

Effekt av fôr, temperatur og stress på pigmentering i laks

Faglig sluttrapport

Trine Ytrestøl, Alexander Dikiy, Elena Shumilina, Grete Bæverfjord, Aleksei Krasnov, Allessandra Ciampa, Bjarne Hatlen, Tone-Kari Østby, Marta Bou Mira, Jens-Erik Dessen, Kjell-Arne Rørvik og Bente Ruyter





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 370 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<p><i>Tittel:</i> Effekt av fôr, temperatur og stress på pigmentering i laks Faglig sluttrapport</p>	<p>ISBN 978-82-8296-603-0 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Effect of feed, temperature and stress on pigmentation in salmon</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 24/2019</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Trine Ytrestøy, Alexander Dikiy (NTNU), Elena Shumulina (NTNU), Grete Bæverfjord, Aleksei Krasnov, Allessandra Ciampa (NTNU), Bjarne Hatlen, Tone-Kari Østby, Marta Bou Mira, Jens-Erik Dessen, Kjell-Arne Rørvik og Bente Ruyter</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> Åpen</p> <p><i>Dato:</i> 27. juni 2019</p>
<p><i>Avdeling:</i> Ernæring og forteknologi</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 70</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF#901271</p>
<p><i>Stikkord:</i> Atlantisk laks, pigmentering, fôrsammensetning, stress, temperatur, metabolisme</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 11763</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>I dette prosjektet ble betydningen av fôrets sammensetning, produksjonsmiljø og stress for pigmentering av laksefilet undersøkt. Det ble testet marine og lavmarine fôr på 6 og 12°C. En ingrediens som det er mindre av i plantebaserte dietter enn i marine fôr er fosfolipid. Det ble funnet en klar positiv effekt av innhold av fosfolipid i fôret på fordøyelighet av astaxanthin og fett. Det var imidlertid ikke en klar sammenheng mellom fordøyelighet og retensjon av astaxanthin i fileten. Dette skyldtes at fôrets sammensetning påvirket metabolismen av det absorberte astaxanthinet i ulik grad.</p> <p>Det ble isolert leverceller fra laks fôret 4 ulike fôr. Cellene ble inkubert med ¹³C-astaxanthin for å studere metabolsk omsetning av astaxanthin in vitro ved bruk av NMR. Det var en lavere omsetning av astaxanthin til reduktive metabolitter og retinol i fisk som hadde fått en marin diett sammenlignet med en lavmarin diett. Tilsats av stresshormonet cortisol i mediet førte også til økt omsetning av astaxanthin i cellene fra den lavmarine dietten, mens det ikke hadde effekt i den marine dietten. Også in vivo var det indikasjoner på at stress førte til økt metabolisme av astaxanthin i både muskel og lever, mens det var mindre effekter i tarm.</p> <p>Pigmentering ble også fulgt under kommersielle betingelser i Nofimas FoU-konsesjoner. Her var det hyppige avlusinger og også utbrudd av PD. Under slike krevende forhold for fisken ga 50 ppm astaxanthin i fôret en astaxanthin-konsentrasjon på 4,8 mg/kg i muskel mens en økning til 70 ppm i fôret ga en konsentrasjon i muskel på 5,6 mg/kg. Pigmentering ble også fulgt i et stor-skala forsøk med ulike produksjonsprotokoller og størrelse ved utsett. Generelt hadde størrelse ved utsett størst betydning, men også lysregime i settefiskperioden påvirket omsetning av astaxanthin. Laks satt ut ved 600 g hadde innledningsvis i sjøfasen lavere astaxanthin-konsentrasjon og høyere konsentrasjon av metabolitten idoxanthin i muskel, men ved slakt (4-4,8 kg) var det ingen signifikante forskjeller i muskel-astaxanthin, til tross for at 600 g utsett hadde lavere vekt ved slakt.</p> <p>Samlet sett har prosjektet dokumentert at fôrets sammensetning har betydning for opptak og omsetning av astaxanthin i laks, og at det er et samspill med temperatur. Det er vist at fosfolipid er viktig for opptak av astaxanthin i tarmen. Prosjektet har også vist at stress øker omsetning av astaxanthin. Videre er det vist at under kommersielle betingelser med mye avlusing av fisken ser det ikke ut til å være tilstrekkelig med 50 ppm astaxanthin i fôret for å nå 6 mg/kg i NQC ved slakt.</p>	

Forord

Prosjektet er finansiert av FHF og har hatt et budsjett på 7 145 000 NOK.

