lemezes gyomor izmos zúzógyomorral (Rust, 2002).

A halak emésztését befolyásoló tényezők

A halak *in vivo* emésztését számos tényező befolyásolja: pl. a halak nagy diverzitása, a különböző környezeti tényezőkhez való alkalmazkodás, a különböző táplálkozási formákhoz idomult faj-specifikus gasztrointesztinális traktus morfológiája (Olsson, 2011). Az étrenden kívül a fejlődési stádiumnak és az egészségi állapotnak is fontos szerepe van. A

és az idényjellegű hormon szintnek is fontos szerepe lehet. Különböző betegségek is okozhatnak morfológiai zavarokat a gasztrointesztinális traktusban (Olsson, 2011). A víz savasodása (8- aspH- ról 7,5- rő) és a tenyésztési hőmérséklet (18 °C-tól 2 °C-ig) a bél proteáz aktivitást akár 36- 5%- kal is lecsökkentheti. A víz sótartalma és oxigén szintje szintén szignifikáns módon befolyásolhatja a lúgos proteáz aktivitást. Kimutatták, hogy a tenyésztés során alkalmazott táp befolyásolja a proteáz aktivitást (Wang et al., 2021).

Mindezen felsoroltak bizonyítják, hogy a hal-

specifikus *in vitro* emésztési modellek felállítása nem egyszerű feladat, nagy kihívás a kutatók számára.

In vitro hal emésztési modell kidolgozása

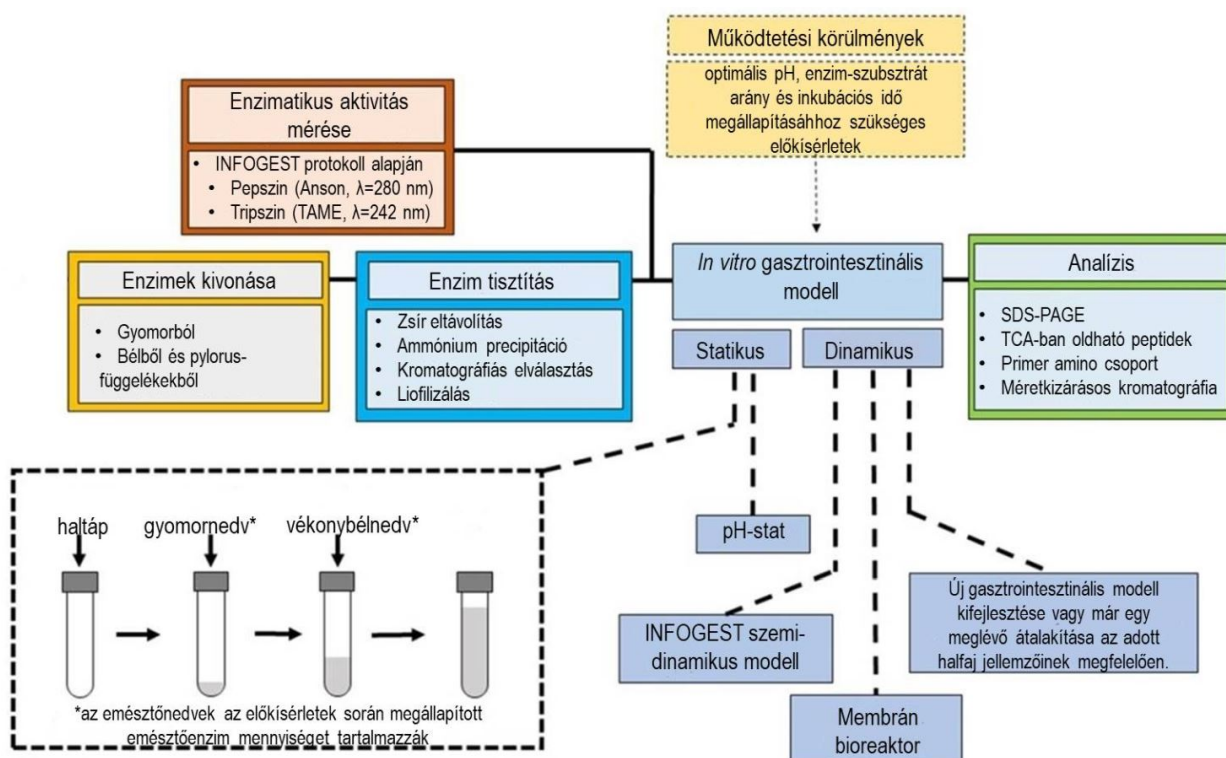
A halak esetében nincs standardizált, egységes protokoll az emésztési modellre vonatkozóan, ami a halak diverzitásából is ered. Azonban halspecifikusan, az adott halfajta emésztésének élettani sajátosságainak ismeretében lehetőség adódhat haltakarmányok emészthetőségének *in vitro* vizsgálatára. Ehhez ismerni kell tehát az adott halfajta emésztőrendszerét, a haltartási hőmérséklet tartományt (amelyben később meghatározható *in vitro* az emésztési hőmérséklet optimuma), az emésztési idő hosszát, az emésztőenzimek átlagos aktivitását, amikor a táp jelen van a gasztrointesztinális traktusban. A rendszer felállításánál az elején többnyire irodalmi adatokra tudunk támaszkodni (pl. bélrendszer pH-ja, emésztési idő), majd egy-egy paraméter beállításával, majd változtatásával újabb ismeretekhez juthatunk (pl. különböző hőmérsékleten tartott halak esetében a hőmérséklet hatása a bélnedvek enzimaktivására).

