

Optimalt fôr som gir fast filet

Turid Mørkøre, Erling Olaf Koppang, Marit Espe, Thomas Larsson, Eva Veiseth-Kent, Bendik F. Terjesen, Inger Beate Standal og Kjell-Arne Rørvik





Nofima er et næringsrettet forskningskonsern som sammen med akvakultur-, fiskeri- og matnæringen bygger kunnskap og løsninger som gir merverdi. Virksomheten er organisert i fire forretningsområder; Marin, Mat, Ingrediens og Marked, og har om lag 470 ansatte. Konsernet har hovedkontor i Tromsø og virksomhet i Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Averøy.

Hovedkontor Tromsø
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: nofima@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Forretningsområdet marin driver forskning, utvikling, nyskaping og kunnskapsoverføring for den nasjonale og internasjonale fiskeri- og havbruksnæringen. Kjerneområdene er avl og genetikk, fôr og ernæring, fiskehelse, effektiv og bærekraftig produksjon, prosess- og produktutvikling av sjømat samt marin bioprospektering.

Nofima Marin AS
Muninbakken 9–13
Postboks 6122
NO-9291 Tromsø
Tlf.: 77 62 90 00
Faks: 77 62 91 00
E-post: marin@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Rapport

ISBN: 978-82-7251-814-0 (trykt)
ISBN: 978-82-7251-815-7 (pdf)Rapportnr.:
37/2010Tilgjengelighet:
Åpen

<i>Tittel:</i> Optimalt fôr som gir fast filet	<i>Dato:</i> desember 2010
	<i>Antall sider og bilag:</i> 51
<i>Forfatter(e):</i> Turid Mørkøre, Erling Olaf Koppang, Marit Espe, Thomas Larsson, Eva Veiseth-Kent, Bendik F. Terjesen, Inger Beate Standal og Kjell-Arne Rørvik	<i>Prosjektnr.:</i> 20904
<i>Oppdragsgiver:</i> FHF – Fiskeri- og havbruksnærings forskningsfond	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 900338
<i>Tre stikkord:</i> Oppdrettslaks, Tekstur, Fôr	
<p>Formålet med studien var å undersøke om fôr tilsatt aminosyrene arginin eller glutamat kan forbedre teksturen av oppdrettslaks. I tillegg ønsket vi å undersøke om bløt filet kan knyttes til nedsatt leverfunksjon eller andre avvik, og om økt innhold av aminosyrene ville ha en positiv effekt på fiskens helsetilstand. Forsøket ble gjennomført ved Nofimas sjøanlegg på Averøy. Laksen fikk forsøksfôret fra mai 2009 (100 grams smolt) til den hadde passert 3 kilo året etter.</p> <p>Teksturanalyser i september og desember viste at laksen som fikk forsøksfôret hadde fastere tekstur enn laksen som fikk standardfôr. I mai hadde laksen som fikk glutamatfôr fasteste tekstur, men vi fant ikke forskjell i teksturen mellom kontroll- og arginingruppen. Det var ikke forskjell i tilvekst mellom fôrgruppene. Laksen som fikk standardfôr hadde størst lever med høyest fettinnhold, mens laksen som fikk argininfôret hadde den minste og magreste leveren. Fettinnholdet i muskel varierte lite mellom fôrgruppene.</p> <p>I september ble laksens evne til å takle trenging i forbindelse med slakting undersøkt. Resultatene viste at trenging fremskyndet rigorforløpet og pH-reduksjon ved lagring. Laksen som fikk glutamatfôr bevarte det høyeste pH-nivået i muskelen og filetteksturen var fastere for begge forsøksgruppene etter 48 timers lagring.</p> <p>Blodanalyser ved slakt viste at laksen som fikk forsøksfôr hadde mindre nedbryting av muskel, og vi registrerte mindre sammenvoksninger av organer. Laksen som fikk økt nivå av glutamat i fôret hadde minst vevsskader og bedre cellulær balanse (høyest bufferkapasitet, lavest oksidativt stress, friskere lever).</p> <p>Konklusjon</p> <ul style="list-style-type: none">• Fôret synes å spille en viktigere rolle for teksturen i laksefilet enn tidligere antatt• Det er mulig å forbedre teksturen i laksefilet ved å justere aminosyreprofilen i fôret• Aminosyrene glutamat og arginin ga helsemessige gevinster, og disse sammenfalt med fastere tekstur• Ekstra tilsetning av aminosyrene glutamat og arginin forbedret laksens evne til å takle stress i forbindelse med slakteprosessen• Gevinst ved tilskudd av aminosyrer kan variere gjennom året og optimalt nivå, varighet og alternative fôrtilsættelser bør vurderes. <p>Resultatene fra denne studien har bidratt med ny kunnskap som kan benyttes i arbeidet med å forbedre filetkvaliteten så vel som helsestatus hos oppdrettslaks. Funnene gir dessuten grunnlag for å se nærmere på etablerte behovstall for innsatsfaktorer i fôr til dagens oppdrettslaks.</p>	

Forord

Denne rapporten presenterer resultater fra en fôringsstudie som ble gjennomført med oppdrettslaks i forsøksmerder ved Nofimas sjøanlegg på Averøy. Laksen ble fôret med et kommersielt tørrfôr med ekstra tilsetning av aminosyren arginin eller glutamat. Forskningsgrupper med et tverrfaglig fokus kan være nødvendig for å bidra til løsninger på komplekse problemstillinger, og ønsket om tverrfaglighet i forskningen er eksplisitt uttrykt i overordnede forskningspolitiske signaler. Denne studien var et tverrfaglig samarbeidsprosjekt med forskere fra Nofima, Norges veterinærhøgskole, Nifes, Sintef samt Universitetet for miljø og biovitenskap (IHA). Prosjektet var finansiert av Fiskeri og havbruksnæringens forskningsfond (FHF). FoU koordinator Kristian Prytz hadde prosjektansvaret for FHF og forsker Turid Mørkøre ved Nofima var utførende prosjektleder.

Studien bygger videre på resultater som fremkom i FHF prosjektet "Bred kartlegging av faktorer som påvirker teksturegenskaper i oppdrettslaks ved multivariat tilnærming". Dette prosjektet viste bl.a. at laksen fikk fastere tekstur når fôret var tilsatt en kombinasjon av aminosyrene arginin og glutamat. Resultatene tydet dessuten på at tekturen hadde sammenheng med fiskens metabolske status og ernæringsbalanse. En av konklusjonene fra forsøket var derfor at vi bør ha en helhetlig tilnærming for å forstå årsakssammenhenger for teksturvariasjoner, der også sentrale organer som lever og hjerte bør fokuseres. I fôringsforsøket som rapporten presenteres i denne rapporten fikk fisken enten arginin eller glutamat i fôret for å undersøke hvilken av aminosyrene gir den positive tekstureffekten, evt om det er kombinasjonen av begge som er gunstig. Forskningstilnærmingen var tverrfaglig og helhetlig.

Partnerne i prosjektet og ansvarsområder var som følger: Nofima Marin (T.Mørkøre, T. Larsson, B.Terjesen, K-A.Rørvik): Prosjektansvar, oppdrett med registrering av vekst og fôrutnyttelse og slakteparametere. Dessuten makromorfologi av organer, tekstur pH, fettinnhold/-profil, filetfarge, genuuttrykk, databearbeiding. Nofima Mat (E.Veiseh-Kent; G.Enersen): muskelhistologi/morfologi. Norges veterinærhøgskole (E.O.Koppang): Histopatologi organer og muskel, blod-analyser. Nifes (M.Espe): frie aminosyrer i muskel og lever. Sintef (I.B. Standal, U.Erikson): metabolitter i muskel. UMB (Diane Bahuaud, Magny Thomassen) enzymaktivitet.

INNHold

1	Innledning	4
2	Bakgrunn	6
	2.1 Aminosyrer	6
	2.2 Arginin	8
	2.3 Glutamat	9
3	Gjennomføring og metode	13
	3.1 Forsøket	13
	3.2 Fôr og fôring	14
	3.3 Prøvetaking	16
	3.4 Analysemetoder	17
4	Resultater	24
	4.1 Tekstur	24
	4.2 Tilvekst	28
	4.3 Vektregistreringer og utbytte	29
	4.4 Organsammenvoksninger og melanin	31
	4.5 Fettinnhold, pH, farge og filetspalting	32
	4.6 Fettinnhold og fettsyreprofil i lever	34
	4.7 Histopatologiske undersøkelser	37
	4.8 Plasmaanalyser	39
	4.9 histologi av skjelettmuskel	41
	4.10 Frie aminosyrer i muskel og lever	42
	4.11 Metabolsk profil, HR NMR	47
	4.12 Genuttrykk	49
5	Oppsummering og konklusjon	50
6	Referanser	51

1. Innledning

Akvakultur er verdens raskest voksende matproduksjonssektor, med en global vekst på 7-8% i året. I Norge er Atlantisk laks den viktigste oppdrettsarten med et totalt slaktekvantum på ca. 900.000 tonn levende vekt i 2009. Dette tilsvarer 10 millioner laksemåltider per dag (iflg EFF) og 23,7 milliarder i eksportverdi. Totalt eksporteres det laksefisk fra Norge til 96 land. Frankrike er det største markedet mens veksten er størst i USA.

Fersk oppdrettslaks med hode var vårt desidert største eksportprodukt innenfor fisk i 2009 og representerte ca. 40% av den totale fiskeeksporten. Men markedet etterspør mer fileten, og fra 2008 til 2009 økte eksporten av fersk laksefilet med 1,1 milliarder kroner (70%). Det forventes en kraftig økning i bearbeidingsgraden av oppdrettslaks ved norske anlegg i de nærmeste årene. Laksenæringen har over mange år styrket sin markedsposisjon, med fokus på markedsutvikling og effektiv produksjon, rettet inn mot en global kundemasse. Men næringen kan møte nye utfordringer dersom fileten overtar for eksport av rundlaks. Bl.a. vil kvalitetsfeil som tidligere ble håndtert av kundene, opptre i egen bedrift. Eksempler er bløt fileten, filetspalting og avvikende utseende.

Fremtidig vekst og et positivt omdømme for norsk oppdrettsnæring fordrer at filetkvaliteten stabilt god. Blant filetegenskaper som norsk laksenæring har pekt ut som spesielt viktige å ha fokus på er utseende og fasthet. Det vil si at kvalitetsavvik som bør vektlegges å forbedre er:

- Bløt tekstur og filetspalting
- Blek og ujevn filetfarge
- Melaninflekker (mørke pigmenter i fiskekjøttet)

Filetkvaliteten påvirkes gjennom hele verdikjeden; fra avl/genetikk til fôr/fôring, slakting og foredling/tilberedning. Denne studien har hatt fokus på fôrets betydning for teksturen i laksefileten. Vi har også undersøkt faktorer som kan ha betydning for teksturen generelt, ved å sammenholde teksturregistreringer opp mot et bredt spekter av andre analyser som ble gjort av fisken: Makroskopisk og mikroskopisk morfologi, kjemisk sammensetning, helsemarkører, stoffskiftekomponenter, genuttrykk mm.

Omfattende forskning har vært gjennomført for å undersøke betydningen av å blande ulike oljekilder i fôret for filetkvaliteten. Dette er viktig dokumentasjon ettersom en bærekraftig utvikling av lakseoppdrett fordrer at det defineres og tas i bruk alternative oljekilder, slik som planteoljer. Forskningen har i mindre grad fokusert på betydningen av proteinkilder og spesifikke proteinkomponenter (aminosyrer). I denne studien har vi derfor hatt fokus på

aminosyrenes betydning. Aminosyrene som ble undersøkt var **glutamat og arginin**. Årsaken til at vi valgte å øke mengden av nettopp disse aminosyrene i fôret er at resultater fra humanforskningen og studier med andre dyr har vist at de stimulerer til muskelvekst og at de også kan ha helsefremmende effekter slik som å styrke immunforsvaret og fremme evnen til å takle ulike former for stress (se side 8-11 for nærmere beskrivelse).

Det overordnede formålet med studien var å forbedre filetkvalitet av norsk oppdrettslaks ved tilsetning av spesifikke komponenter i fôret.

Delmål i prosjektet var å

- I. Undersøke om aminosyrene glutamat og arginin gir fastere filet og redusert filetspalting.
- II. Undersøke årsakssammenhenger mellom bløt filet og fysiologiske, helsemessige, morfologiske og biokjemiske parametere, samt genuttrykk.

2. Bakgrunn

Kvaliteten på norsk oppdrettslaks er jevnt over god, men avvik forekommer. Det finnes ingen fullgod statistikk over utbredelsen av kvalitetsavvik slik som bløt filet, men forekomsten synes å vise sesongmessige og geografiske variasjoner. Laks med bløt tekstur gir økt svinn ved prosessering og får negativ mottakelse i markedet. Viktige forhold som påvirker teksturen er fysiologisk og helsemessig tilstand, veksthastighet og størrelse på fisken, årstid, fôringsregime, slaktemetode og prosessering og lagring/pakkemetode. Nye forskningsresultater fra et FHF finansiert forsøk viste at standard kommersielt fôr tilsatt en kombinasjon av aminosyrene arginin og glutamat forbedret teksturen. Slike føreffekter er ikke påvist tidligere og åpner for nye, fremtidige tiltak som kan forbedre kvaliteten. Resultatene fra omtalte forsøk tydet også på at bløt tekstur til en viss grad sammenfalt med metabolske avvik, slik som forstørret lever. Denne observasjonen tyder på at en bør ha en mer helhetlig tilnærming til fisken i arbeidet med å finne årsakssammenhenger for kvalitetsavvik, slik som bløt tekstur. Denne studien vil bygge videre på de tidligere oppnådde resultater og kompetansen i forskergruppen fra Nofima, Norges veterinærhøgskole, Nifes, Sintef og Universitetet for Miljø og Biovitenskap. Forsøksfødrene som ble benyttet var tilsatt økte mengder av henholdsvis arginin eller glutamat for å avdekke hvilken av aminosyrene som gir fastere tekstur, eller om det eventuelt er en kombinasjonen av begge som gir den gunstige tekstoneffekten. Videre ble det tatt en rekke ulike prøver av fisken for å undersøke om for eksempel metabolske, morfologiske eller helsemessige avvik var sammenfallende med forekomsten av bløt filet. Kunnskap om bakenforliggende årsaker til teksturvariasjoner, vil i større grad gi oppdretterne mulighet til å målrette produksjonsbetingelsene slik at filetkvalitet tilfredsstiller krav i ulike markeder for oppdrettslaks.

2.1 Aminosyrer

De senere årene har flere forsøk vært gjennomført for å undersøke betydningen av å blande alternative oljekilder i fôret. Blant annet er sammenheng mellom fettsyreprofil i fôret og sluttkvaliteten av laksefilet undersøkt i flere forsøk, mens langt færre studier har undersøkt betydningen av ulike proteinkilder og effekt av å tilsette ulike typer og nivå av aminosyrer for filetkvaliteten. I det følgende gjennomgås grunnleggende biokjemi for aminosyrer, med hovedvekt på arginin og glutamat. Kunnskapen om aminosyrer er vesentlig større for pattedyr enn fisk. I det følgende gjennomgås hovedmekanismene hos pattedyr, mens noen av forskjellene hos fisk blir påpekt.

Det blir hevdet at fisk må ha tilført 10 aminosyrer i fôret: treonin, valin, isoleucin, leucine, lysin, arginin, metionin, phenylalanin, tryptofan og histidin. Disse aminosyrene betegnes som essensielle ettersom fisken ikke er i stand til å syntetisere dem selv. Ulike animalske

proteinkilder er tilnærmet like når det gjelder aminosyresammensetning. Dette skyldes at muskelen som er depotorganet for protein består av acto-myosin. Det er de frie aminosyrene som kan benyttes til nysyntese av proteiner og disse utgjør ca 1% av de proteinbundne aminosyrene. I tillegg til den tradisjonelle funksjonen av aminosyrer som byggestener i proteiner, er det i den senere tid blitt mer klart at aminosyrer også er viktige metabolske regulatorer i metabolismen som forløpere til hormoner og andre signalstoffer. Aminosyrenes regulering av genekspressjon innebærer vanligvis overføring av informasjon kodet i et gen inn i enten RNA eller protein.

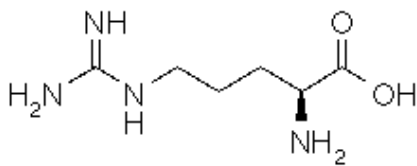
Når fiskemel benyttes som den dominerende proteinkilden er aminosyresammensetningen som regel tilstrekkelig til å dekke fiskens aminosyrebehov for essensielle aminosyrer, selv om det ennå foreligger visse uklarheter med hensyn til behov gjennom livssyklus hos oppdrettslaks som kan ha et annet vekstmønster enn villaks. Behovsstudiene for ulike aminosyrer er dessuten gjennomført for flere år tilbake da produksjonstiden fra yngel til slaktemoden laks var betydelig lenger enn i dag. I dag ser vi for eksempel vekstfaktorer opp i TGC=6 om høsten hos laks i Nord-Norge. Det kan tenkes at laksen har et noe endret behov for næringsstoffer for å opprettholde ("prioritere") en fast muskelstruktur i slike perioder med eksplosivartet vekst. Det målrettede avlsarbeidet har også medført at iboende egenskaper i fiskematerialet er noe endret. Tradisjonelt omfatter parameterne for å vurdere optimalt nivå av næringsstoffer i føret produksjonsegenskaper og helse; ikke kvalitetsegenskaper slik som muskelstruktur og tekstur.