Prosjektet har hatt samarbeid og bidrag fra andre prosjekt og forskningsaktiviteter i Nofima. Nofimas FoU-konsesjoner har bidratt med prøvemateriale, og en arbeidspakke var knyttet opp mot et forsøk utført i regi av CtrIAQUA SFI og delfinansiert av FHF prosjekt nr. 901293 «Hva betyr fremtidens produksjonsstrategier for ytelse, helse og velferd i sjøfasen (BENCHMARK)». Videre har det vært samarbeid med Nofimas interne strategiske satsing (SIS Balance) som er finansiert av Forskningsrådet.

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Hovedfunn	4
3	Innledning	5
3.1	Faglig bakgrunn	5
3.2	Prosjektets omfang og organisering.....	7
4	Problemstilling og formål	8
4.1	Prosjektets effektmål/nytteverdi	8
4.2	Prosjektets resultatmål.....	8
5	Prosjektgjennomføring	9
5.1	Delmål 1: Effekt av fôrkomponenter og temperatur på fordøyelighet og retensjon av astaxanthin	9
5.1.1	Fôrsammensetning.....	9
5.1.2	Fiskeforsøket	11
5.1.3	Analyser	11
5.1.4	Beregninger og statistikk	12
5.2	Delmål 2: Utnyttelse av astaxanthin i en kommersiell produksjonssyklus	12
5.3	Delmål 3: Effekt av ulike smoltproduksjonsprotokoller på utnyttelse av astaxanthin	16
5.3.1	RAS landbasert fase	17
5.3.2	Sjøfase	17
5.4	Delmål 4: Studier av opptak og metabolisme av astaxanthin ved bruk av ¹³ C NMR-spektroskopi	18
5.4.1	Forsøk med hepatocytter	18
5.4.2	Forsøk med enterocytter.....	19
5.4.3	<i>In vivo</i> stress forsøk med laks.....	19
6	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	20
6.1	Delmål 1: Effekt av fôrkomponenter og temperatur på fordøyelighet og retensjon av astaxanthin	20
6.1.1	Fôrinntak og vekst	20
6.1.2	Akkumulering av fett i tarm, lever og innvoller.....	22
6.1.3	Lipidsammensetning og % fett i lever	24
6.1.4	Indikatorer på lever og muskelfunksjon (ALAT, ASAT, CK).....	25
6.1.5	Fordøyelighet av astaxanthin og fett.....	26
6.1.6	Innhold av astaxanthin og metabolitter i ulike vev	27
6.1.7	Genuttrykk i lever, muskel og tarm	33
6.2	Delmål 2: Utnyttelse av astaxanthin i en kommersiell produksjonssyklus	40
6.2.1	Resultater	40
6.3	Delmål 3: Effekt av ulike smoltproduksjonsprotokoller på utnyttelse av astaxanthin	45
6.3.1	Vekst.....	45
6.3.2	Pigmentering	46

6.4	Delmål 4: Studier av opptak og metabolisme av astaxanthin ved bruk av ¹³ C NMR spektroskopi	53
7	Sammenstilling og diskusjon av sentrale resultater	60
7.1	Forklarings-modeller og hypoteser for virkningsmekanismer for resultater fra fôringsforsøk	60
7.2	Produksjonsprotokoller og FoU konsesjoner	65
8	Videre arbeid	66
9	Referanser	67
10	Leveranser	70