Az *in vitro* vizsgálatokhoz emésztőenzimekre van szükség, és az emésztési folyamatokat imitáló bélrendszeri fiziológias körülmények biztosítására. A legtöbb vizsgálat mely halak *in vitro* emésztését modellezte, az emésztőrendszer különböző részeiből kinyert enzim kivonatokat használt (Moyano et al., 2015).

Bizonyos esetekben, a teljes szervezetet vagy a benne lévő emésztőanyagot használták fel enzim forrás kinyerésére (Moyano et al., 2015). Yasumaru & Lemos (2014) foglalkoztak haltakarmányokkal etetett halak *in vitro* emésztésével, amelynél az emésztés modellezésére fajspecifikus - gyomorból, pylorus-függelékéből és a bélből kinyert - emésztési enzimkivonatokat használtak fel.

Azonban több tanulmány emlős (pl. sertés eredetű) vagy baktérium eredetű kereskedelmi forgalomban kapható enzimet használt. A kereskedelmi forgalomban kapható tisztított enzimekkel, az *in vitro* modell alkalmazása révén azonban csökkenthetjük a kísérleti célra felhasznált halak számát, és ez így egy ellenőrzött, reprodukálható (nincsenek inter-individuális különbségek) módja lehetne a haltápok emészthetőségének és minőségének jellemzésére előzetes tájékozódásként.

Számos kutatócsoport hasonlította össze a halspecifikus forrásból származó és a kereskedelmi forgalomban kapható emlős enzimekkel végzett *in vitro* emésztések eredményeit (Moyano et al., 2015). Bebizonyították, hogy a hal emésztőenzimek, különösen a proteázok, a többi gerinces emésztőenzimtól eltérő tulajdonságokkal rendelkeznek, főleg a szubsztrátokkal szembeni affinitásra, a reakciósebességre, a hőmérséklet optimumra és az inhibitorokkal szembeni érzékenységre vonatkozóan. Az emlős emésztőenzimeket sokkal nagyobb mértékben gátolják a



2. ábra: Hal *in vitro* emésztési modellek kidolgozási lehetőségei (Wang et al., 2021)

reakciótermékek, mint a hal emésztőenzimeket. Több szerző szerint ezért a faj- specifikus emésztőenzim kivonatokkal végrehajtott *in vitro* emészthetőség vizsgálat az *in vivo* körülmények reprezentatívabb modellezését, a biológiai elérhetőség sokkal pontosabb becslését teszi lehetővé (Wang et al., 2021).