I de senere år har en erstattet en økende andel av fiskemelet med planteproteiner som kan være ubalansert med hensyn på aminosyreprofil. Soya er for eksempel lav i metionin, mens gluten inneholder lite lysin. Denne ubalansen kan føre til at forholdet mellom ulike aminosyrer endres og dette kan påvirke både utnyttelsen, veksten og kvaliteten av den produserte fisken. Videre inneholder ulike proteinkilder varierende mengder av nitrogen som ikke er bundet til aminosyrer (ikke-aminosyre- nitrogen, NonAA-N), som f.eks taurine og anserin. Taurin fungerer blant annet som en osmolytt i muskelen og mangel kan bidra til endret osmolyttstatus og dermed ustabilitet i vevet. Anserin er et dipeptid som bufrer muskelen hos laksefisk og mangel kan endre pH statusen og dermed ha betydning for metabolismen i vevet

2.2 Arginin

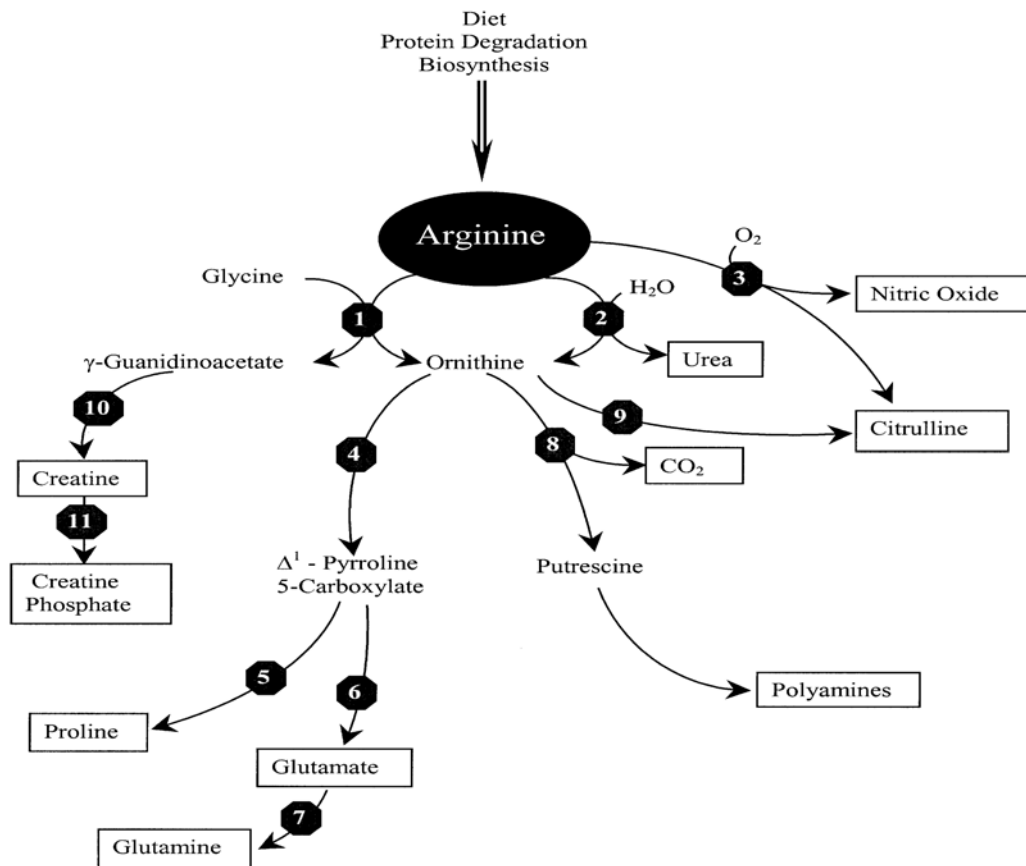
Arginin er klassifisert som en essensiell aminosyre for fugler, rovdyr og unge pattedyr, og en semi-essensiell eller betinget essensiell for voksne, spesielt ved sykdom og stress. Friske voksne personer produserer tilstrekkelig arginin gjennom ureasyklus. Fisk derimot har lav ureasyklus og syntetiserer for lite arginin til å drive metabolismen. Derfor er arginin en essensiell aminosyre for fisk. Arginin ble først undersøkt i krystallinsk form allerede i 1886 og tilstedeværelsen av arginin som en del av animalsk protein ble identifisert ni år senere. Arginin er en aminosyre med allsidige funksjoner og den er involvert i mange metabolske prosesser i dyreceller, som for eksempel syntese av proteiner, nitrogenoksid, urea, polyamin, proline, glutamat, kreatin og agmatin.

Arginin er identifisert som en potensiell immunomodulator og er nyttig ved alvorlig sepsis og stress (bl.a. vist seg å være gunstig ved postoperativ stress). Dette er knyttet til nedbrytning av arginin, hvor syntetiserte polyaminer kan føre til lymfocyt mitogenese samt produksjonen av nitrogenoksyd, som er viktig for blant annet immunsystemet, fordøyelseskanalen og koagulering av blodet. Foruten disse funksjonene, spiller arginin også en viktig rolle for bl.a. blodtrykket.



Figur 1. Kjemisk struktur av arginin

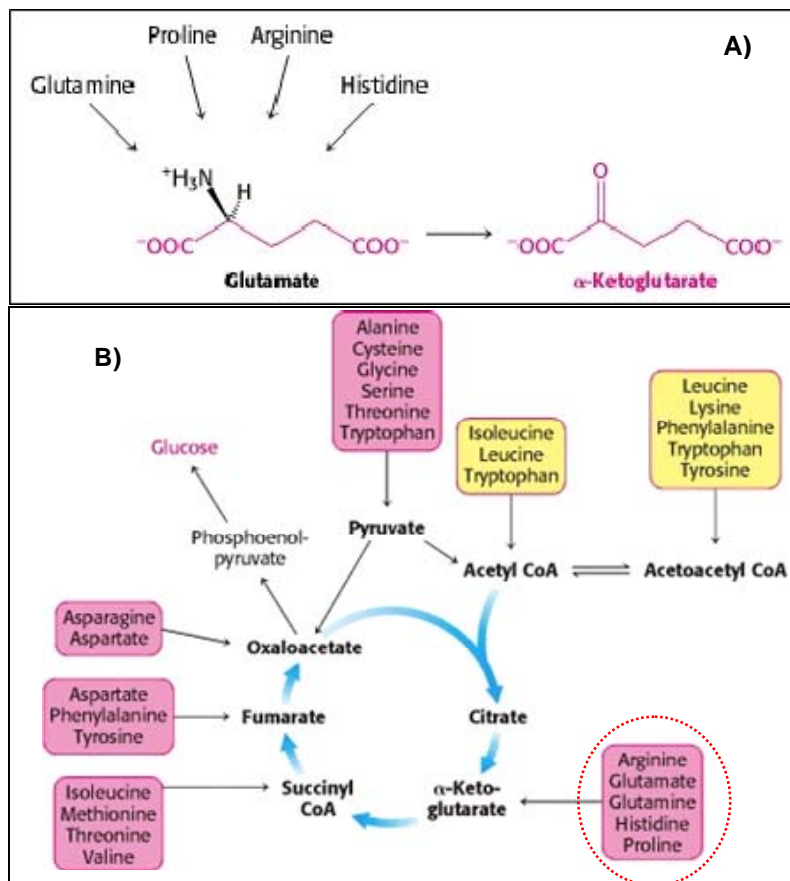
Det er kjent at visse aminosyrer stimulerer til muskelvekst i fisk, men mekanismene som er involvert er relativt ukjente. For arginin er det imidlertid kjent at omsetningen fører til produksjon av ornithine, forløperen for putrescine, som er viktig for syntesen av polyaminer som igjen er viktige for muskelvekst. Arginin aktiverer også utskillelse av glukagon, glukagon-lignende peptid-I og somatostatiner som er vekstregulerende molekyler. Omsetningen av arginin og produkter av betydning for muskelvekst er vist i Figur 2.



Figur 2. Metabolske produkter fra arginin som har betydning for muskelvekst og sannsynligvis også for filetkvalitet. Etter Mommsen (2001).

2.3 Glutamat

Glutamat sammen med glutamin, ornithine, histidin, arginin og proline danner "Glutamat familien" av aminosyrer. Disse aminosyrene betraktes som én gruppe siden deres omsetning har tilknytning til glutamat, men ellers er deres funksjoner ganske ulike (Se Figur 3). Glutamat regnes som en ikke-essensiell aminosyre, hvilket betyr at kroppen kan syntetisere tilstrekkelige mengder fra andre kilder. Glutamat er en proteinhovedbestanddel og er godt kjent som en smaksforsterker. Glutaminsyre ble første gang isolert av Ritthausen i 1866 ved hydrolyse av gluten fra hvete og derav navnet.



Glykogene aminosyrer: karbonskjelettet brytes ned til pyruvat, eller til en av 4 - eller 5-karbon mellomprodukter i Krebs syklus (TCA) som er forløpere for glykoneogenesen. Glykogene amino-syrer er viktige karbonkilder for glukoneogenesen. De kan også benyttes til energiproduksjon eller omdannes til glykogen eller fettsyrer for energilagring.

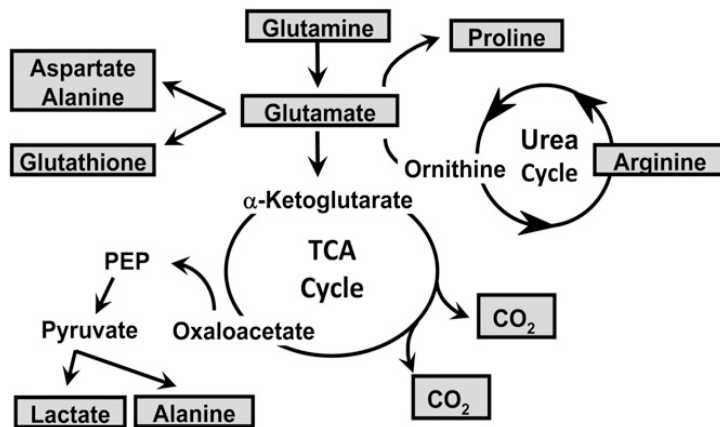
Ketogene aminosyrer: Deres karbon skjelett degraderes til acetyl-CoA eller acetoacetate. Acetyl CoA, og dens forløper acetoacetate, kan ikke gi netto produksjon av oxaloacetate, forløperen for glukoneogenese veien. Karbonskjeletter av ketogene aminosyrer kan kataboliseres for energi produksjon i Krebs syklus eller

Figur 3. Glutamat, kjemisk struktur og omsetning til α -ketoglutarat (A), og omsetning av ulike aminosyrer. Glykogene aminosyrer er farget lilla, ketogene i gult (B)

I likhet med andre aminosyrer, blir glutamat tatt opp i tynntarmen. Glutamat omdannes først til alanin i tarmcellene, deretter til glukose og til sist til laktat i leveren. Glutamat er viktig som bro mellom ureasyklus og Krebs syklus hos pattedyr, og den er forløper for flere andre aminosyrer som alanin, aspartat, ornithine, arginin, prolin og bioaktive molekyler som glutathion. Hos voksen beinfisk er ureasyklus aktiv kun hos et fåtall arter, og den foreligger som oftest i muskel, ikke i lever som hos pattedyr. I fiskeegg og -larver derimot, har en funnet aktiv ureasyklus hos alle arter som er undersøkt, men denne biokjemiske veien virker å slå av når larvene kommer et stykke ut i startføring (Terjesen, 2008). Av aminosyrer som dannes fra glutamat hos pattedyr kan spesielt nevnes prolin, som er viktig i syntesen kollagen og bindevev, mens glutathion inngår som bestanddel av enzymet glutathion-peroxidase som er en viktig antioksidant i kroppens forsvar mot skadelige frie radikaler som kan ødelegge celler og vev.

Glutamat har en rekke viktige funksjoner i levende celler. En av disse er knyttet til funksjonen av det sentrale nervesystemet. Nyere funn tyder på at glutamat er en viktig energikilde i tarmslimhinnen og er ansvarlig for vedlikehold og beskyttelse av slimlaget. Relativt få studier er utført av fisk, men glutamat har vist seg å ha betydning for steroidogenesen i regnbueørret. I

tillegg er glutamat helt sentral for kontroll på ammoniakk i plasma og vev hos fisk – glutamin dannes fra glutamat og ammoniakk ved økning i ammoniakk i f.eks. hjernevev. Videre har studier vist at glutamat er involvert i kontraksjon og depolarisering i krepsdyrmuskel



Figur 4. Stoffskifteprodukter fra glutamate. Etter Burrin & Stoll (2009).

Transaminering

Biosyntese av glutamat skjer ved overføring av en aminogruppe til α -ketoglutarat. Komponenten α -ketoglutarat spiller derved en vesentlig rolle i omsetningen av aminosyrer ved at den tar imot aminogruener fra andre aminosyrer. Glutamat som dannes på denne måten (Figur 4) kan bli oksidativt deaminert, eller bli brukt som en aminogruppe-donor i syntesen av ikke-essensielle aminosyrer. Overflytting av aminogruener fra et karbonskjellett til et annet katalyseres av en enzymfamilie som kalles aminotransferaser. Disse enzymene finnes i celler (cytosol og mitokondrier hos fisk) i hele kroppen, spesielt i lever, nyre, tarm og muskel. De to viktigste aminotransferasereaksjonene er katalysert av enzymene alanin aminotransferase (ALT) og aspartat aminotransferase (AST).

ALT: Aminogruppen på alanin flyttes til α -ketoglutarat og man får pyruvat og glutamat. Reaksjonen er reversibel, men under katabolisme går den i retning av glutamatsyntese.

AST: Glutamat er ikke et produkt her. Aminogruppen flyttes fra glutamat til oxaloacetat, og man får aspartat som brukes som nitrogenkilde i ureasyklus, dersom den er aktiv.

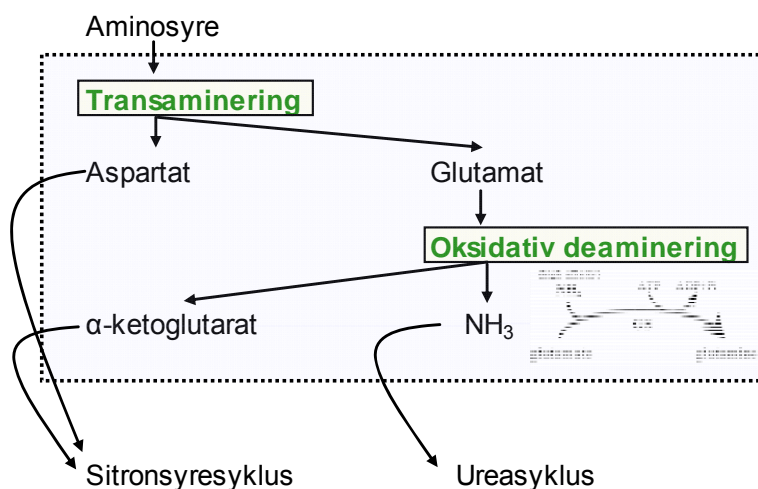
Et forhøyet nivå av aminotransferaser i plasma tyder som regel på skader i celler som er rike på enzymet. For eksempel er nivået av ALT og AST nesten alltid forhøyet ved leversykdom. I denne studien målte vi nivået av ALT for å avdekke eventuelle leverproblemer siden tidligere resultater har indikert metabolske forstyrrelser i leveren hos laks med bløt muskel.

Oksidativ deaminering

I motsetning til transaminering der aminogrupeer flyttes, fører oksidativ deaminering til frigivelse av aminogruppen som fritt ammoniakk. Reaksjonen katalyseres av glutamat dehydrogenase. Gjennom transaminering blir de fleste aminosyrene omgjort til glutamat. Glutamat skiller seg ut som den eneste aminosyren med oksidativ deaminering (reversibel). I denne reaksjonskjede kan aminogrupeer fra de fleste aminosyrer frigis som ammoniakk.

Aminosyrer som danner α -ketoglutarat

- Glutamin Dannes til glutamat og ammoniakk av enzymet glutaminase. Glutamat omdannes til α -ketoglutarat ved transaminering eller oksidativ deaminering av glutamat dehydrogenase
- Prolin Oksideres til glutamat, glutamat transamineres eller oksidativt deamineres til α -ketoglutarat.
- Arginin Spaltes av arginase for å danne ornitin (først og fremst i leveren, men også i muskel og andre ved hos fisk). Ornitin omdannes så til α -ketoglutarat
- Histidin Deamineres oksidativt av histidase til urocanic acid, som deretter danner N-formiminoglutamat (FIGlu). FIGlu donerer sin formiminogruppe til tetrahydrofolat, og man står igjen med glutamat.



Figur 5. Skjematisk illustrasjon som viser hhv transaminering og deaminering. Hos fisk med aktiv ureasyklus brukes glutamine, og ikke NH_3 som direkte substrat (egen).

3. Gjennomføring og metode

3.1 Forsøket

Fôringsforsøket ble gjennomført ved Nofimas sjøanlegg på Averøy i 125m³ merder i perioden september 2009 – mai 2010. Fisken i forsøket var Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) fra SalMar ASA. Smolten ble overført i forsøksmerder mars 2009 som 105 grams smolt (500 smolt per merd). Laksen fikk tre ulike fôrtyper gjennom hele sjøfasen (3 merder per fôrtype)

- Standard kommersielt tørrfôr (kontrollfôr)
- Kontrollfôret tilsatt arginin (argininfôr)
- Kontrollfôret tilsatt glutamat (glutamatfôr)

Det NFR finansierte prosjektet OptiProd v Prof. K-A. Rørvik ved Nofima hadde ansvaret for fisken fra mars-september 2009. I denne perioden var hovedmålet å undersøke betydningen av fôrtilsetningene for tilvekst, fôrutnyttelse og immunrespons. Vi overtok fisken i september 2009, og fikk derved benytte et fiskemateriale med en veldokumentert historikk. Slik kunne vi også få produksjonsdataene for fisken gjennom hele sjøfasen, fra utsett til slaktning i tillegg til at vi samarbeidet om uttaket av fisk til analyse i september. I tillegg til prøveuttaket i september, ble fisk også tatt ut til analyse i desember 2009 og i mai 2010. En oversikt over uttakene og analyser er gitt i tabell 1. Fire mastergradsstudenter (B.Rahnama, M.S. Latif, Y.Gang, Y. Hu), 3 PhD studenter (T.Larsson, M.Gaarder, R.Arge) og en post doc (D.Bahuaud) var tilknyttet studien.



Figur 6. Deltakere på sluttuttaket mai 2010. Fra venstre bakerst: Mari Gaarder PhD Universitetet for Miljø og Biovitenskap (UMB), Thomas Larsson PhD Nofima Marin (N Marin)/UMB, Regin Arge PhD Fiskaaling/ N Marin/UMB, Sissel Nergaard ansvarlig tekniker N Marin, Grethe Enersen laboratorieleder Nofima Mat, Magny S. Thomassen professor UMB, Kristian Prytz prosjektleder FHF, Bente Ruyter forsker N Marin, Erling Olaf Koppang forsker Norges veterinærhøgskole, Diane Bahuaud post doc. UMB, Yuan Hu mastergradsstudent N Marin/UMB. Fra venstre foran: Bjarne Saltkjevik forskningstekniker N Marin, Oddvar Karlsen tekniker N Marin, Turid Mørkøre prosjektleder N Marin, Kjell-Arne Rørvik forsker/ansvarlig oppdrett. De som mangler på bildet er T-K Østbye post doc N Marin, Y. Gang mastergradsstudent N Marin/UMB, M.S. Guajardo stasjonsbestyrer Averøy, forsker Marit Espe Nifes, Forsker Inger (Foto William Nofima).