1 Sammendrag

I dette prosjektet ble betydningen av fôrets sammensetning, ulike produksjonsprotokoller og stress for pigmentering av laksefilet undersøkt. De siste årene har det ifølge flere oppdrettere blitt vanskeligere å oppnå tilstrekkelig rødfarge på laksefileten. Selv om mengden av astaxanthin i fôret til laks har økt de siste årene, har ikke dette løst problemet med lite farge på fileten. Årsakene til redusert innfarging er sannsynligvis sammensatte, de kan skyldes både redusert opptak i tarmen og økt omsetning og nedbrytning av astaxanthin, som også er en effektiv antioksidant. Stress i forbindelse med håndtering ved avlusing av laksen kan føre til mer nedbrytning av astaxanthin når behovet for antioksidanter hos laksen øker.

Ulike komponenter i fôret kan også påvirke retensjonen av astaxanthin. Fôret til laksen har gjennomgått store endringer de siste årene. Bruken av fiskemel og -olje er stadig blitt redusert, og nedgangen i marine råvarer fører blant annet til at det blir mindre fosfolipider, kolesterol, vitamin A og omega-3-fettsyrer, og mer fiber i laksefôret. Alle disse faktorene kan påvirke utnyttelsen av astaxanthin i laks. I prosjektet ble det testet i alt 8 ulike dietter, som varierte i innhold av marine råvarer. Det ble tilsatt ekstra fosfolipid til fôr med lavt innhold av fiskemel og -olje for å se hvordan to ulike fosfolipidkilder (soyalecitin, soy lec, og marine fosfolipider, MPL) påvirket pigmentering. Det ble også fôret en diett uten astaxanthin for å se på eventuelle effekter av astaxanthin på fysiologi og genuttrykk. Resultatene fra forsøket viste en negativ effekt av lavt innhold av marint protein i fôret på fôrinntak, vekst og fordøyelighet av fett og astaxanthin. Tilsats av fosfolipid normaliserte fordøyeligheten av astaxanthin og fett, og det ble funnet en klar positiv sammenheng mellom innhold av fosfolipid i fôret og fordøyelighet av astaxanthin og fett. Midt-tarmen hos laks fôret en lavmarin diett hadde unormalt mange vakuoler, et tegn på akkumulering av fett i tarm-veggen. Laks som fikk et fôr med fiskemel som proteinkilde hadde normal tarm. Tilsats av marine fosfolipider (MPL) til den lavmarine dietten normaliserte tarmen, og hindret hypervakuolisering, mens tilsetning av soy lec kun resulterte i en delvis normalisering av antall vakuoler i tarmen. Gener relatert til dannelse av apolipoproteiner og lipoproteiner var nedregulert i tarmen til fisk fôret lavmarine dietter. Kun tilsetning av MPL normaliserte uttrykket av disse genene. Mangelfull lipoproteindannelse for transport av fett ut av tarmen kan være en mulig årsak til akkumulering av fett i tarmen.

Å erstatte fiskeolje med rapsolje hadde ikke negativ effekt på fôrinntak, vekst eller fordøyelighet av astaxanthin og fett. Planteolje i fôret førte til redusert retensjon av astaxanthin på 6°C men hadde ikke effekt på 12°C.

Det var imidlertid ikke en klar sammenheng mellom fordøyelighet av astaxanthin og retensjon av astaxanthin i filet fordi fôrets sammensetning påvirket metabolismen av astaxanthin. Dietter med fiskemel og tilsats av marint fosfolipid (MPL) førte til at mer astaxanthin ble omsatt metabolsk til idoxanthin, og ga en lavere retensjon av astaxanthin i muskel sammenlignet med laks fôret en lavmarin diett tilsatt Soylec. Generelt var genuttrykket mest sammenfallende for laks fôret en marin diett og en lavmarin diett tilsatt MPL. Sammenlignet med et marint fôr var det redusert uttrykk av gener involvert i syntese og transport av retinoider i tarmen hos laks fôret med lavmarine dietter. Når vi tilsatte MPL til den lavmarine dietten, ble denne effekten opphevet. Dette kan tyde på en høyere metabolsk omsetning av astaxanthin i tarm hos laks fôret dietter med fiskemel og MPL.