Azonban a hal eredetű emésztőenzimek nem kaphatók kereskedelmi forgalomban, így magából a halból kell kivonni őket.

A **2. ábra** a hal *in vitro* emésztés kidolgozásának fontosabb lépéseit (enzim kivonás, -tisztítás, - aktivitásmérés reakciókörülmények (optimális pH, enzim-szubsztrát arány, inkubációs idő megállapítása)) és a lehetséges modell típusokat (pl. statikus/dinamikus) mutatja be. Ezen kívül összefoglalja azokat az *in vitro* emésztés végén alkalmazható analitikai (pl. SDS- PAGE kromatográfia) módszereket, melyeket sokan alkalmaznak fehérje emészthetőség felmérésére (Wang et al., 2021).

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 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; Brodtkorb et al., 2019), amelynek újdonsága, hogy az enzimes bontást a módszer meghatározott aktivitással, meghatározott szubsztrát-enzim aránnyal, meghatározott emésztési ideig, adott hőmérsékleten, stb. végzi.

Mivel a halak esetében nem született egységes konszenzus az emésztési modellre vonatkozóan, így ebből a humán emésztésre vonatkozó egyezményes protokollból kiindulva szintén elképzelhető a hal emésztési modellek felépítése. A legtöbb hal *in vitro* emésztési modell statikus. Az egyik legígéretesebb humán modell, amit hal emésztés modellezésére lehet átalakítani, a szemi-dinamikus INFOGEST modell, mely a gyomor szakasz bizonyos vonásait dinamikus módon modellezi, de megőrzi a Minekus et al. (2014) által kifejlesztett modell költség- és eszköz-hatékonyságát (Mulet-Cabero et al., 2020).

A **membrán bioreaktor** modell a folyamatos tápanyag felszívódást is modellezi, két kamrából áll. A belső reakció kamra és a külső kamra között egy dialízis membrán található.

A **pH-stat** módszerrel, mindamellett, hogy az emésztés pH-ját lehet szabályozni, a fehérje összetevő hidrolízisének a mértékét is lehet vizsgálni (Wang et al.,

2021).

A halfajtól és a fejlődési stádiumtól függően, az *in vitro* gasztrointesztinális modell állhat egy vagy két szakaszból. A gyomor nélküli halak esetén nincs szükség gasztrikus szakaszra, de ha gyomorral rendelkező fajt vizsgálunk, a bél szakaszt egy savas, gasztrikus fázis kell megelőzze. A hal lárváknak még nincs funkcionális gyomra, ezért ez esetben elég egyetlen szakasszal modellezni az emésztést, a teljes lárvából kivont enzimekkel (Wang et al., 2021).

A halak által kiválasztott emésztőenzim mennyisége és aktivitása jelentős mértékben függ a környezeti tényezőktől és a tápláléktól, éppen ezért is nehéz a hal emésztés modellezése. Egyelőre idáig az enzimszubsztrát arány meghatározására nem született egyértelmű konszenzus (Moyano et al., 2015).

Yasumaru & Lemos (2014) a haltakarmányokkal etetett halak *in vitro* emésztése után tudta alkalmazni a fehérje-hidrolízisfok *in vitro* pH- stat meghatározását a takarmányfehérjék minőségének felmérésére és a fehérje-emészthetőség jóslására.

Úgy gondoljuk, hogy e módszer megfelelősége akkor tekinthető elfogadottnak, ha az *in vitro* hal emésztési modell egy előre megállapított paraméterekkel beállított rendszer, melyben pontosan ismerjük az alkalmazott enzimek aktivitását, így nagyobb reprodukálhatóságot és könnyebb, egyértelműbb kiértékelést biztosít(hat), mint az *in vivo* hal kísérletek.