Tabell 1. Oversikt over tidspunkt for uttak av fisk og analyse

	april 2009	september 2009	desember 2009	mai 2010
	Smolten overført i sjø	Uttak av fisk til analyse	Uttak av fisk til analyse	Uttak av fisk til analyse/ Utslakting
<i>Analyser</i>				
Produksjonsparametere*	X	X	X	X
Vekt og lengde	X	X	X	X
sammenvoksnings i buk og melanin			X	X
Utseende organer			X	X
Vev til histopatologi			X	X
Skjelettmuskel til histologi		X		X
Prøver til genekspressjon				X
Vev til kjemisk analyse				
- Fett	X	X	X	X
- Frie a.a.				X
- Bindevev				X
- Metabolitter				X
Fargemåling filet		X	X	X
Melanin i filet		X	X	X
TEKSTURANALYSE		X	X	X

- I tillegg ble tilveksten beregnet for hele perioden.

3.2 Fôr og fôring

Grunnfôret som ble benyttet var et kommersielt tørrfôr (kontroll fôr). Forsøksfôrene ble produsert på forsøksstasjonen ved å coate kontrollfôret med 1,5% arginin (Fenchem Biotek Ltd, Nanjing, Kina) eller 1,5% L-glutamat (Meihua Holding Group Co., Ltd, Hebei, Kina). Alle tre fôrene ble i tillegg coatet med rapsolje. Fôrsammensetningen er vist i tabell 2. Fôrene ble analysert i henhold til standard prosedyrer (se kvalitetssystemet-HACCP). Laksen ble fôret fire ganger per dag med automatiske fôrautomater og det ble benyttet fôrspillsopsamling for å kunne beregne fôrfaktor (FF) og spesifikk fôringsrate (SFR). Sjøtemperaturen ble logget daglig.

Tabell 2. Sammensetning av kontrollfôret

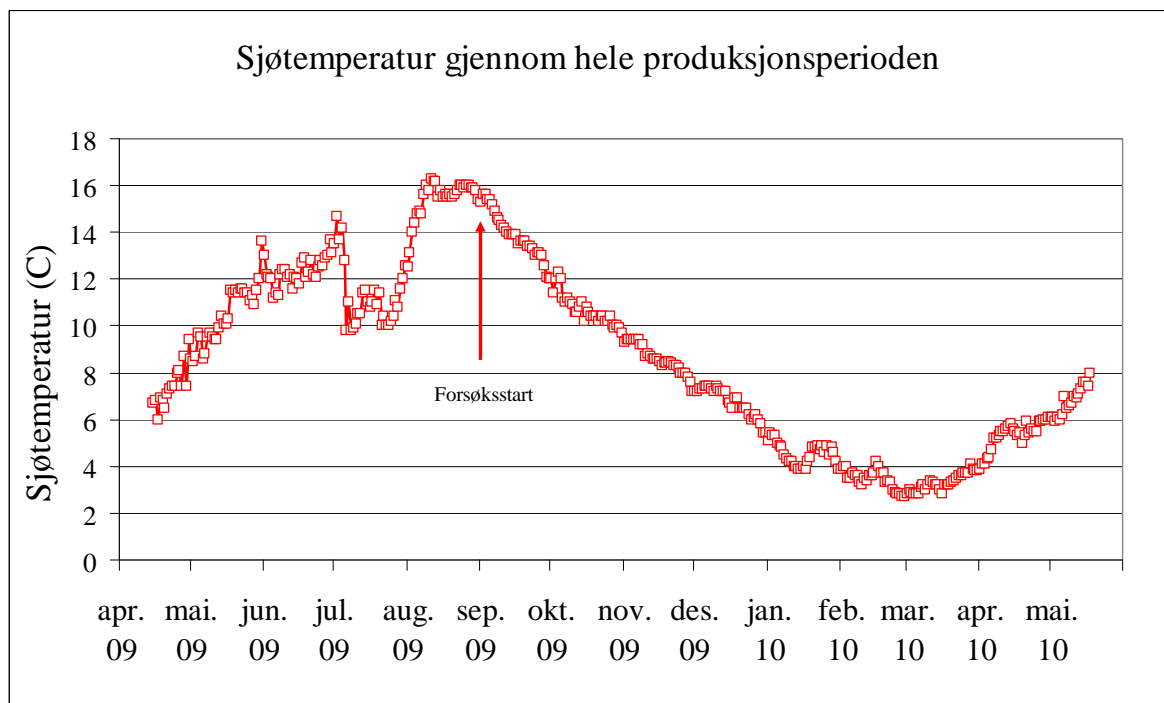
Tørrstoff, %	92.7
Fett, %	35.1
Protein, %	35.3
Stivelse, %	7.6
Aske, %	5.4
Ufordøyelig karbohydrat	9.5
Astaxanthin, mg/kg	40
Energiinnhold, MJ	25.1

Tabell 3. Aminosyresammensetning i forsøksfôrene (% aa)

	Kontrollfôr	Glutamatfôr	Argininfôr
Cystein	0.34	0.34	0.34
Taurin	0.12	0.12	0.12
Aspartat	2.96	2.97	2.92
Metionin	0.79	0.79	0.77
Treonin	0.17	0.17	0.16
Serin	1.40	1.41	1.41
Glutaminsyre	5.19	6.31	5.12
Glycin	1.45	1.46	1.44
Alanin	1.38	1.38	1.36
Valin	1.48	1.48	1.48
Isoleucin	1.39	1.37	1.33
Leucin	2.19	2.21	2.16
Tyrosin	1.09	1.09	1.08
Fenylalanin	1.32	1.34	1.31
Histidin	0.74	0.75	0.75
Hydroksylisin	0.04	0.03	0.03
Ornitin	0.01	0.01	0.01
Lysin	1.94	1.93	1.91
Ammonium	1.99	1.95	1.94
Prolin	1.39	1.48	1.51
Arginin	2.09	2.09	3.13
Tryptofan	0.34	0.36	0.35

Tabell 4. Råvaresammensetning av fôret

Fiskemel (SuperPrime)	37
Hi Pro Soya (48%)	3,5
Soyaprotein konsentrat (Imcopa SPC)	10
Solsikke Expeller	1,6
Bønner	17
Standard fiskeolje	15,5
Rapsolje	14
Vitamin mineral premiks	0,32

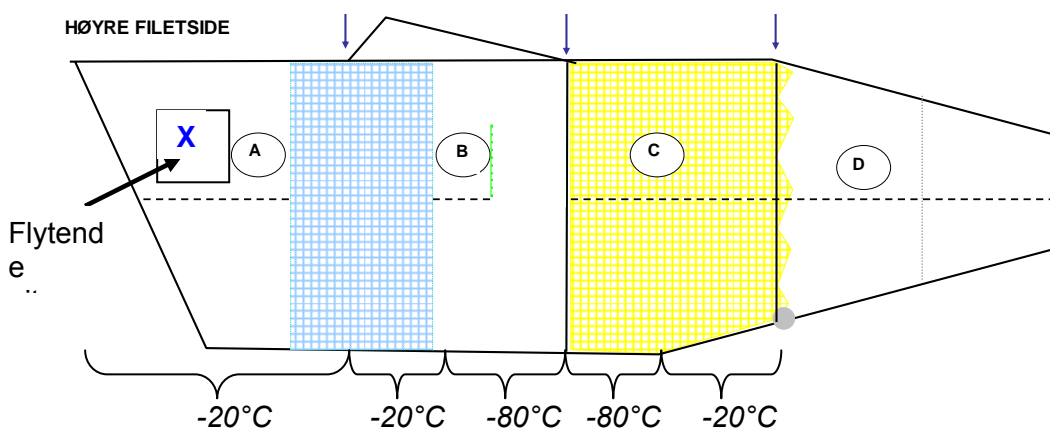


Figur 7. Utvikling i sjøtemperatur gjennom hele produksjonsperioden i sjø - fra fisken ble fordelt i forsøksnøter i april 2009 frem til slaktning og avslutning av forsøket i mai 2010.

3.3 Prøvetaking

I september, desember og mai ble all forsøksfisken veid, i tillegg til at vekstutviklingen ble beregnet kontinuerlig ut fra mengde fôr spist. Fisken som ble tatt ut til analyse representerte gjennomsnittet i merden (10 fisk per merd, totalt 90 laks), basert på vektprøvene. Fisken som ble tatt ut til analyse ble bedøvd før det ble tatt blodprøver av fisken. Fisken ble utblødd i sjøvann i ca. 20 minutter før den ble åpnet. Grad av sammenvoksninger av innvoller ble vurdert (Speilberg skala) og utseende av organer ble evaluert visuelt. Deretter ble fisken filetert. Vekten av rund utblødd fisk, sløyd fisk, lever, hjerte og filet ble registrert. Vevsprøver ble lagt i glass

med formalin for senere histopatologiske undersøkelser. Ved uttaket i september og mai ble det også tatt ut muskel til histologisk vurdering og enzymanalyser. I september ble muskelprøver også sikret for analyser av genekspressjon og frie aminosyrer i muskel og lever (Tabell 1). Etter at filetene var lagret på is i fire dager ble det foretatt en rekke ulike analyser: Kjemisk sammensetning, tekstur, filetfarge, pH, vannbindingsevne. Vekten av filetene ble registrert og vekttapet av filetene gjennom de fire lagringsdagene ble beregnet. Etter at analysene av filetene var gjennomført, ble en kotelett fra hver fisk, skåret fra fileten i forkant av ryggfinner, lagt i en forseglet plastpose og lagret på is i ytterligere en uke. Vekttapet av koteletten ble beregnet og tekstur og fargen ble analysert. Figur 8 viser hvor på filetene de ulike analysene ble utført.



Figur 8. Skjematisk illustrasjon som viser hvor de ulike analysene ble tatt i mai. A-D = teksturprøvetaking. X = frie aminosyrer og genekspressjon og histologi.

3.4 Analysemetoder

Tekstur

Alle teksturanalyser ble utført ved bruk av instrumentet Texture Analyzer (TA-XT2), ved at en 12.5mm sylinder ble presset inn i fileten på dag 4. I mai ble målingene foretatt på punkt A-D (Figur 8), hvorav punkt A og B er hovedpunktene, da disse ble benyttet ved samtlige uttak (september, desember og mai). Videre ble tekturen analysert ved måling på 2,5 cm tykke koteletter som var skåret ut av område A-B (dag 4 og 12 etter slakting) ved uttaket i mai. Teksturanalysene ble gjennomført med en konstant hastighet (1mm/s), og grafene (tid-kraft) ble analysert i etterkant ved bruk av tilhørende programvare (Stable Micro System). Kraften som skulle til for å bryte gjennom overflaten av koteletten (bruddstyrken) ble benyttet som et mål på fastheten i fileten. I tillegg så vi også på arealet under tid-kraft (Newton) grafen. Bruddstyrken og arealet under grafen i rå filet har vist god sammenheng til sensorisk vurdert fasthet i både rå og røkt laks (Mørkøre og Einen 2003).

Filetspalting

Grad av filetspalting ble vurdert etter en skala fra 0 – 5, der 0 er ingen spalter og 5 poeng er ekstrem spalting (Andersen m.fl., 1994)

Fettinnhold og filetfarge

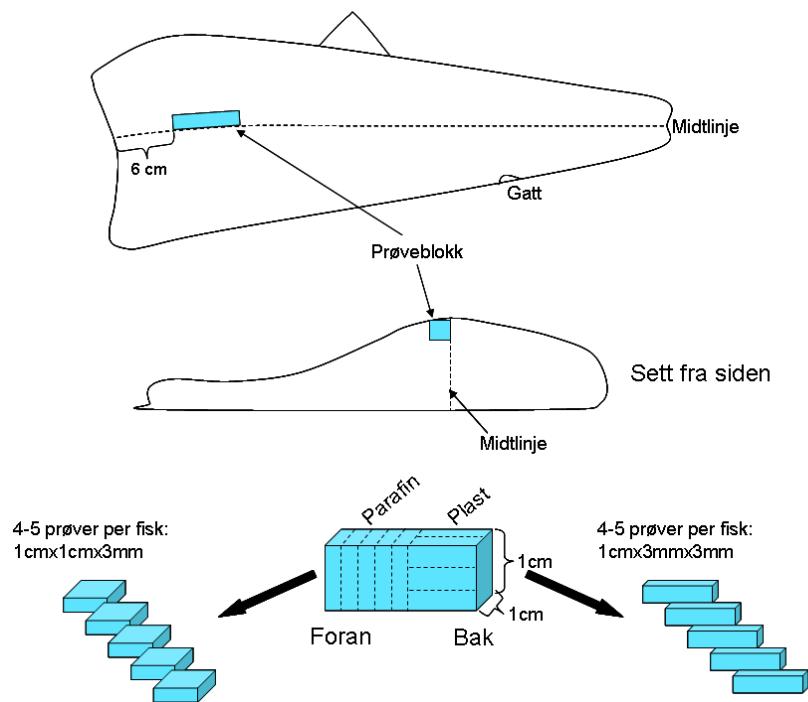
Fettinnhold og filetfarge (SalmoFan score) ble analysert ved foto i henhold til metode beskrevet av Folkestad m.fl. (2008).

Frie aminosyrer og nitrogenholdige metabolitter

Etter at proteinene var utfellet, ble frie sirkulerende aminosyrer ble analysert i "hvit" muskel og lever white muscle and liver på Biochrome slik beskrevet av Espe m.fl. (2006). I korte trek ble vevet ekstrahert u fosfat buffer (pH 7.0) og de-proteinisert med 1:1 (v:v) av 5% (wt:v) sulfosalisylic syre. Prøvene ble oppbevart på is i 30 minutter og sentrifugert ved 5000g i 15 minutter. Frie aminosyrer ble bestemt i supernatanten etter separasjon på Biochrom Amino Acid Analyser med lithium buffer. Postkolonne derivatisering med ninhydrin og deteksjon på 570 og 440nm (prolin & OH-prolin). Standarder for aminosyrene var fra Sigma. Norleucine ble benyttet som intern standard

Histologiske undersøkelser av muskel

Muskelprøver til histologiske undersøkelser ble sikret fra totalt 90 fisk; 10 fisk per merd og 3 merder per fôr (3 ulike fôr). Alle muskelprøvene ble tatt umiddelbart etter avlivning, og prøvene ble tatt fra området foran på fileten og rett over midtlinjen ved ryggraden (Figur 9). Fra hver av fiskene ble det skjært ut et rektangel, som videre ble finsnittet til riktig størrelse for fiksering i formalin (4% formalin, 0.08M natriumfosfat, pH 7.0) og glutaraldehyd (2.5% glutaraldehyd, 0.1M PIPES, pH 7.2). De formalinfikserte prøvene ble støpt inn i parafin innen én uke.



Figur 9. Illustrasjon av prøvetaking til histologiske analyser av filetmuskel.

Basert på teksturmålingene fra alle fiskene ble 5 fisk selektert for histologisk analyse fra hver merd; totalt 45 fisk. Snittene ble farget med Hematoxylin-Eosin. Denne oversiktsfargen egner seg for å gjøre en generell evaluering av muskelstrukturen. Snittene ble vurdert og klassifisert i forhold til de endringer som ble observert i muskelstrukturen. Eksempler på egenskapene som ble vurdert er illustrert i Figur 10 på side 22.

Histopatologiske undersøkelser

Vev fra viscerale organer, tarm og gjeller ble fiksert i formalin som nevnt ovenfor, prosessert for innstøpning og innstøpt i parafin etter standard metoder (45 + 90 fisk) (Bancroft og Gamble 2002). Histologiske preparater ble fremstilt og farget med Hematoxylin-Eosin og i noen tilfeller med "periodic acid-Schiff" (PAS) (Bancroft og Gamble 2002) for å undersøke for tilstedeværelse av karbohydrater i vevene.

Sammenvoksningsorganer

Grad av sammenvoksningsorganer ble vurdert i hht Speilberg skalaen (total).

Melanin

Skala for bedømming av melanin i organer

0 = intet

1 = lite melanin

2 = moderat

3 = mye

Melanin i filet

0 = intet

1 = små områder som kan skrapes bort

2 = større områder som kan skrapes bort eller små områder som ikke kan skrapes bort

3 = Større områder som ikke kan skrapes bort

Seraanalyser

Sera ble fremstilt ved uttak av blod fra caudalvenen i vacutainer med derpåfølgende sentrifugering (90 fisk). Sera ble frosset umiddelbart og ikke tint opp igjen før analyse skulle foretas. Urea ble målt (ved 340 nm) med et Avida®1650 analyseinstrument under oksidasjon av NADH til NAD som invers reaksjon (Tietz 1995). Alalin aminotransferase (ALT) ble målt ved 340 nm med et Avida®1650 analyseinstrument ved tilsetning av α -ketoglutarat som sekundærstoff. Hastigheten i absorbansnedgang er proporsjonal med ALT-aktivitet (Tietz 1995). Kreatinin kinase (CK) ble målt (ved 505 nm) med et Avida®1650 analyseinstrument under reaksjon med pikrinsyre til et farget kompleks (Tietz 1995).