Det ble isolert leverceller fra laks fôret fire av diettene: Marin, lavmarin, lavmarin + MPL og lavmarin + DHA. Cellene ble inkubert med ¹³C-astaxanthin for å studere metabolsk omsetning av astaxanthin *in vitro* ved bruk av Nukleær Magnetisk Resonans (NMR). Det var en lavere omsetning av astaxanthin til reductive metabolitter og retinol i den marine dietten og den lavmarine dietten tilsatt MPL sammenlignet med den lavmarine dietten med og uten tilsatt DHA. Forskjellene i omsetning i leverceller kan skyldes forskjeller i vitamin A-nivå i diettene. Det var høyest i den marine dietten og lavest i den lavmarine + DHA. Tilsats av cortisol i mediet ga økt omsetning av astaxanthin i cellene fra den lavmarine dietten, mens det ikke hadde effekt i den marine dietten. Det ble også funnet effekter av stress *in vivo* på omsetning av astaxanthin. NMR-spektrene fra stresset og ustresset laks ga indikasjoner på at stress førte til økt metabolisme av astaxanthin i både muskel og lever, mens det var mindre effekter i tarm.

Ett delmål i prosjektet var å undersøke hvordan ulike produksjonsmetoder for settefisk påvirker pigmentering. I et forsøk i regi av SFlet CtrlAQUA ble settefisk av ulik størrelse (200 og 600 g) produsert i RAS ved enten en tradisjonell smoltifisering (6 uker på kort dag, deretter 24 timer lys frem til utsett) eller uten lysstyring (24 timer lys helt frem til utsett i sjø). Dette ble kombinert med bruk av brakkvann (12 ppt) eller ferskvann frem til utsett. Som kontroll ble det brukt en 100 g smolt produsert på tradisjonelt vis (lysstyring + ferskvann til utsett). Alle behandlinger fikk til enhver tid samme kommersielle fôr som inneholdt 70 ppm astaxanthin fram til pelttestørrelse 4 mm, og deretter 50 ppm. Resultatene fra denne arbeidspakken viser at fisk som gikk lenger i RAS hadde høyere innhold av idoxanthin enn fisk satt ut ved 100 og 200 g. Denne forskjellen var signifikant helt frem til slaktestørrelse. Fisk som hadde gått på 24 timer lys hadde også høyere innhold av idoxanthin enn fisk som var lysstyrt. Fisk satt ut ved 600 g var tidlig i sjøfasen (mai) dårligere pigmentert sammenlignet med laks satt ut ved 100 og 200 g, selv om de på dette tidspunkt hadde høyest kroppsvekt. Ved slakt i november var astaxanthin-innholdet i NQC mellom 5,5-6,1 mg/kg (sluttvekt mellom 4-4,8 kg) og det var ikke lenger noen signifikante forskjeller i astaxanthin i NQC mellom utsett eller som følge av produksjonsprotokoll i RAS.

I Nofimas FoU konsesjon ved Vikane i Hordaland ble det fulgt opp pigmentering i laks fôret med ulikt nivå av fett og protein i fôret. To størrelsesgrupper med 0-åring (150 og 180g) ble satt i sjø i september 2017. Begge gruppene fikk samme kommersielle fôr frem til februar 2018. Da ble testgruppen satt på et fôr med et økt innhold av protein og mindre fett sammenliknet med kontrollgruppen, som fikk et fôr som tilsvarer et standard kommersielt fôr. Frem til juli 2018 fikk begge behandlinger fôr med 50 mg astaxanthin per kg, men fra juli og til januar 2019 fikk testgruppen et fôr 70 mg astaxanthin per kg. Fisken fikk påvist PD i april 2018 og det ble registrert dødelighet relatert til PD frem til september 2018.