Irodalomjegyzék

- Brodtkorb, A., Egger, L., Alvinger, M., Alvito, P., Assunção, R., ... & Recio, I. (2019): INFOGEST Static *In Vitro* Simulation of Gastrointestinal Food Digestion. *Nature Protocols*, 14(4):991-1014.
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Hancz, Cs. (2011): Haltakarmányozás.
<https://docplayer.hu/3203439-Haltakarmanyozas-hancz-csaba.html>,
 Hozzáférés időpontja: 2022.04.20.
- Haug, A., Rødbotten, R. Torunn Mydland, L. Christophersen, O.A. (2008): Increased broiler muscle carnosine and anserine following histidine supplementation of commercial broiler feed concentrate. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 58:71-77. <https://doi.org/10.1080/09064700802213545>
- Henry, M., Gasco, L., Piccolo, G. & Fountoulaki, E. (2015): Review on the use of insects in the diet of farmed fish: Past and future. *Animal Feed Science and Technology* 203:1-22.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001>
- Kumar, V., Wang, H., Lalgudi, R.S., Mcgraw, B., Cain, R., Rosentrater, K.A. (2019): Processed soybean meal as an alternative protein source for yellow perch

- (*Perca flavescens*) feed. Aquaculture Nutrition. 25:917– 931. <https://doi.org/10.1111/anu.12911>
- 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. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- 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. <https://doi.org/10.1111/raq.12065>
- Mulet-Cabero, A.I. , Egger, L., Portmann, R., Ménard, O., Marze, S., Minekus, M., Le Feunteun, S., Sarkar, A., Grundy, M.M., Carrière, F., Golding, M., Dupont, D., Recio, I., Brodkorb, A., Mackie, A. (2020): A standardised semi-dynamic *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. Food Funct, 11(2):1702–1720. <https://doi.org/10.1039/c9fo01293a>
- Olsson, C. (2011): The Gut. Gut anatomy and morphology. In: Encyclopedia of fish physiology. From genome to environment. (Szerk. Farrell, A.P., Stevens, E.D., Cech, J.J., Richard,s J.G.) Elsevier, London, Waltham, San Diego, pp. 1268–1275. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374553-8.00071-x>
- Rust, M.B. (2002): Nutritional Physiology. In: Fish Nutrition. (Szerk. Halver, J.E., Harry, R.W.) Academic Press, San Diego, London, pp. 367–417. <https://doi.org/10.1016/b978-012319652-1/50008-2>
- Toviho O.A., Bársony P. (2020): Insect based-protein: A new opportunity in animal nutrition. Acta Agraria Debreceniensis, 1:129–138. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/1/3744>
- 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 *in-vitro* digestion in fish. Bioengineered, 12(1):3040–3064. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1940769>
- Wulff, T., Petersen, J., Nørrelykke, M.R., Jessen, F., Nielsen, H.H. (2012): Proteome analysis of pyloric caeca: a methodology for fish feed development? Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(34):8457–64. <https://doi.org/10.1021/jf3016943>
- Wood, J.D., Richardson, R.I., Nute, G.R., Fisher, A.V., Campo, M.M., Kasapidou, E., Sheard, P.R., Enser, M. (2004): Effects of fatty acids on meat quality: a review. Meat Science 66:21–32. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(03\)00022-6](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(03)00022-6)
- Yasumaru, F., Lemos, D. (2014): Species specific *in vitro* protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rahycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 426–427:74–84. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.012>

Development of *in vitro* fish digestion models to promote the sustainability of fish breeding

Antal O.T., Nagy A., Takács, K.

Abstract

The amino acid and fatty acid composition of feed influences the sensory and technological properties of fish meat. The protein content of feed is very important, because animals, including fish, can build up the proteins in their body only from proteins. Fish have to gather several amino acids from the feed, because their organism is not able to synthesise them. Animal- and plant- based protein sources of feed contain the different amino acids in various proportions, and the digestibility of each protein is different. Good digestibility, sustainable and economical availability are required for fish feed. Researchers are trying to improve the biological value of feeds by involving new, alternative protein-rich feed materials (e.g. insect flour) in order to achieve proper growth of fish and improve fish quality.

The goal is to develop *in vitro* fish digestion models to verify the quality of fish feed, which will be a big challenge for researchers. The great diversity of fish species, the complexity of the digestive process, the variety of factors that influence digestion, and the implementation of the *in vivo* physiological conditions are extremely difficult tasks.

Keywords: fish feed, *in vitro* digestion model