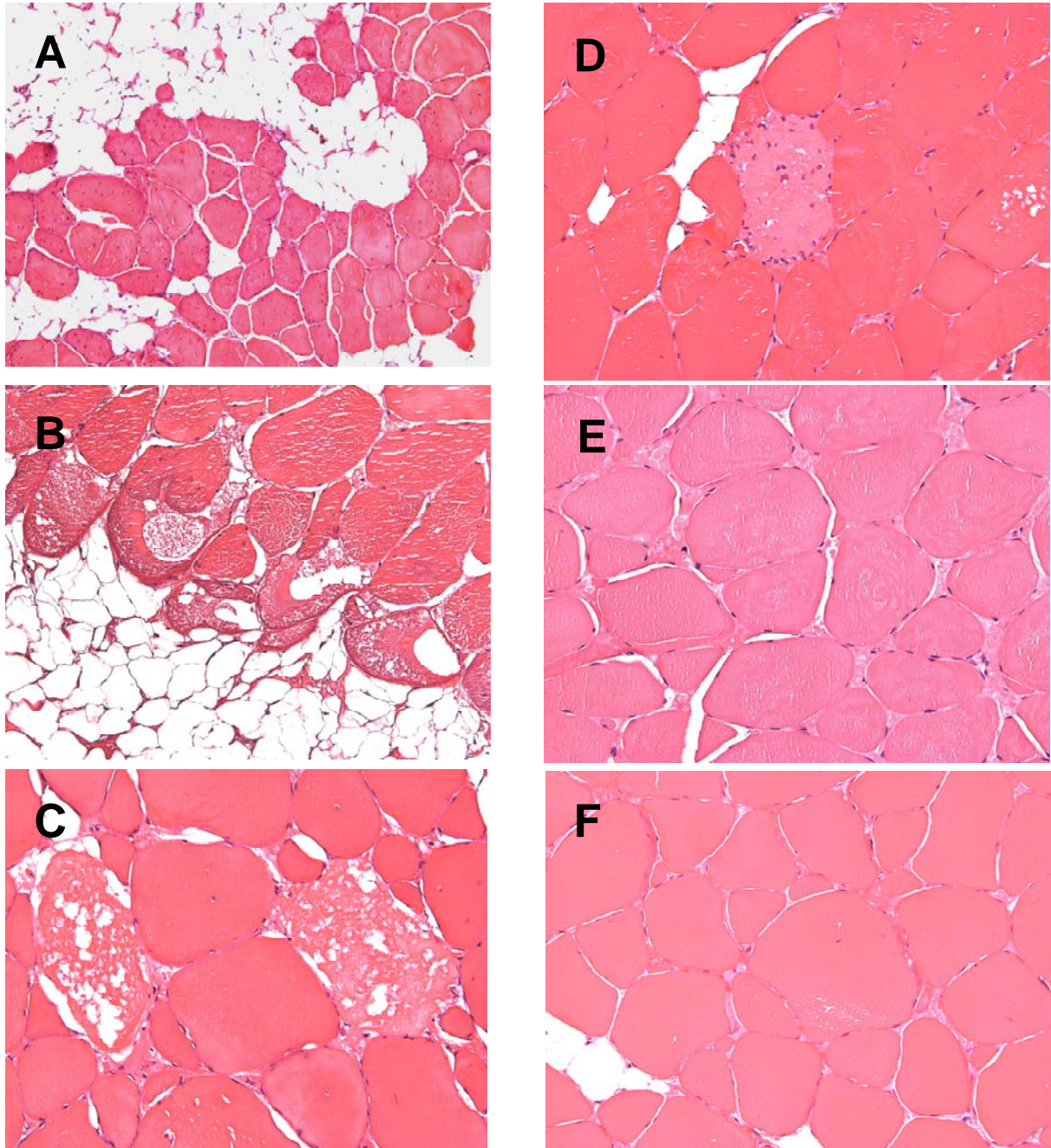
HR NMR metoder, metabolsk profil

Proton (^1H) NMR er teknikk som gjør det mulig identifisere og kvantifisere en rekke metabolitter samtidig. Det er også mulig å oppdage uventede forbindelser i et ^1H NMR spekter (er en "non-targeted" teknikk). I prinsippet vil alle forbindelser som inneholder proton, gi signaler i et NMR spektrum, og man får et "fingeravtrykk" av prøven. Imidlertid er protonspektre ganske komplekse med mye overlapp, siden alle protoner gir signaler og nesten alle forbindelser inneholder proton. Det er derfor vanlig å benytte ulike multivariate metoder for å få en oversikt over forskjeller og grupperinger i et datasett. I dette studiet er det metabolske "fingeravtrykket" brukt i multivariat analyse (metabolsk profil), men det er også gjort en kvantifisering av bestemte metabolitter i prøven (glutamat og arginin).

Vi analyserte muskel fra seks fisk, tre med bløt tekstur fra hver av forsøksgruppene (Kontrol, Glutamat, Arginin) og muskel fra tre fisk fra hver av forsøksgruppene med hard tekstur. Resultatene skulle danne grunnlag for å vurdere potensialet og nytteverdien til NMR metoden. Fra den ene muskelprøven ble 2 paralleller analysert (tatt ut på ulikt sted på biten). Dette resulterte i syv NMR spekter.

Ekstraksjonsmetode: Biter av muskelprøver frosne ved -20°C (ca 50 mg) ble skrapet av og ekstraksjon av lavmolekylære forbindelser ble gjort ved metanol, vann og kloroform (som beskrevet i Wu et al. (2008) ved bruk av Precyllis-apparat. Methanol i methanol/vannfasen ble fjernet ved vakuumsentrifugering, og den resulterende vannfasen ble frosset inn til -80°C og frysetørket over natt. Før NMR kjøring ble 0.6mL fosfatbuffer (PBS buffer, pH= 7.4) med 0.5mM DSS (NMR standard) tilsatt og løsningen overført til 5mm NMR rør.

NMR kjøring og databehandling: Chenomix NMR suite 7.0 profiler ble brukt til å identifisere og kvantifisere metabolitter i ekstrakter fra laksemuskelen. Programvaren inneholder en database med spektra fra flere hundre metabolitter. Ved å tilpasse arealet av toppene i de analyserte prøvene til referansespektra, får vi ut konsentrasjonen direkte. De fleste forbindelser kan kvantifiseres relativt enkelt, men noen kan være vanskeligere å identifisere/kvantifisere pga overlappende topper/ multiplets (mange små topper i stedet for en singlett).



Figur 10. Bildene illustrerer histologiske karakteristika som ble vurdert av filet:

- Sentralt plasserte cellekjerner (A).
- Oppløste muskelfibre langs bindevevet og sentralt i muskelfiberbuntene (B & C).
- Muskelfibre med betennelsesceller (D).
- Proteinmasser mellom muskelfibrene (E)
- Nydannelse av muskelfibre (F).

Genuttrykk

Analysene ble utført ved bruk av Microarray analyser/ nyutviklet (oligo)kvalitetschip. Microarray (= mikromatrise) er en metode som viser gener som er slått på eller av i laks. I vårt tilfelle ønsket vi å undersøke om 1) fôret hadde betydning for hvilke gener som var opp- og nedregulert (på/av) og om 2) vi kunne se noen generelle kjennetegn for laks med varierende fasthet i muskel (korrelasjon til bruddstyrke) mht genuttrykk. Slik ville vi også få en pekepinn på denne analysen kan gi en indikasjon på om vi på et molekylært nivå kan forklare underliggende årsaker til teksturvariasjoner i oppdrettslaks. Ved å se på 1000-tals gener samtidig har metoden vist seg å være et nyttig sorteringsverktøy for å definere aktuelle problemstillinger å fokusere på videre. Mikromatrisen brukt her er spesifikk for laks og er utviklet av en gruppe forskere ved Nofima med Dr. Aleksei Krasnov som ansvarlig.

Beregninger og statistikk

Tilveksten ble beregnet som Thermal Growth Coefficient (TGC), også kalt vekstfaktor, TGC

$TGC: 1000 * ((\text{Sluttvekt}^{1/3} - \text{startvekt}^{1/3}) / (\text{dager} * \text{snittemperatur}))$

Leverindeks (HSI): $\text{Levervekt (g)} / \text{Kroppsvekt (g)} \times 100$

Hjerteindeks (CSI): $\text{Hjertevekt (g)} / \text{Kroppsvekt (g)} \times 100$

Det ble benyttet ulike statistiske verktøy/programpakker:

SAS software ver. 8.2 (Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA), The Unscrambler (version 9.8, Camo, Norway), Excel, Unistat5 Statistical Package. Versjon 5.5 (Megalon S.A. og Unistat Ltd).

Multivariat analyse av HR-NMR: Rådata ble eksportert ved hjelp av Topspin software, og gjort klart til multivariat analyse (preprosessering inkludert datareduksjon) ved hjelp av programmet "Prometab" i Matlab. Ulike preprosesserings-rutiner ble gjennomført (scaling, binning, mean centering etc). Prosessert data ble deretter eksportert til "Unscrambler" for multivariat dataanalyse, nærmere bestemt prinsipalkomponent-analyse (PCA), for å se om prøvene grupperte seg utifra fôr eller fasthet i muskel (bløt/hard).

4. Resultater og diskusjon

Hovedformålet med denne studien var å undersøke om økt tilsetning av aminosyrene arginin og glutamat (henholdsvis) i et standard kommersielt tørrfôr kan forbedre teksturen i oppdrettslaks. Videre også å identifisere sammenhengen mellom filettekstur og ulike morfologiske, biokjemiske og genetiske parametere. Resultatskapittelet er bygget opp slik at teksturresultatene presenteres først. Deretter vil hver av de egenskapene som ble analysert bli presentert og avslutningsvis sammenstilles de ulike parameterne mot teksturresultatene.

4.1 Tekstur

September 2009

Teksturanalysene i september viste at laksen som fikk arginin eller glutamat i fôret var fastere i kjøttet enn kontrollfisken. I dette uttaket ble det også foretatt en undersøkelse av laksens evne til å takle stress/ trenging i forbindelse med slakting. Resultatene viste at trenging fremskyndet rigorforløpet og reduksjonen i pH ved lagring. Laksen som fikk glutamatfôret bevarte et høyere pH nivå i muskelen enn laksen fra de andre fôrgruppene, og teksturen i laksen fra begge forsøksgruppene var fastere sammenlignet med kontrollgruppen etter 48 timers lagring.

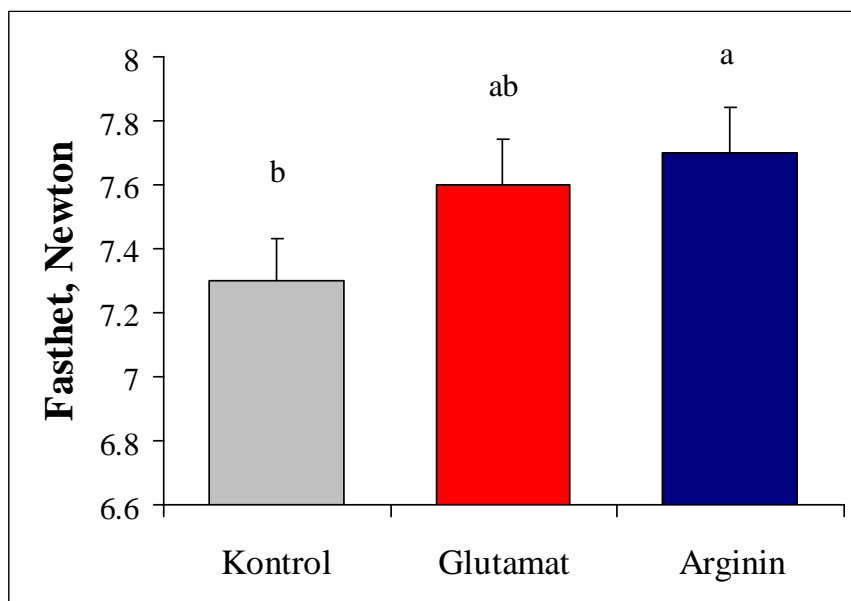
Desember 2009

Teksturen i desember var generelt god. Likevel var det forskjeller mellom fôrgruppene, med høyere teksturverdier for forsøksfôrene. Teksturen var fastest for laksen som var fôret med argininfôret. Det var også en tendens til at glutamatfôret ga en fastere tekstur sammenlignet med kontrollfôret, men forskjellen var ikke statistisk signifikant (Figur 11).

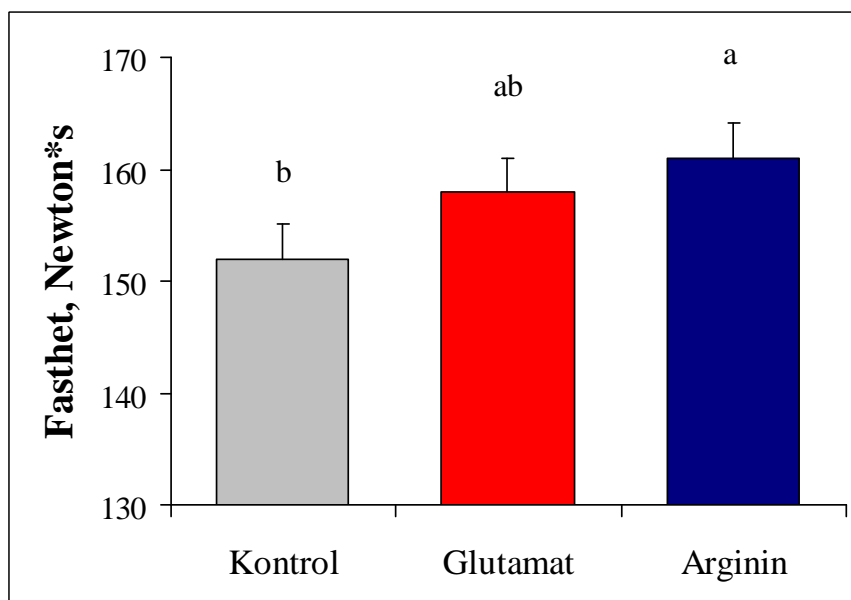
Mai 2010

Teksturanalysene i mai var relativt omfattende. Det ble tatt teksturmålinger på fire ulike steder på dag 5 etter slakting (fra nakke til spore), og teksturen ble også analysert etter 12 dagers lagring (ryggstykket). Teksturanalysene viste at laksen som fikk glutamatfôret hadde fastest tekstur. Det er også interessant å se at teksturen i denne gruppen forble uendret etter 12 dagers lagring, mens teksturen ble bløtere for kontroll- og arginingruppen slik forventet. Teksturen i laksen i dette forsøket var generelt fast og fin. Tidligere studier har vist at forskjeller mellom behandlinger (slaktemetode/fôring mm) ofte er større for fisk med noe dårligere utgangspunkt. Dvs. at vi sannsynligvis ville fått enda større forskjeller mellom fôrgruppene i en periode med problematisk tekstur.

DESEMBER UTTAK

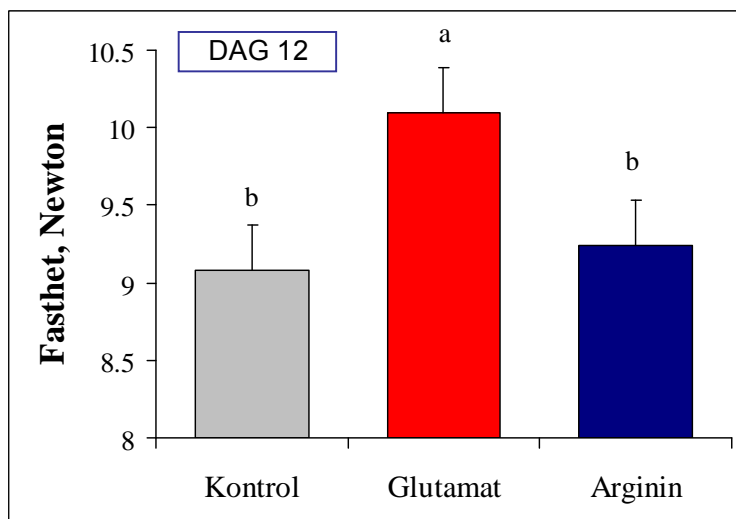
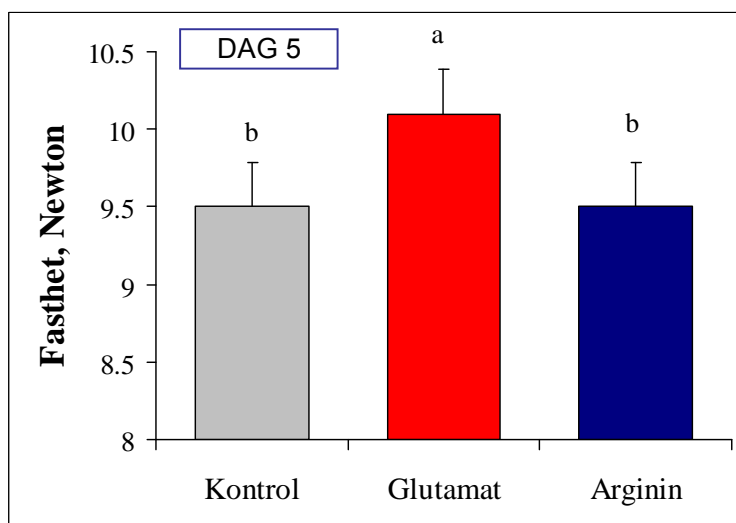
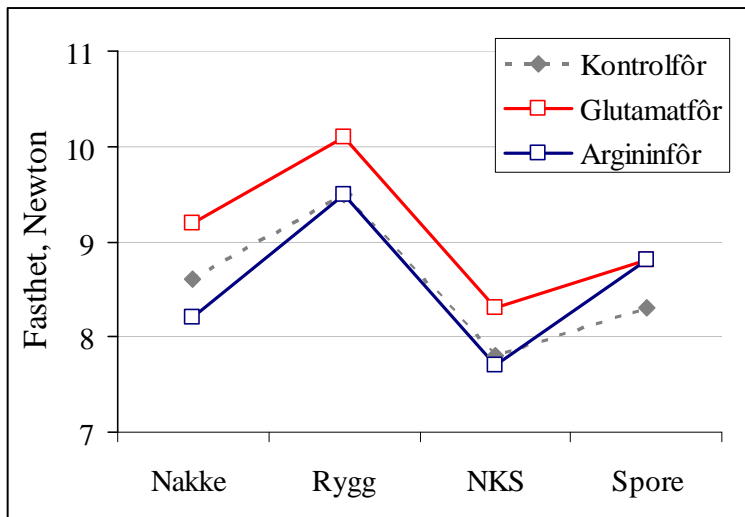