Det var også store problem med lus ved denne lokaliteten. I løpet av forsøksperioden ble det utført totalt 11 ikke-medikamentelle avlusninger, 2 med ferskvann og resterende med thermolicer. Det var ingen signifikante forskjeller mellom forsøk- og kontrollgruppen i astaxanthin-nivå frem til siste uttak i januar 2019. Da ble det funnet en tendens til høyere astaxanthin-nivå i testgruppen sammenliknet med kontrollgruppen ($p = 0,06$). Testgruppen hadde numerisk sett et høyere astaxanthin-nivå ved uttaket både i august og november 2018. Dette skyldes trolig økningen i astaxanthin-nivået i fôret til testgruppen fra 50 til 70 mg/kg i juli 2018. Vi kan se at den store smolten innen både test og kontrollgruppen hadde en nedgang i astaxanthin-nivå fra mars til mai 2018. Dette var etter at PD ble påvist og kan være relatert til dette. Ved avslutning lå astaxanthin nivåene i NQC på mellom 4,8-5,6 mg/kg, ved en vekt på 4,1-4,3 kg.

Samlet sett har prosjektet dokumentert at fôrets sammensetning har betydning for opptak og omsetning av astaxanthin i laks, og at det er et samspill med temperatur. Det er vist at fosfolipid er viktig for opptak av astaxanthin i tarmen. Prosjektet har også vist at stress øker omsetning av astaxanthin. Videre er det vist at under kommersielle betingelser med mye avlusing av fisken ser det ikke ut til å være tilstrekkelig med 50 ppm astaxanthin i fôret for å nå 6 mg/kg i NQC ved slakt.

2 Hovedfunn

- Tilstrekkelig med fosfolipider i lav-marine dietter var essensielt for å sikre god vekst og normal fordøyelighet av fett og astaxanthin. Kun fosfolipider av marint oppgav (MPL) ga normal fettakkumulering i tarm som for fiskemelsdietter. Imidlertid ga dietter med fiskemel eller MPL lavere innhold av astaxanthin i muskel sammenlignet med laks føret dietter med planteprotein.
- Ved 6°C var det en positiv effekt av fiskeolje på astaxanthin-konsentrasjon i muskel. Det var også bedre retensjon av astaxanthin på 6°C enn på 12°C.
- Stress-hormonet cortisol førte til en økning i metabolsk omsetning av astaxanthin i leverceller. *In vivo* førte stress til en endring i karotenoid-profil i muskel og lever, som tyder på økt metabolisme av astaxanthin.
- Astaxanthin har ulik funksjonell betydning i muskel, tarm og lever hos laks føret en lavmarin diett. Mangel på astaxanthin førte til immunosupresjon i tarm og økt steroidsyntese i lever, mens det i muskel var økt uttrykk av gener relatert til stress og inflammasjon.
- Laks som fikk ulike lysregimer i settefiskperioden og ble satt ut i sjø ved ulike størrelser hadde tidlig i sjøfasen ulike pigmenteringer, men ved slakt var det ikke lenger effekter av produksjonsregime.
- For laks under kommersielle betingelser med mange avlusinger og sykdomsutbrudd synes ikke 50 ppm astaxanthin i føret å være tilstrekkelig til å nå 6 mg astaxanthin per kg i filet.

3 Innledning

3.1 Faglig bakgrunn

Selv om bruken av pigment i fôret har økt de siste årene så har det blitt vanskeligere å oppnå tilstrekkelig pigmentering av fileten. Med andre ord har retensjonen, den andelen av tildelt pigment som blir avleiret i fileten, gått ned. Per i dag finnes det begrenset kunnskap om hvordan samspill mellom komponenter i fôr, stress og ytre miljø påvirker opptak og omsetning av astaxanthin og fargen på fileten. Det vi vet er at forholdsvis lite av pigmentet i fôret finnes igjen i muskelen. Retensjonen av astaxanthin i laksemuskelen er på ca 10 % i løpet av en produksjonssyklus, selv om det er betydelig variasjon gjennom året. Det er begrenset kunnskap om hvordan ulike påkjenninger som sykdomsutbrudd og avlusing påvirker omsetning av astaxanthin. Hyppig håndtering har ført til at laksen utsettes for mer stress enn tidligere. Nye produksjonsformer, som produksjon av større postsmolt i landbaserte resirkuleringsanlegg (RAS) med høy tetthet, kan også potensielt medføre større grad av stress for fisken. Astaxanthin er en svært potent antioksidant som oksideres av reaktive oksygenforbindelser til fargeløse forbindelser. Astaxanthin er vist å ha en rekke positive effekter på helse og immunsystem i mennesker og pattedyr ved å redusere effekter av oksidativt stress, blant annet i lever (Sila m. fl. 2015), men det er foreløpig lite dokumentasjon i fisk.