**FASTHET
OVERFLATE**

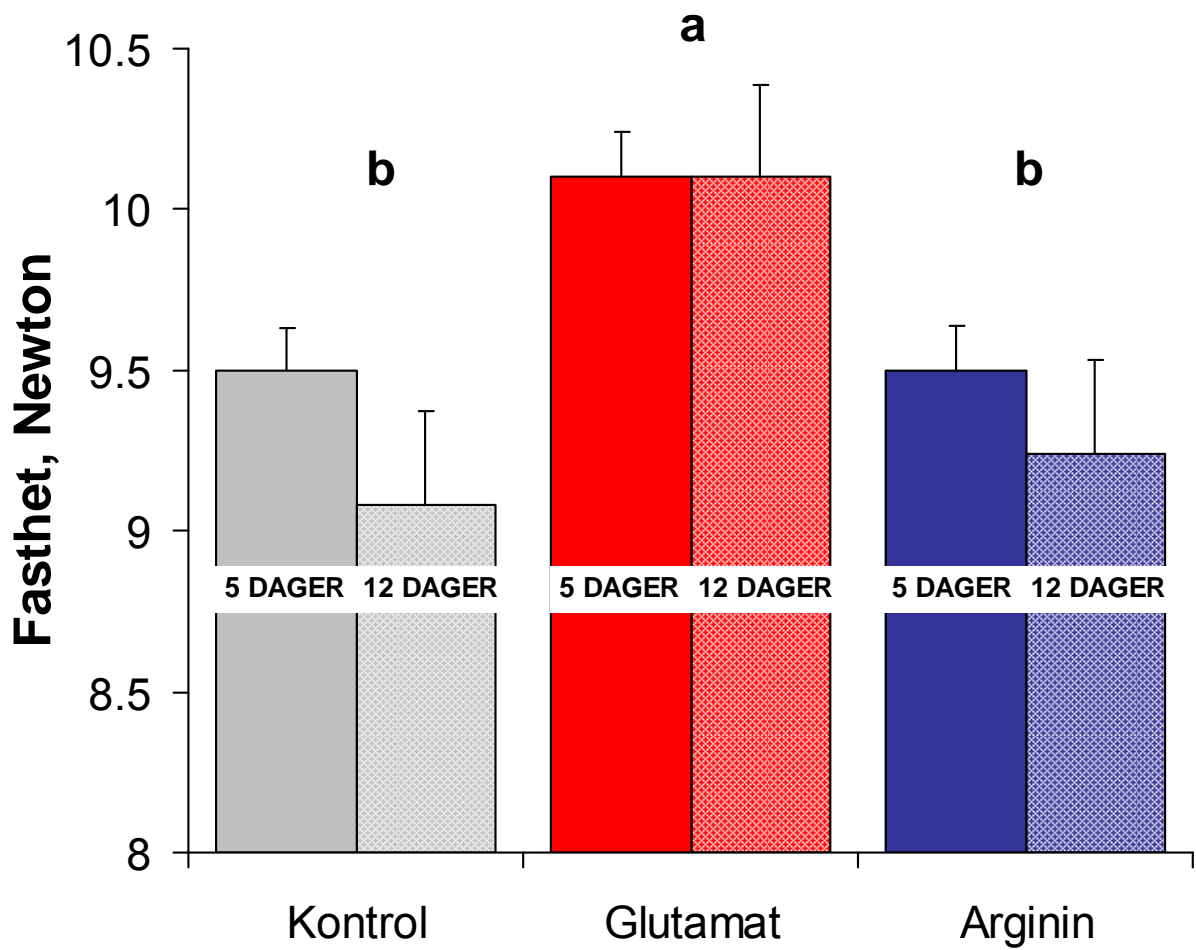


FASTHET TOTAL

Figur 11. Resultater fra instrumentelle teksturanalyser i desember. Øverste figuren viser bruddstyrke (Newton). Nederste figuren viser total arealet under tid - kraft grafen



Figur 12. Fasthet (bruddstyrke, N) i filet av 3 kilos oppdrettslaks fôret med et kommersielt tørrfôr (kontrollfôr) eller det samme fôret tilsatt arginin eller glutamat fra april 2009 til mai 2010. Øverste figuren viser fasthet i ulike deler av fileten 5 dager etter slakting. De to nederste figurene viser teksturen i ryggen etter hhv 5 og 12 dagers lagring. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom fôrgruppene.

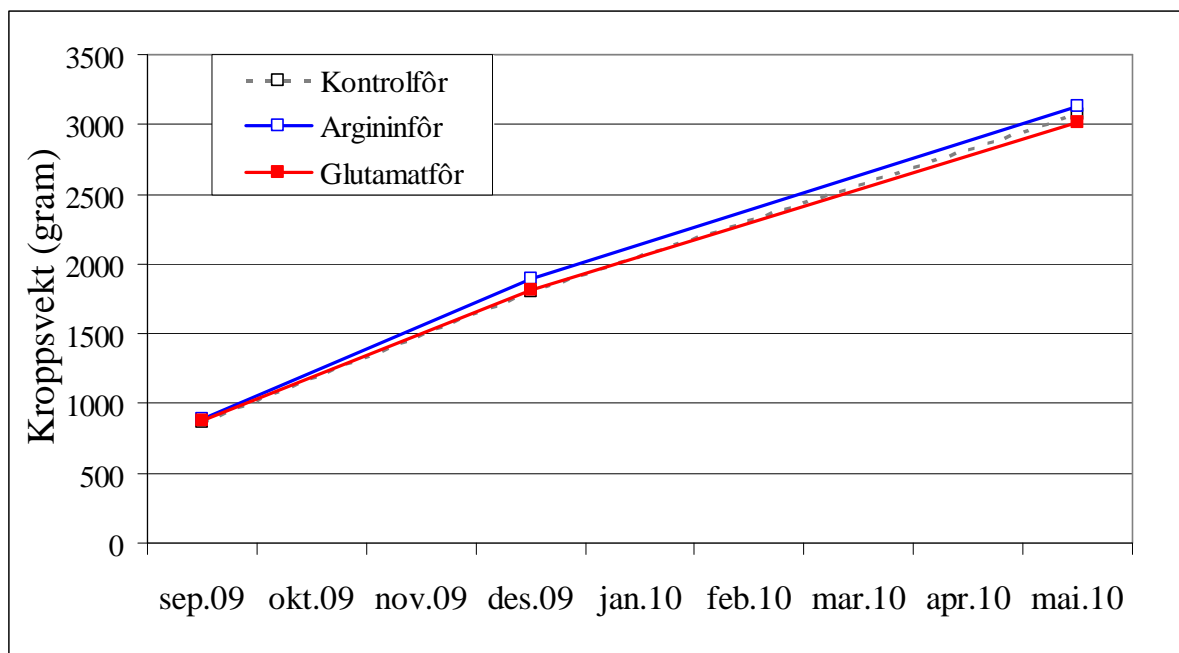


Figur 12-2. Fasthet målt i 3 kilos oppdrettslaks gitt et standard kommersielt tørrfôr eller det samme fôret tilsatt glutamat eller arginin. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom fôrgruppene.

4.2 Tilvekst

Fiskevekten økte fra 105 gram til 3,1 kg fra fisken ble overført i forsøksmerder i april 2009 til den ble slaktet i mai 2010. Sjøtemperaturen gjennom vinteren var under gjennomsnittet for årstiden (Figur 7). Derfor ble produksjonstiden frem til slaktevekt noe forlenget i forhold til forventning.

Ved oppstart av dette forsøket i september veide fisken i gjennomsnitt 876 gram. Vekstutvikling gjennom forsøket er vist i Figur 13 nedenfor. Fiskevekten var ikke signifikant forskjellig mellom fôrgruppene ved avslutning, men laksen som fikk ekstra tilsetning av arginin i fôret hadde den raskeste veksten i perioden september til desember, med en vekstfaktor (TGC) på 3,41. TGC for kontroll- og glutamatgruppen for denne perioden var hhv. 3,29 og 3,28 (Figur 11). Denne vektgevinsten gjennom høsten og tidlig vinter beholdt arginingruppen frem til slakting selv om veksten var lavere sammenlignet med kontrollgruppen i perioden desember til mai. Ved avslutningen av forsøket i mai 2010 veide laksen som fikk argininfôret drøye 50 gram mer enn kontrollfisken i gjennomsnitt (ca. 2%).



Figur 13. Vektutvikling gjennom forsøket

4.3 Vektregistreringer og utbytte

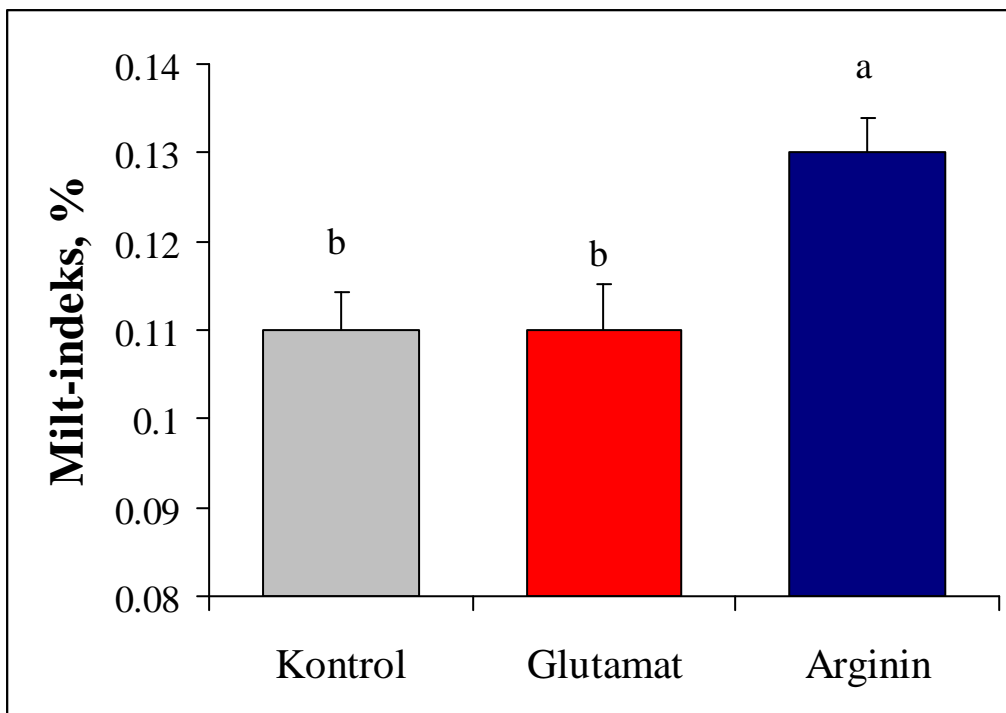
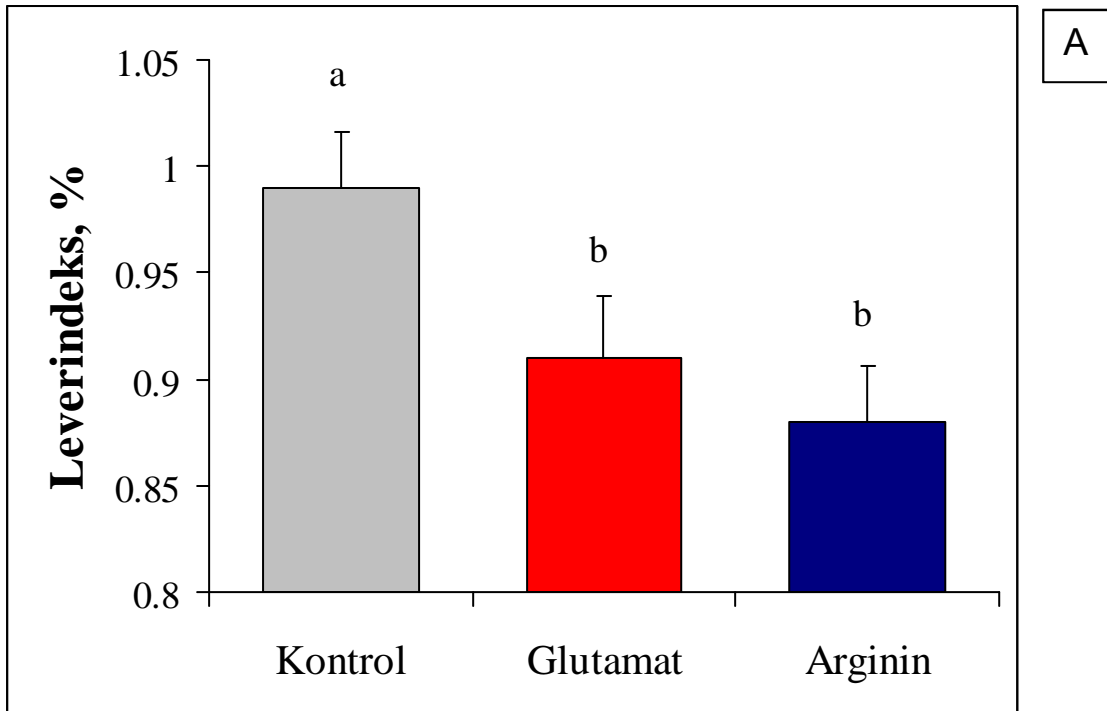
Vekten av fisken som ble tatt analysert var i godt samsvar med gjennomsnittsvæksten av forsøkspopulasjon. Vekt og lengde av fisk og filet viste ingen forskjell mellom fiskegruppene, og derav heller ikke kondisjonsfaktoren, slakteutbytte eller filetutbytte. Imidlertid var det en tendens til at laksen i Arginin-gruppen var noe lenger (0,5 cm) sammenlignet med kontroll fisken på samme fiskevekt. For filetlengden var forskjellen tilnærmet signifikant ($P = 0,09$). Dette er i motsetning til resultatene fra uttaket i september, da fisken i Arginin-gruppen hadde den høyeste kondisjonsfaktoren (1,4 vs. 1,3 for Kontroll og Glutamat-gruppen) og 0,5% høyere filetutbytte.

Vektregistreringene av lever og milt viste signifikante forskjeller mellom fôrgruppene. Leverindeksen for fisken i Kontroll-gruppen var 8-11% høyere sammenlignet med leverindeksen for Arginin- og Glutamatgruppen. Disse resultatene stemmer godt overens med resultatene fra forrige fôringsstudie da laksen fikk et fôr som var tilsatt en kombinasjon av aminosyrene glutamat og arginin. I det forsøket var leverindeksen også lavere for fisken som fikk arginin+ glutamat i fôret sammenlignet med fisken som fikk kontrollfôr. Milten utgjorde en høyere %andel av fisken som fikk arginifôret sammenlignet med de andre fôrbehandlingene (Figur 14). Hjereteindeksen var på 0,1% og viste ikke signifikante forskjeller mellom fôrgruppene.

Tabell 5. Vektregistreringer, kondisjonsfaktor og utbytte av laksen som ble tatt ut til analyse i desember 2009 og mai 2010.

	Kontroll	Glutamat	Arginin	P-verdi
<u>Desember 2009</u>				
Rundvekt, kg	1,7	1,8	1,8	0.20
Sløydvekt, kg	1,5	1,6	1,6	0.16
Fiskelengde, cm	50,1	50,6	50,8	0.44
Filetvekt, g	550	565	561	0.72
Kondisjonsfaktor	1,38	1,41	1,38	0.29
Slakteutbytte, %	86,9	87,2	87,1	0.58
Filetutbytte, %	72,6	70,8	71,1	0.34
<u>Mai 2010</u>				
Rundvekt, kg	3.1	3.1	3.1	0.70
Sløydvekt, kg	2.7	2.8	2.7	0.61
Filetvekt, g	985	998	989	0.83
Filetlengde, cm	34.4	34.6	35.2	0.22
Kondisjonsfaktor	1.47	1.47	1.43	0.48
Slakteutbytte, %	87.5	88.2	88.1	0.66
Filetutbytte, %	72.7	72.4	72.7	0.75

Registrerte parametere viste ingen signifikante forskjeller mellom fôrgruppene



Figur 14. Leverindeks (A) og milt-indeks (B) for laksen tatt ut til analyse i mai 2010. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene ($P < 0,05$).

4.4 Organsammenvoksninger og melanin

Uttak desember

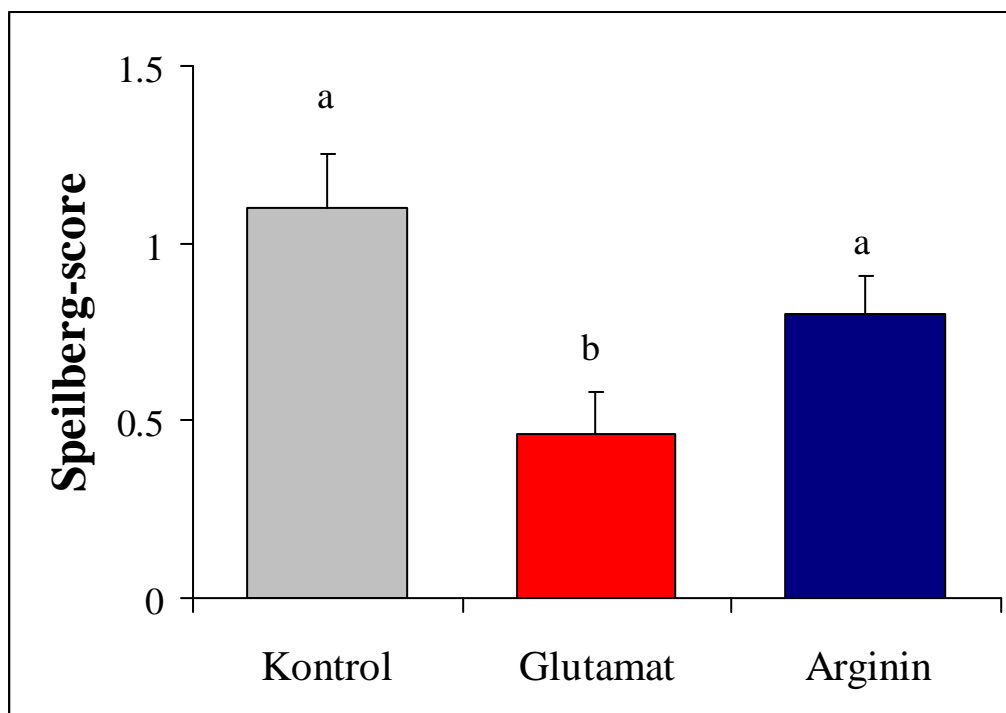
Graden av sammenvoksninger i innvoller i henhold til Speilberg score tilsvarte 1,2-1,3 i gjennomsnitt i desember. Melanin deponering i organer var på 1,7 poeng for fisken som fikk standardfôret og 1,0 i fisken som fikk forsøksfôrene. Denne forskjellen mellom Kontroll gruppen og forsøksgruppene på 0,6 poeng var ikke statistisk signifikant. Det var svært liten deponering av melanin i filet i laksen som fikk Kontroll og Glutamat fôr, (0,1 poeng i gjennomsnitt). Det ble ikke registrert melanin i filet hos noen av laksene som fikk argininfôret. Leverfargen var på 1,7 poeng i gjennomsnitt for alle fiskegruppene.

Uttak mai

Sammenvoksninger i filet var lavere i mai enn i desember, og Speilberg score og forskjellen mellom kontrollgruppen og fisken som var fôret med arginin var signifikant (Tabell 6 og Figur 15). Melanin i buk og filet var lav og tilnærmet lik for de tre fôrgruppene. Leverfargen varierte fra lysbrun (score 1) til mørkebrun.(score 3). Leveren syntes å være noe mørkere i mai enn i desember og det var arginingruppen som hadde den mørkeste leveren i mai. En del andre makroskopiske observasjoner ble gjort av fisken i mai, slik som frekvensen av rød tarm, innvollsfett samt utseende av hjerte (trekantet vs. pæreformet) og milt (trekantet eller bønneformet) og konsistens av organer. Disse observasjonene viste at 2% av fisken hadde pæreformet hjerte, 24% hadde bønneformet milt, 9% hadde rød tarm, 18% hadde store mengder innvollsfett, 2% hadde hjerte med hhv bløt konsistens av hjerte og milt og 1 fisk hadde bløt konsistens av lever. Den eneste av disse observasjonene som viste signifikant forskjell mellom fôrgruppene var hjerteformen (høyest for kontrollgruppen). Likevel vektlegges ikke denne observasjonen på grunn av den lave frekvensen.

Tabell 6. Grad av sammenvoksninger (Speilberg score), melanisering og leverfarge av laksen analysert i mai 2010.

	Kontroll	Glutamat	Arginin	P-verdi
Speilberg, poeng	1,1^a	0.5^b	0.8^a	0,005
Melanin organer, poeng	0.9	0.9	1,0	0.96
Melanin buk, poeng	0,7	0.9	0,8	0.28
Melanin filet, poeng	0,1	0,1	0,0	0.30
Leverfarge, poeng	1,9	1.9	2,1	0.37



Figur 15. Sammenvoksninger av innvoller uttrykt som Speilberg score. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom fôrgrupper ($P < 0.05$).

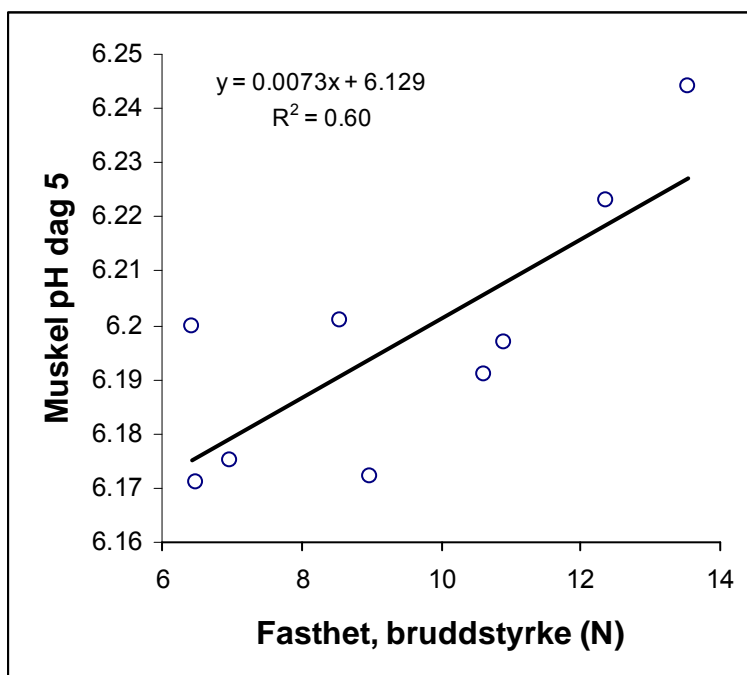
4.5 Fettinnhold, pH, farge og filetspalting

Fettinnholdet i filet (NKS) økte med 0,7% poeng fra desember til mai, fra 18,1% i gjennomsnitt til 18,8%. Det var ingen signifikant forskjell mellom fôrgruppene (Tabell 7). Målingene av pH i muskel etter 5 dagers lagring i mai viste at kontrollgruppen hadde signifikant lavere verdier enn arginin og glutamatgruppen. Lavere pH indikerer at laksen som fikk standardfôret hadde høyere glykogenlagre i muskel før avliving. Muskel pH ble ikke målt i desember.

Den visuelle fargen i Norsk Kvalitetssnitt (NKS) økte fra 25.4 til 25.5 i gjennomsnitt fra desember til mai. Fargen viste ingen signifikant forskjell mellom fôrgruppene i desember, men i mai var fisken som fikk argininfôret blekere enn fisken i kontrollgruppen og glutamatgruppen. Forskjellene i farge mellom fôrgruppene var imidlertid veldig små, og det menneskelige øye ville neppe klart å skille mellom fôrgruppene. Selv om fargen i NKS var tilstrekkelig, var det en del fisk som hadde bleke partier i ryggen i desember. Dette er et problem som forekommer fra tid til annen i norsk oppdrettslaks. Årsaken er ikke kjent, men det er interessant at problemet med bleke partier i ryggen var mindre uttalt for fisken som fikk forsøksfôrene sammenlignet med kontrollfôret. Problemet med blek farge i ryggen var borte i mai, og blev derfor ikke registrert. Laksen hadde generelt lite filetspalting, selv om det var en liten økning fra desember til mai – fra 0.1 til 0.9 i gjennomsnitt. Det var ingen signifikant forskjell mellom fôrgruppene.

Tabell 7. Fettinnhold, farge og filetspalting (gaping) i laksen som ble analysert i desember 2009 og mai 2010.

	Kontrol	Glutamat	Arginin	P-verdi
<u>Desember 2009</u>				
Fettinnhold, %	17.9	18.3	18.0	0.31
Farge, SalmoFan score	25.5	25.2	25.4	0.46
Gaping, poeng	0.2	0.2	0.0	0.33
Lys rygg, score 0-2	1.2a	1.0b	1.0b	0.003
<u>Mai 2010</u>				
Fettinnhold, %	18.8	18.8	18.7	0.98
pH dag 5	6.19a	6.22b	6.22b	0.04
Farge, SalmoFan score	26.6a	26.5ab	26.3b	0.13
Gaping, poeng	1.0	0.8	0.9	0.83



Figur 16. Sammen mellom fasthet i filet og pH

4.6 Fettinnhold og fettsyreprofil i lever

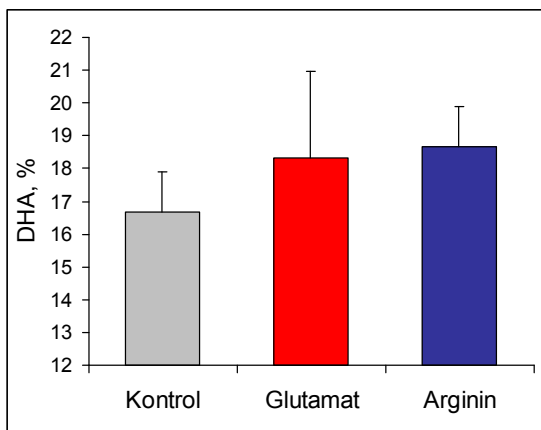
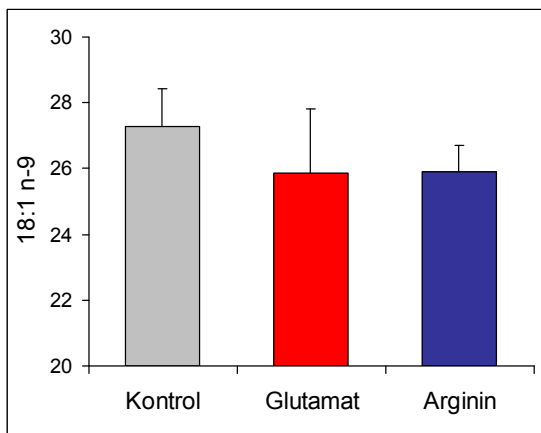
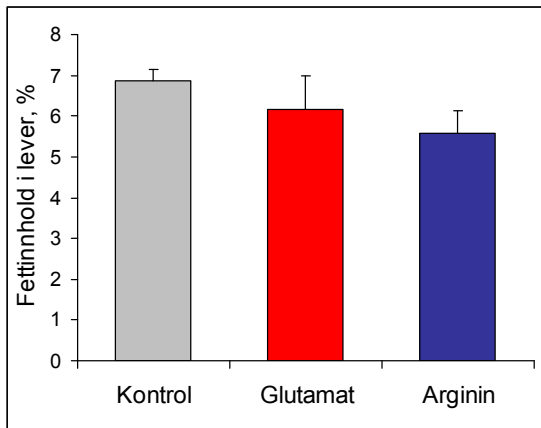
Laksen som fikk standardfôr hadde høyest fettinnhold i leveren. Hos mennesker omtales forhøyet fettinnhold i lever ofte som *NASH* – "*nonalcoholic steatohepatitis*".

Fettlever hos menneske er ofte assosiert med:

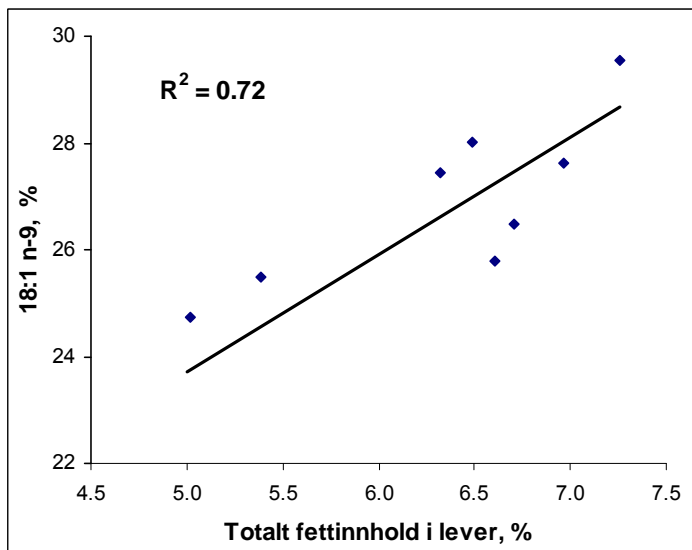
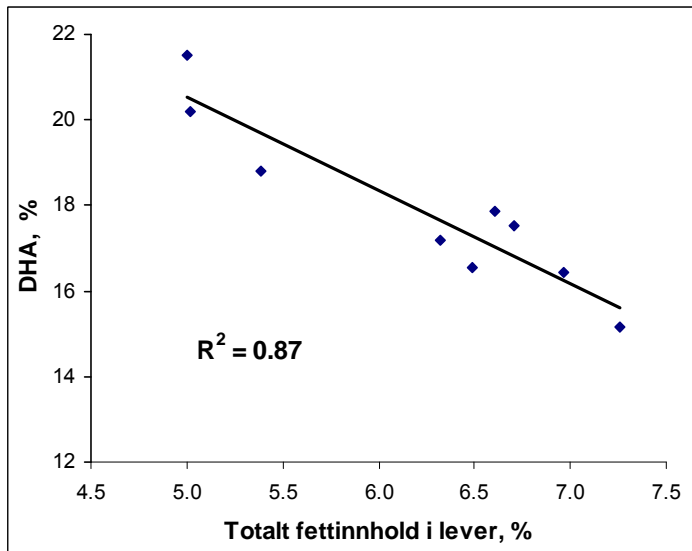
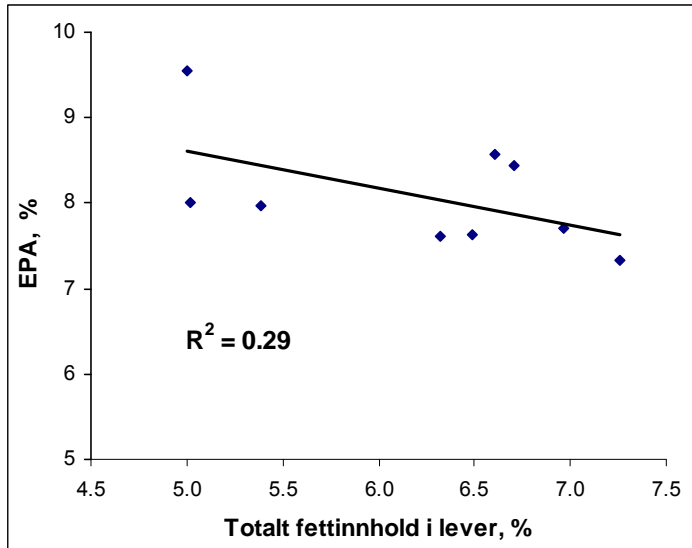
- Overvekt
- Metabolsk syndrom
- Proteinkalori-underernæring
- Insulinresistenssyndrom
- Forstyrret jernomsetning
- Redusert glukosetoleranse
- Nedsatt funksjon av mitokondrier

I den senere tid har man vært opptatt av en biokjemisk prosess hvor oksygen omdannes til forbindelser som kan ødelegge vev i en prosess kalt oksidativt stress. Oksidativt stress kan føre til dannelse av forbindelser som kan gi leverskader. Generelt vil utvikling av *NASH* fettlever først skje ved opphopning av fett (triglyserider) i levercellene. Deretter vil oksidativt stress føre til betennelsestilstander, celledskader og fibrose.

Opphopning av fett i leveren fører sannsynligvis til at økt sårbarhet for oksidativt stress. Aminosyren alanin har i flere tilfeller vist seg å ha en beskyttende effekt mot slike avvik. Årsaken er at alanin bidrar til å opprettholde/ gjenopprette ATP innholdet i leveren. Hos mennesker har også nivå av antioksidanter (for eksempel glutathion peroksidase som dannes fra glutamat), vist seg å sammenfalle med redusert omfang av leverskader. Denne studien viste at glutamat og særlig arginin ga redusert fettakkumulering i leveren og samtidig også mindre grad av betennelse/fibrose (Figur 16). Som forventet fant vi økt mengde av fettsyren 18:1n-9 i kontrollfisken (lagerfett) og lavere innhold av DHA (i stor grad membranfett). Sammenhengen mellom totalt fett i lever og relativt nivå av 18:1n-9 og DHA er vist i Figur 17.



Figur 17. Fettinnhold i lever og relativt innhold av fettsyrene 18:1 n-9 og DHA.



Figur 18. Sammenheng mellom total fettinnhold i lever og relativ mengde av EPA, DHA og fettsyren 18:1n-9

4.7 Histopatologiske undersøkelser

Laks ble tatt ut til histopatologiske undersøkelser i desember og i mai. Vev som ble undersøkt i desember var: muskel, gjeller, tarm og lever. Vev som ble undersøkt i mai var: hjerte, milt, tarm, lever, hodenyre og midtnyre. Resultatene fra undersøkelsene er vist i tabell 8 og tabell 9, samt i Figur 19 og 20.

Resultatene fra de histopatologiske undersøkelsene viste at laksen i forsøket hadde en relativ høy grad av avvik i muskel, lever, tarm og hjerte, men det var kun muskeldegenerasjoner som viste signifikant variasjon mellom fôrgruppene, med lavest frekvens av avvik for laksen som fikk argininfôret. Det var likevel noen ikke signifikante tendenser som bør påpekes. Både i desember og mai var graden av leverbetennelse/fibrose høyest for laksen som fikk standardfôret men graden av levervakuolisering var ikke høyere. Laksen som fikk glutamattfôret hadde lavest grad av degenerasjoner i tarm og hjertet. Det ble ikke funnet avvik i miltet eller nyre og graden av degenerasjoner i gjeller var minimal.

Tabell 8. Histopatologiske endringer vurdert av ulike vev av laksen tatt ut til analyse i desember 2009. Degenerasjon av vev i muskel og betennelsestilstander i gjeller, lever og tarm ble vurdert etter en skala fra 0-2 poeng: 0 poeng=ingen; 1 poeng=sparsomt; 2 poeng=moderat-betydelig.

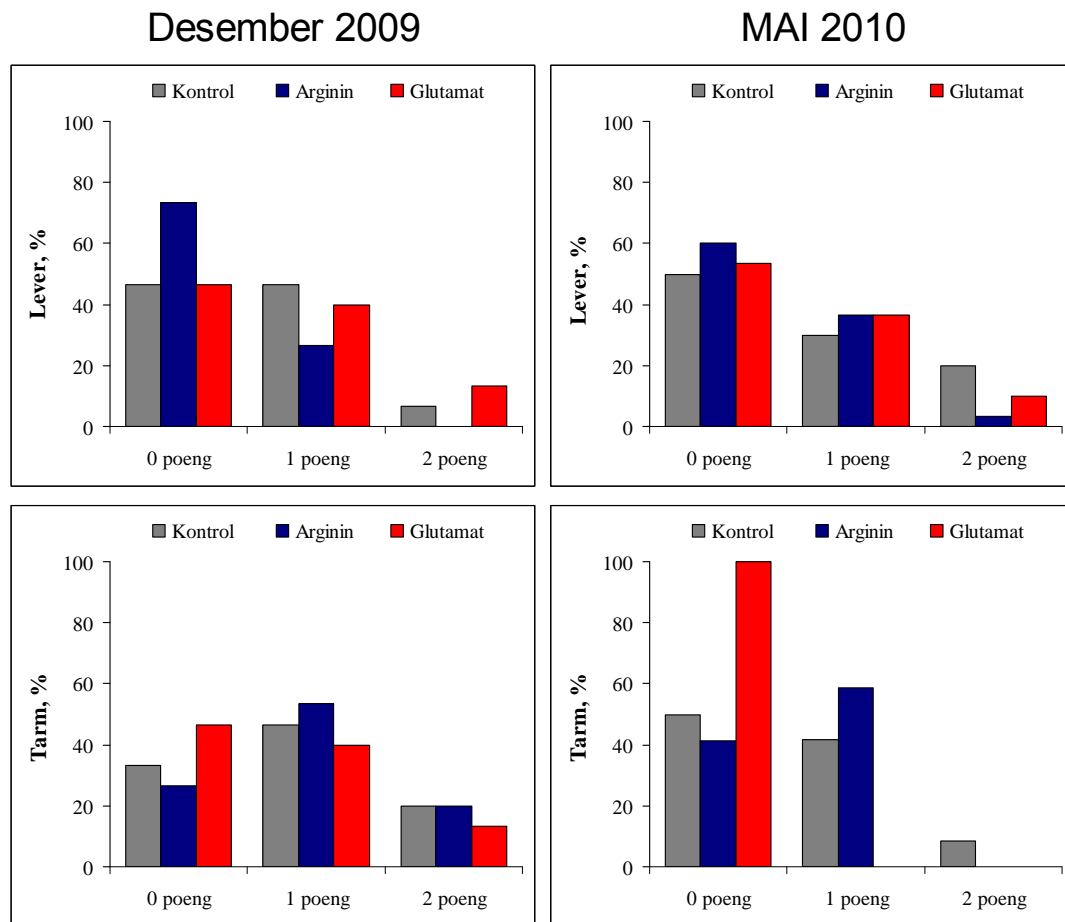
	Kontroll	Glutamat	Arginin	P-verdi
Muskel	0,5b	0,7b	0,07a	0,0008
Gjeller	0,2	0,1	0,1	0,77
Lever vakuolisering	0,1	0,2	0,4	0,47
Lever fibrose/betennelse	0,7	0,3	0,3	0,25
Tarm	0,7	0,4	0,8	0,44

Tabell 9. Histopatologiske endringer (poeng 0 – 2) vurdert av ulike vev av laksen tatt ut til analyse i mai 2010.