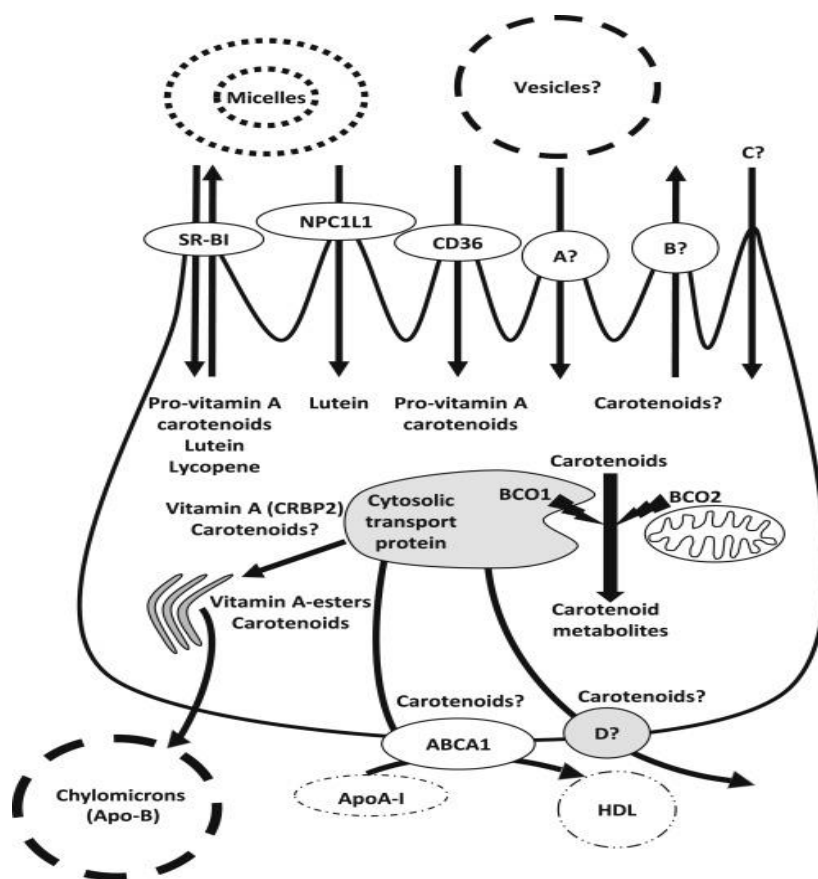
Opptak og transport av karotenoider er komplekse prosesser, og biotilgjengelighet av karotenoider varierer med en rekke faktorer. Komponenter i dietten, som innhold av fett og fiber, og også genetisk variasjon, særlig i metabolsk omsetning, påvirker biotilgjengelighet (Desmarchelier og Borel, 2017). I tarmen må karotenoider løses i miceller for å tas opp i tarmcellene (Figur 1). Fordøyeligheten av astaxanthin varierer i laks, men er lav sammenlignet med fordøyeligheten av lipid. Ofte er fordøyeligheten av astaxanthin mellom 40-60 %, og den avtar med økende fôrintak og ved lave temperaturer (Ytrestøyl m. fl. 2005). Gjennom en produksjonssyklus vil fordøyeligheten derfor variere med temperatur og veksthastighet, men kan også påvirkes av fôrets sammensetning. Mengden planteråvarer i fôret er nå på over 70 % (Ytrestøyl m. fl. 2015), og innholdet av omega-3-fettsyrer, kolesterol og fosfolipid i fôret er redusert i forhold til for få år siden, mens mengden plantekomponenter som fiber og fytosteroler har økt. Dette kan påvirke dannelsen av miceller i tarmen, som er nødvendig for opptak av astaxanthin (Parker, 1996, Borel m. fl. 1996, Clark m. fl. 2000). Tilsetning av kolesterol og gallesyrer i fôr er for eksempel vist å ha en positiv effekt på opptak av astaxanthin i blod, mens soyalecithin hadde en negativ effekt (Olsen m. fl. 2005). I andre studier er imidlertid tilsats av ekstra soyalecithin til et høy-fiskemelsfôr til ørret (58 % fiskemel, PL konsentrasjoner på 2, 6,3 og 10,5 %) er vist å gi økt mengde canthaxanthin i blod, men ikke høyere innhold i muskel (Salvador m. fl. 2009). Enkelte andre studier indikerer imidlertid en positiv effekt av høyere doser av soya lecithin på muskel pigmentering (Abat m. fl. 2002, Choubert m. fl. 2006).