	Kontroll	Glutamat	Arginin	P-verdi
Hjerte	0.5	0.0	1.5	0.16
Milt	0	0	0	-
Tarm	0.7	0.0	0.6	0.19
Lever	0.8	0.6	0.4	0.25
Hodenyre	0	0	0	-
Midtnyre	0	0	0	-



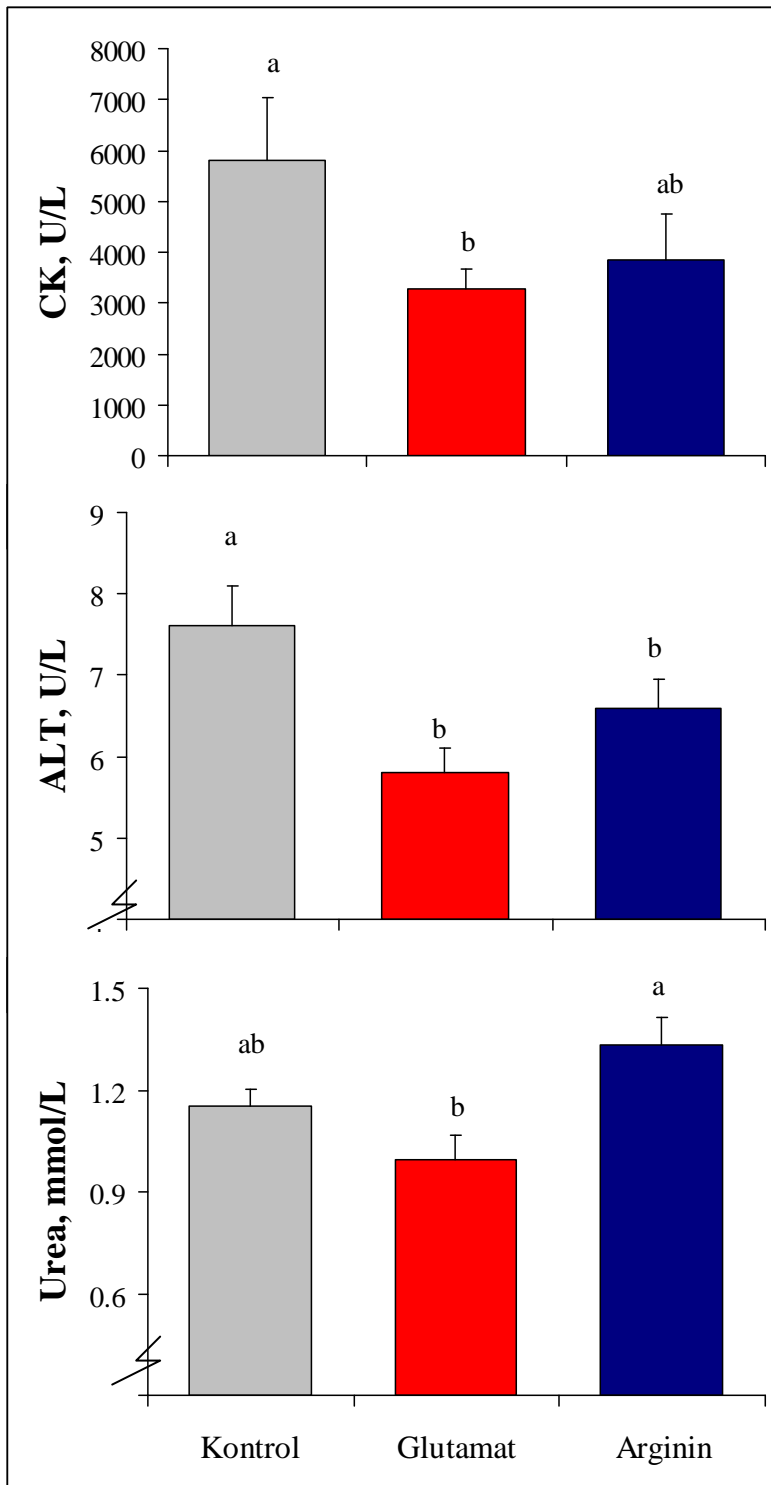
Fig. 19. Manifestasjon av avvik fra normalstruktur i tarm og lever. 1) Betennelse i tarm, H&E farging. 2) Vakuolisering av lever, H&E farging. 3) Vakuolisering i lever, PAS-farging. Legg merke til at vakuolene er PAS-negative.



Figur 20. Histopatologiske avvik i lever og tarm vurdert etter en skala fra 0-2 poeng: 0 poeng=ingen; 1 poeng = sparsomt; 2 poeng = moderat-betydelig.

4.8 Plasmaanalyser

Det var ikke forventet å finne så tydelige forskjeller mellom fôrbehandlingene for enzymene alanin aminotransferase (ALT) og kreatin kinase (CK). Nivået av CK og ALT var høyest i kontrollgruppen og lavest i glutamatgruppen. ALT er mye brukt som indikator på leverproblemer, men forhøyede verdier av ALT hos pattedyr kan også være sammenfallende med skader/problemer med hjertet eller muskelsvakhet som kan skyldes at muskelfibrene (muskelcellene) ikke fungerer optimalt (for eksempel myopathy). ALT kan også øke ved fysiske anstrengelser, og vi har tidligere sett at ekstra tilsetning av glutamat og arginin i fôret forbedrer evnen til å takle stress. CK, er et viktig enzym i energiomsetningen i kroppens muskler. Normalt finnes det i lav konsentrasjon i blodet, men stiger ved muskelskade (for eksempel myopati). Produkter fra metabolismen av arginin er ornitin og urea. Derfor var det forventet å finne forhøyede nivåer av urea i laksen som fikk argininfôret. Resultater fra plasmaanalysene er vist i Figur 21 nedenfor.



Figur 21. Enzymene kreatin kinase (CK), alanin aminotransferase (ALT) og urea i plasma i laks tatt ut til analyse mai 2010. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller mellom fôrgruppene.

4.9 Histologi av skjelettmuskel

Sentralt plasserte cellekjerner. Hos modne muskelfibre vil cellekjernene normalt være plassert i periferien av fibrene. Når cellekjernene beveger seg mer sentralt inn i fibrene er dette en unormal tilstand. I flere tidligere histologiske undersøkelser av laksemuskel har vi observert muskelfibre hvor cellekjernene er sentralt plassert. Mens forekomsten av disse sentralt plasserte cellekjernene er lav internt i muskelfiberbuntene, så er graden av disse langs bindevevet svært variabel. Dette ble også observert i disse prøvene, men det var ingen statistiske sammenhenger mellom disse funnene og tekstur eller fôr.

Oppløste muskelfibre. I dette forsøket ble det observert muskelfibre under oppløsning både langs bindevevet og sentralt i muskelfiberbuntene hos henholdsvis 29 og 13 av fiskene, men ingen statistiske sammenhenger ble funnet i forhold til tekstur eller fôr.

Muskelfibre med betennelsesceller. Hos 7 av fiskene ble det observert muskelfibre under oppløsning som inneholdt betennelsesceller (sannsynligvis makrofager), noe som kan være et tegn på nekrose. Igjen var det ingen trend mellom disse observasjonene og tekstur eller fôr.

Proteinmasser mellom muskelfibrene. I normal laksemuskel ligger muskelfibrene tett pakket, uten andre komponenter mellom fibrene. Hos 17 av 45 laks ble det observert proteinmasser mellom muskelfibrene. Statistisk analyse viste signifikant effekt av fôr på denne observasjonen, med en økt forekomst av disse proteinmassene i laksen som fikk fôr tilsatt arginin. Det var spesielt to av de tre merdene som fikk fôr tilsatt arginin skilte seg ut med høy forekomst av slike proteinmasser (merd 8 og 11). For å bestemme hva slags proteiner det er snakk om og hvor de eventuelt kommer fra vil det trenge videre undersøkelser.

Nydannelse av muskelfibre. Hos fisk er det vanlig at muskelen vokser både ved at muskelfibrene øker i tykkelse og lengde og ved dannelse av nye muskelfibre. Hos alle fiskene i forsøket ble det observert nydannelse av muskelfibre, men det er vanskelig å gjøre en objektiv vurdering av frekvensen av disse små fibrene. Et alternativ vil være å gjøre en mer kvantitativ analyse av dette i tillegg til fiberstørrelse ved hjelp av bildeanalyseverktøy.

Konklusjon, muskelhistologi i mai 2010

- Fisk som fikk fôr tilsatt arginin hadde en signifikant høyere forekomst av proteinmasser mellom muskelfibrene.
- Det ble ikke funnet signifikante sammenheng mellom histologiske observasjoner i muskel ved uttaket i mai og tekstur.

4.10 Frie aminosyrer i muskel og lever

Muskel

Som forventet hadde laksen som fikk argininfôret en høyere konsentrasjon av fritt arginin i filetmuskelen (Tabell 10). Videre var innholdet av fritt serin og histidin høyest i laksen som fikk glutamatfôret. Ingen av de andre aminosyrene var signifikant forskjellige mellom fôrgruppene. Innholdet av fritt glutamat i muskelen var ikke høyere i laksen som fikk glutamatfôret. Konsentrasjon av nitrogene metabolitter viste signifikante forskjeller mellom fôrbehandlingene (Tabell 11). Konsentrasjonen av urea og ornitin var signifikant høyere i laksen som fikk argininfôret sammenlignet med laksen som fikk glutamatfôret. Anserin nivået var imidlertid lavest i arginingruppen (Table 2). Ingen av de andre metabolittene varierte signifikant mellom fôrgruppene. Et høyere innhold av histidin og anserin ansees som positivt da disse kan knyttes opp mot bufferkapasitet i muskelen og derav også stabiliteten.

Tabell 10. Frie aminosyrer ($\mu\text{mol}/100\text{g}$ våtvekt) i hvit filetmuskel (gjennomsnitt \pm SE)

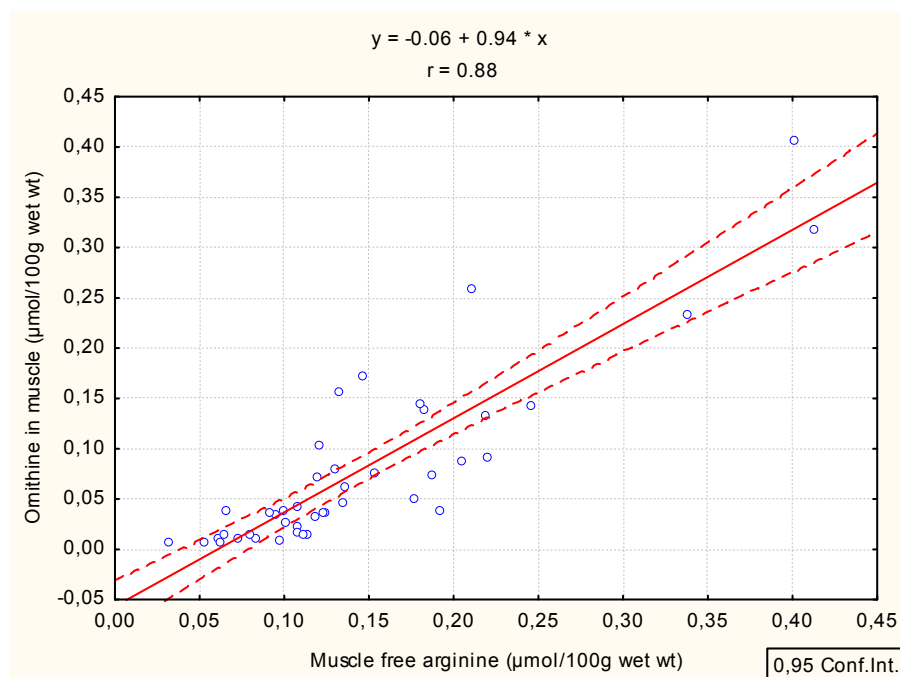
	Control	Glutamat	Arginin	P-verdi
Aspargin	13 \pm 0.6	14 \pm 0.1	11 \pm 0.1	0.51
Hydroksyprolin	48\pm4	43\pm4	57\pm4	0.06
Threonin	70 \pm 4	70 \pm 4	61 \pm 4	0.17
Serin	47\pm3a	48\pm2a	37\pm2b	0.008
Glutamat	91 \pm 3	91 \pm 2	92 \pm 2	0.93
Glutamin	45 \pm 4	40 \pm 4	47 \pm 2	0.38
Prolin	9 \pm 1	9 \pm 1	9 \pm 1	0.90
Glysin	314 \pm 15	321 \pm 11	325 \pm 13	0.87
Alananin	328 \pm 12	342 \pm 11	355 \pm 10	0.25
Valin	41 \pm 2	42 \pm 2	41 \pm 2	0.75
Metionin	11 \pm 1	14 \pm 1	10 \pm 1	0.33
Ileosin	13 \pm 0.4	11 \pm 0.5	14 \pm 0.4	0.09
Leusin	34 \pm 2	34 \pm 2	30 \pm 2	0.95
Tyrosin	30 \pm 1	29 \pm 1	29 \pm 1	0.95
Phenylalanin	13 \pm 1	12 \pm 1	12 \pm 1	0.48
Lysin	59 \pm 5	61 \pm 7	80 \pm 8	0.51
Histidin	53\pm4a	70\pm7a	29\pm3b	0.0001
Arginin	12\pm1b	11\pm1b	20\pm3a	0.06

Samleprøver fra 5 laks per not ble analysert (tre nøter per fôrbehandling) (ANOVA, Tukey)

Tabell 11. Nitrogen-metabolitter ($\mu\text{mol}/100\text{g}$ våtvekt) i filetmuskel

	Control	Glutamat	Arginine	P-verdi
Phospho-Serin	0.1 \pm 0.04	0.1 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01	0.99
Taurin	74 \pm 4	74 \pm 3	68 \pm 3	0.30
Phosphoetanolamine	7 \pm 0.4	6 \pm 0.4	6 \pm 0.3	0.11
Urea	53\pm4b	51\pm3b	65\pm3a	0.004
β -Ala	52 \pm 5	60 \pm 6	71 \pm 7	0.08
Etanolamine	3 \pm 0.4	3 \pm 0.3	3 \pm 0.2	0.37
Ammonia	461 \pm 11	460 \pm 12	436 \pm 11	0.23
Ornitin	6\pm1ab	4\pm1b	15\pm3a	0.02
1-CH ₃ -His	6 \pm 0.5	4 \pm 0.4	5 \pm 0.4	0.13
Anserin	1420\pm22ab	1450\pm18a	1359\pm23b	0.014
Carnosine	13 \pm 2	9 \pm 1	8 \pm 2	0.14

Values are mean \pm SE, N= 3 (3*5=15/treatment), ANOVA followed by Tukey



Figur 22. Sammenheng mellom fritt arginin og ornitin i muskel

Lever

Det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom fôrgruppene for frie aminosyrer i lever eller nitrogenene metabolitter. Det var likevel noen interessante tendenser. Totale nivået av frie aminosyrer var høyest for laksen som fikk glutamatfôret. Nivået av threonin var 14% høyere i glutamatfôret sammenlignet med kontrollfôret mens alanin, aspargin og metionin nivået var hhv 6%, 10% og 11% høyere. Threonin er viktig for proteinbalansen i kroppen, for dannelsen av bindevev og sammen med aminosyrene aspargin og metionin hemmes fettakkumulering i lever. Betydningen av alanin er nevnt allerede (punkt 4.6).

Tabell 12. Frie aminosyrer ($\mu\text{mol}/100\text{g}$ våtvekt) i lever (gjennomsnitt \pm SE)

	Kontroll	Glutamat	Arginin	P-verdi
Aspargin	2.37 \pm 0.14	2.62 \pm 0.49	2.59 \pm 0.48	0.88
Hydroksyprolin	0.08 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.43
Threonin	2.9 \pm 0.18	3.31 \pm 0.60	3.06 \pm 0.53	0.82
Serin	3.7 \pm 0.12	3.85 \pm 0.69	3.87 \pm 0.57	0.95
Aspargin	0.13 \pm 0.02	0.16 \pm 0.07	0.08 \pm 0.05	0.64
Glutamat	9.26 \pm 0.07	9.52 \pm 0.15	9.48 \pm 0.38	0.57
Glutamin	7.68 \pm 0.45	7.72 \pm 0.85	7.04 \pm 0.69	0.79
Prolin	2.66 \pm 0.21	3.20 \pm 0.94	3.08 \pm 0.90	0.85
Glysin	3.92 \pm 0.06	4.12 \pm 0.45	4.06 \pm 0.37	0.90
Alanin	6.74 \pm 0.14	7.12 \pm 0.58	7.07 \pm 0.67	0.82
Valin	3.43 \pm 0.25	3.92 \pm 0.95	3.78 \pm 0.93	0.89
Metionin	2.04 \pm 0.15	2.26 \pm 0.50	2.17 \pm 0.56	0.93
Ileosin	1.82 \pm 0.20	2.23 \pm 0.63	2.00 \pm 0.63	0.84
Leusin	4.73 \pm 0.35	5.23 \pm 1.10	5.01 \pm 1.20	0.92
Tyrosin	1.53 \pm 0.13	1.76 \pm 0.41	1.66 \pm 0.41	0.87
Fenylalanin	1.83 \pm 0.19	2.13 \pm 0.61	2.02 \pm 0.69	0.90
Lysin	3.43 \pm 0.20	3.72 \pm 0.71	3.65 \pm 0.73	0.92
Histidin	1.08 \pm 0.1	1.25 \pm 0.30	1.15 \pm 0.29	0.88
Arginin	2.35 \pm 0.17	2.70 \pm 0.67	2.53 \pm 0.81	0.90
Cystein	0.31 \pm 0.05	0.30 \pm 0.05	0.32 \pm 0.01	0.98
Tryptofan	0.26 \pm 0.04	0.31 \pm 0.11	0.30 \pm 0.12	0.91

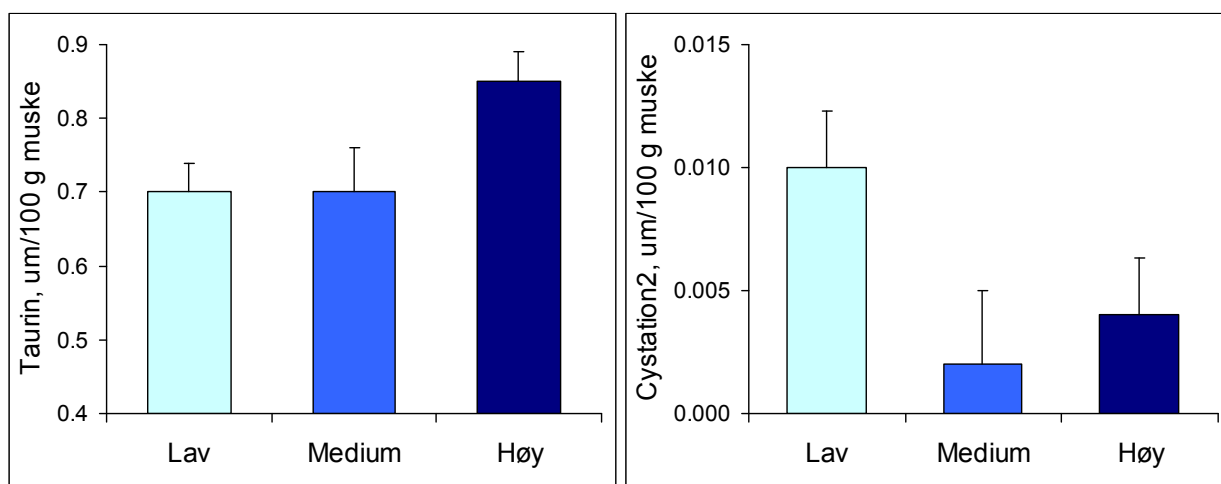
Laks fra tre nøter per behandling (5 laks per not) (ANOVA, Tukey)

Tabell 13. Nitrogen-metabolitter ($\mu\text{mol}/100\text{g}$ våtvekt) i lever.

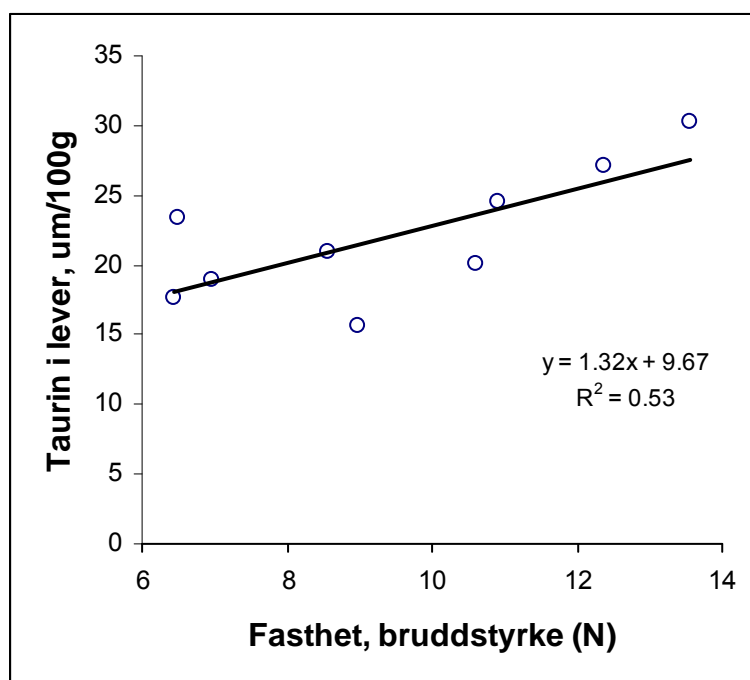
	Kontroll	Glutamat	Arginin	P-verdi
Phospho-Serine	0.17 \pm 0.14	0.03 \pm 0.00	0.08 \pm 0.04	0.58
Taurin	20.8 \pm 1.32	19.5 \pm 0.49	20.2 \pm 3	0.61
Phosphoetanolamine	0.29 \pm 0.00	0.31 \pm 0.02	0.35 \pm 0.05	0.46
Urea	1.51 \pm 0.07	1.63 \pm 0.19	1.78 \pm 0.06	0.46
Etanolamine	0.42 \pm 0.03	0.44 \pm 0.3	0.48 \pm 0.08	0.69
Ammonia	4.39 \pm 0.13	4.60 \pm 0.40	4.52 \pm 0.39	0.89
Ornithine	0.44 \pm 0.06	0.55 \pm 0.16	0.53 \pm 0.04	0.76
Anserine	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	0.90
Carnosine	0.34 \pm 0.03	0.36 \pm 0.08	0.31 \pm 0.12	0.93
Citrullin	0.16 \pm 0.03	0.18 \pm 0.07	0.15 \pm 0.09	0.93
L-alfa-Amino-adipic Acid	0.19 \pm 0.02	0.27 \pm 0.09	0.20 \pm 0.02	0.59
L-alfa-Amino-n- butyric Acid	0.21 \pm 0.02	0.20 \pm 0.04	0.17 \pm 0.04	0.81
Cystathion	0.32 \pm 0.04	0.30 \pm 0.64	0.30 \pm 0.6	0.98

Laks fra tre nøter per behandling (5 laks per not) (ANOVA, Tukey)

Når laksen ble inndelt i tre grupper med henholdsvis bløt, middels og fast tekstur (uavhengig av fôr), var det en tydelig sammenheng mellom fast tekstur og nivå av taurin og av cystation2 i muskelen. Taurin nivået var høyere i den faste muskelen, mens sammenhengen var omvendt for cystation2. Det var også en sammenheng mellom taurinnivået i lever og fasthet i fileten. Blant andre frie aminosyrer og nitrogenmetabolitter i lever som varierte mellom laks med bløt og hard tekstur var fritt asparagin (0,098 vs. 0.24) og citrullin (0,11 vs 0,21).



Figur 23. Sammenheng mellom fasthetsmålinger i laksemuskel (hvh lav, medium og høy fasthet) og nivå av henholdsvis taurin og cystation i muskel. Resultatene er gitt for hele fiskematerialet, uavhengig av forbehandling.



Figur 24. Sammenheng mellom fasthet i rå laksemuskel og taurin innhold i lever.

4.11 Metabolisk profil, HR NMR

Det var ønskelig å identifisere metabolittene glutamat (Glu) og arginin (Arg) i ¹H NMR spekterene og å kvantifisere disse. Videre var ønsket å se om den totale metabolittprofilen varierte mellom fôrbehandlingene og mellom bløt og hard muskel generelt.

For ekstraktene fra de ulike muskelprøvene fra fisk gitt samme fôr kunne det sees forskjeller i spekterne. Dette er som forventet, pga de individuelle forskjeller man finner i fisk. Det ble gjort en kvantifisering av glutamatinholdet ut fra syv av NMR-spektrene av muskelekstraktene (se prinsipp i Figur 22).

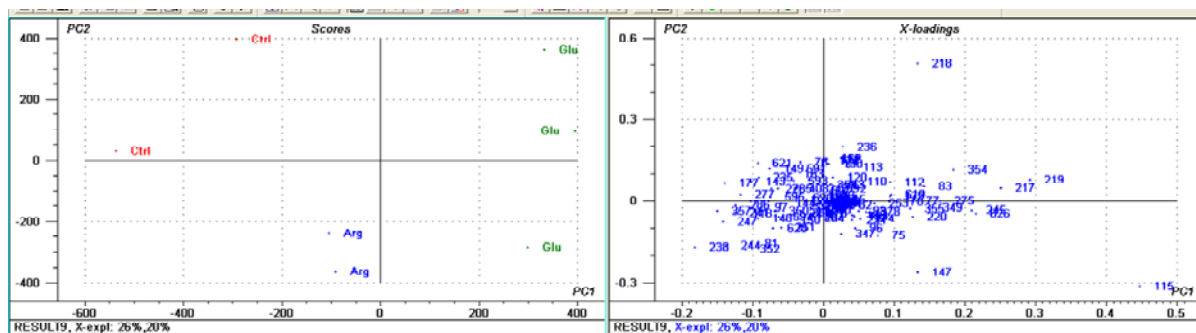
Identifisering og kvantifisering av metabolitter.

Totalt 28 metabolitter ble detektert: acetate, alanin, ATP/ADP/AMP (overlapper til en viss grad), anserin, arginin, ascorbat, betaine, carnosin, citrullin, creatin, glukose, glutamat, glutamin, glysin, histidin, isoleucin, lactat, leusin, lysin, propionate, succinat, taurin, trimethylamin, valin, xanthin, β-alanin. Det er mulig å detektere/ kvantifisere flere forbindelser, om man vet hva man skal lete etter (profilen inneholder flere hundre forbindelser).

NMR spekterene for parallelle prøver fra samme fisk var relativt like, mens for ekstrakter fra muskelprøver fra fisk gitt samme fôr kunne det sees forskjeller i intensiteter fra ulike forbindelser. Dette er som forventet, pga av de individuelle forskjeller man finner i fisk. Innholdet av glutamat i muskelprøvene viste ikke forskjeller mellom fôrgruppene. Arginin ble også forsøkt kvantifisert, men pga lav konsentrasjon kreves mer arbeid for nøyaktig kvantifisering, da topper fra lysin overlapper noen steder. Ekstraksjonsmetoden i dette forsøket er valgt utifra at den gir bra reproducerbarhet ved multivariat behandling av data, og da er det den relative sammensetningen som blir utslagsgivende, ikke absoluttinnhold.

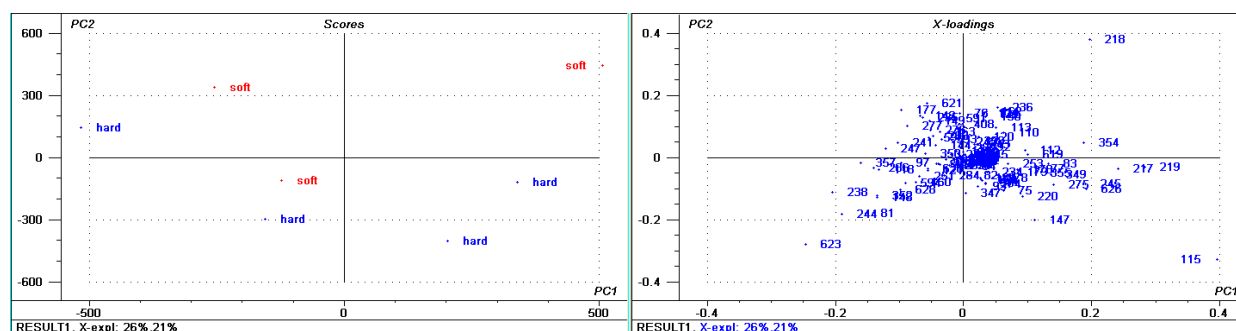
Multivariat analyse

Prinsipalkomponent-analyse (PCA) ble utført for å se om metabolske profilen varierte i forhold til 1) fôrsammensetning og/eller 2) variasjon i fasthet (bløt vs. hard). Metabolittprofilen var ganske forskjellig for de ulike fôrgruppene selv om èn bør ta i betraktning at det er relativt få prøver i forsøksoppsettet. Fra PCA score plottet fremgår at muskelprøvene fra laksen som fikk glutamat fôret skiller seg vesentlig fra laksen som fikk arginin eller kontrollfôret, selv om variasjonen innen fôrgruppe var relativt stor.



Figur 25. PCA scores- and loadings plot for de 7 prøvene. Variabler; ppm verdier fra ca 4-0 ppm. Figuren viser at spesielt glutamattføret var ulik sammenlignet med standardføret

Nivå av stoffskifteprodukter var noe ulik for har og bløt muskel. Ytterligere analyser kan avdekke hvilke stoffskifteprodukter som har størst betydning.



Figur 26. PCA scores-and loadings plot for de 7 prøvene, nå med gruppering i forhold til soft / hard. Figuren viser at bløt og har laks har ulik metabolittprofil selv om det er en viss grad av overlapp.

Oppsummering

Totalt ble ca 28 forbindelser identifisert. De individuelle forskjellene mellom var betydelige, men analysen viste en gruppering etter før og etter om fisken var bløt eller hard. Det synes også å være forskjeller innen samme førgruppe. For eksempel hadde glutamatlaksen med et høyt nivå av glutamat i muskelen en fastere tekstur enn den med et lavere nivå i muskelen. Disse analysene viser at det er mulig å identifisere stoffskifteprodukter på en relativt rask måte ved å benytte NMR metode, men det er nødvendig å optimalisere metoden for å få sikrere verdier.

Tabell 14. Totalt innhold av glutamat og arginin i muskelprøvene [mg / g våtvekt muskel].

	Kontroll	Glutamat	Arginin
Glutamat	0.17	0.15	0.15
Arginin	Ikke detektert	0.06	0.06

4.12 Microarray/ Mikromatrise

Analysene ble utført i mai. Ettersom det ikke var forskjell i tekstur mellom kontroll og arginingruppen, valgte vi å fokusere på glutamatfisken. Det ble derved gjennomført analyser der fokuset var å sammenligne genuttrykk for fisken som hadde fått glutamatfôr vs. kontrollfôr. En oppsummering av resultatene er som følger:

LAVERE GENUTTRYKK i glutamatgruppen

- Muskelnedbrytende enzym
- Immungener/celledød
- Markør relatert til fettomsetning
- Markører knyttet til cellulært stress/oksidativt stress
- Glykolyse
- Sitronsyresyklus
- Uttrykk kollagen (generelt)
- Aminosyrene alanin, aspartat, arginin, prolin, cystein, fenylalanin, tyrosin,
- tryptofan
- Glutathion omsetning

HØYERE GENUTTRYKK i glutamatgruppen

- Uttrykk av muskelproteiner
- Uttrykk av muskelregulatoriske faktorer
- Bindevevskomponent (ikke kollagen)

5. Oppsummering, effekt av fôr

Effekt	Glutamat	Arginin
	Sammenlignet med kontroll	
<i>Fastere tekstur september</i>	X	X
<i>Fastere tekstur desember</i>	X	X
<i>Fastere tekstur mai</i>	X	
<i>Mørkere/jevne farge i ryggen i desember</i>	X	X
<i>Blekere filet i mai</i>		X
<i>Raskere tilvekst (september-desember)</i>		X
<i>Mindre grad av organsammenvoksninger</i>	X	X
<i>Mindre og magrere lever</i>	X	X
<i>Høyere nivå av omega-3 fettsyren DHA i lever</i>	X	X
<i>Lavere grad av leverbetennelse/fibrose</i>	X	X
<i>Større milt</i>		X
<i>Lavere grad av degenerasjoner i tarm og hjerte</i>	X	
<i>Lavere grad av muskeldegenerasjoner i desember</i>		X
<i>Lavere nivå av CK i plasma (markør for muskelnedbrytning)</i>	X	X
<i>Lavere nivå av ALAT i plasma (markør for leverproblemer)</i>	X	X
<i>Høyere nivå av urea i plasma</i>		X
<i>Høyere muskel pH</i>	X	X
<i>Mer fritt histidin i muskel</i>	X	
<i>Lavere nivå av histidin i muskel</i>		X
<i>Mer anserin i muskel</i>	X	
<i>Lavere serin</i>		X
<i>Lavere ornitin i muskel</i>	X	
<i>Mer fritt hydroksyprolin i muskel</i>		X
<i>Mer fritt arginin i muskel</i>		X
<i>Vesentlig ulik profil av stoffskifteprodukter (NMR analyse)</i>	X	
<i>Resultater fra microarray/ Genuttrykk (kun sammenlignet glutamat vs kontroll)</i>		
<i>Glutamat ⇒ Endret energiomsetning</i>		
<i>Glutamat ⇒ Friskere vev</i>		
<i>Glutamat ⇒ Bedre antioksidativ status</i>		
<i>Glutamat ⇒ høyere "proteinproduksjon"</i>		

Konklusjon

- Fôret synes å spille en viktigere rolle for teksturen i laksefilet enn tidligere antatt
- Det er mulig å forbedre teksturen i laksefilet ved å justere aminosyreprofilen i fôret
- Aminosyrene glutamat og arginin ga helsemessige gevinster, og disse sammenfalt med fastere tekstur
- Ekstra tilsetning av aminosyrene glutamat og arginin forbedret laksens evne til å takle stress i forbindelse med slakteprosessen
- Gevinst ved tilskudd av aminosyrer kan variere gjennom året og optimalt nivå, varighet og alternative forklarer bør vurderes.

Resultatene fra denne studien har bidratt med ny kunnskap som kan benyttes i arbeidet med å forbedre filetkvaliteten så vel som helsestatus hos oppdrettslaks. Funnene gir dessuten grunnlag for å se nærmere på etablerte behovstall for innsatsfaktorer i fôr til dagens oppdrettslaks.

6. Noen sentrale kilder

- Bancroft, J.D. Gamble, M. (2002). *Theory and Practice of of Histological Techniques*, 5. ed. Churchill Livingstone, London.
- Bundy JG, Papp B et al. (2007) Evaluation of predicted network modules in yeast metabolism using NMR-based metabolite profiling. *Genome Research* 17: 510-519.
- Cohen SA & Strydom DJ (1988). Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatisation. *Anal. Biochem.*, 174, 1-16
- Dabrowski, K., Terjesen, B. F., Zhang, Y., Phang, J. and Lee, K.-J. (2005). A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in early life of vertebrates. *Journal of Experimental Biology* 208, 2885-2894.
- Folkestad, A., Wold, J.P., Rørvik, K-A., Tschudi, J., Haugholt, K.H., Kolstad, K., Mørkøre, T., (2008). Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 280, 129-135
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J. and Wu, G. (2009). New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids* 37, 43-53.
- Meijer, A. J. (2003). Amino acids as regulators and components of nonproteinogenic pathways. *Journal of Nutrition* 133, 2057S–2062S.
- Mørkøre, T., Austreng, E. (2004). Temporal changes in fillet texture, gaping, composition and copper status of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L) fed moist feed or extruded dry feed. *Aquaculture* 230, 439-455.
- Mørkøre, T., T., Mazo, P.I., Tahirovic, V., Einen, O. (2008). Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality of Atlantic salmon (*Salmon salar* L). *Aquaculture* 277, 231-238.
- Sato K, Ohashi C, Ohtsuki K, Kawabata M. (1991). Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J. agric. Food Chem.*, 39, 1222-1225
- Terjesen, B. F. (2008). Nitrogen excretion. In *Fish Larval Physiology*, eds. R. Finn and B. Kapoor), pp. 263-302. New York: Science Publishers.
- Tietz, N.W. (1995). *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3. ed. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Wu H, Southam AD, Hines A, Viant MR (2008). High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry* 15: 372.