Problemene man nå opplever med å oppnå tilstrekkelig pigmentering kan skyldes redusert absorpsjon over tarmen (fordøyelighet) og/eller økt metabolsk omsetning av astaxanthin som følge av endret fôrsammensetning og økt stress i forbindelse med mer omfattende og hyppige håndtering av fisken. Langkjedete, flerumettede n-3-fettsyrer (n-3 PUFAs og HUFAs) har positiv effekt på pigmentering i laksefisk (Hardy m. fl. 1987, Bjerkeng m. fl. 1997, 1999, Regost m. fl. 2004, Rørå m. fl. 2005, a,b, Waagbø m. fl. 1993, 2013). Nylig fant vi redusert innfarging og økt omsetning av astaxanthin i laks fôret med lave nivå av EPA og DHA, men de biologiske mekanismene er ikke kjent. Studier på pattedyr viser at det er en synergistisk effekt av astaxanthin og omega-3-fettsyrer som virker via aktivering av såkalte

antioksidant-responsive elementer (ARE) (Saw m. fl. 2013, Sahin m. fl. 2014 a). Det er også vist at det er en sammenheng mellom regulering av karotenoidmetabolisme og lipidmetabolisme i pattedyr (Bonet m. fl. 2012, Jia m. fl. 2012, Kim m. fl. 2015).

Grunnleggende kunnskap om opptaksmekanismer i tarm og hvilke gener som er involvert i omsetning og opptak er nødvendig for å kunne forutse effekter av stress, miljø og førsammensetning på pigmentering, slik at man kan oppnå mer forutsigbar kvalitet. Mekanismene for opptak og transport av astaxanthin i tarmceller hos laks er ikke kjent, men det antas at de samme reseptorer som er vist å være involvert i opptak av karotenoider i pattedyr (Figur 1) også er viktige i fisk. Metabolisme i tarmen og i lever kan påvirke hvor mye astaxanthin som deponeres i muskel. Astaxanthin blir omdannet til vitamin A i fisk, inklusiv laks (Schiedt m. fl. 1985, Guillou m. fl. 1989, Moren m.fl. 2002), hvor mye som metaboliseres til vitamin A er sannsynligvis avhengig av vitamin A-status i laksen. Omsetning av astaxanthin og betakaroten til vitamin A er katalysert av enzymet betakaroten oxygenase 1 (BMCO1) og muligens også av betakaroten oxygenase 2 (BCO2), (Lobo m. fl. 2012). Genuttrykket til BMCO1 er vist å påvirkes av flere faktorer, som smoltifisering, fôr og virusinfeksjoner (upubliserte data, Nofima), men det er behov for mer systematisk kunnskap om det er en sammenheng mellom uttrykk av BCO1 og pigmentering, og om stress eller komponenter i fôret kan påvirke genuttrykket av BMCO1 og BCO2.

Astaxanthin omsettes også reduktivt til ulike metabolitter i laks. Første trinn i denne omsetningen er idoxanthin (Schiedt m. fl.1989). Mengden idoxanthin i laksen avtar med økende fiskestørrelse, men øker igjen når laksen blir kjønnsmoden (Aas m. fl. 1997, Ytrestøyl m. fl. 2008). Stress er også foreslått å øke mengden idoxanthin i laksemuskel (Schiedt m. fl. 1989), men det er ikke vist en klar sammenheng mellom stress og metabolsk omsetning av astaxanthin.



Figur 1 Proteiner involvert i opptak, transport, metabolisme og sekresjon av karotenoider i tarmceller hos pattedyr. SR-BI = scavenger receptor class B member I, CD36 = CD36 molecule, NPC1L1 = NPC1 like intracellular cholesterol transporter. BCO1 = betakaroten oxygenase 1, BCO2 = betakaroten oxygenase 2, CRBP2 = cellular retinol binding protein II, transporter ATP binding cassette A1 (ABCA1), (Kilde: Desmarchelier og Borel, 2017).

3.2 Prosjektets omfang og organisering

Prosjektet har hatt en økonomisk ramme på 7 145 000 NOK, hvorav 6 065 000 til Nofima og 1 080 000 til NTNU.

Prosjektet har vært utført i samarbeid mellom Nofima og NTNU. Nofima har vært prosjektleder. Prosjektleder har vært Dr. Trine Ytrestøyl, øvrige involverte fra Nofima har vært Dr. Bente Ruyter, Dr. Aleksei Krasnov, Dr. Tone-Kari Østbye, Dr. Marta Bou Mira, Dr. Grete Bæverfjord, Dr. Bjarne Hatlen, Dr. Kjell-Arne Rørvik, og Dr. Jens-Erik Dessen. Fra NTNU har Dr. Alexander Dikiy vært prosjektansvarlig, og Dr. Elena Shumilina og Dr. Alessandra Ciampa vært prosjektdeltakere.

Prosjektet har hatt samarbeid med Nofimas FoU-konsesjoner (Delmål 2) og prosjektet Benchmark som er en del av SFlet CtrlAQUA som ledes av Nofima (Delmål 3). Det har også vært koordinering med en strategisk satsing (SIS) i Nofima (SIS Balance, nfr prosjektnummer) på Delmål 1 og 4.

Referansegruppen for prosjektet har bestått av:

Olai Einen (Cermaq), Arne Schei (Lerøy), Ragna Heggebø (MOWI). Bente Torstensen representerte MOWI inntil hun ble ansatt i Nofima.

4 Problemstilling og formål

4.1 Prosjektets effektmål/nytteverdi

Det har de seinere år blitt stadig vanskeligere å oppnå en tilstrekkelig god innfarging i filet i norsk lakseproduksjon. Mens det for ca. 10 år siden var tilstrekkelig med 30-40 mg astaxanthin i sjøfasen for å oppnå muskelkonsentrasjoner opp mot 7 mg/kg er det i dag vanskelig å oppnå 6 mg/kg i muskel selv med en økning av astaxanthin-konsentrasjonen i fôret til 50-70 mg/kg. Resultatene fra dette prosjektet skulle bidra til å finne forklaringsmodeller på denne endringen i effektivitet i pigmentering av laksefilet og peke på mulige løsninger for å redusere problemene med dårlig farge på filet for dermed å bidra til å oppnå mer stabil og forutsigbar pigmentering i oppdrettslaks.

4.2 Prosjektets resultatmål

Hovedmål

Identifisere mulige samspill mellom komponenter i fôr og ytre faktorer (temperatur, stress) og bestemme betydningen av disse for fordøyelighet og omsetning av astaxanthin.

Delmål 1: Undersøke effekt av fôrsammensetning, og temperatur på fordøyelighet og omsetning av astaxanthin.

Delmål 2: Kartlegge utnyttelse av astaxanthin i en kommersiell produksjonssyklus med fokus på perioder når fisken utsettes for stress.

Delmål 3: Undersøke eventuelle effekter av ulike smoltproduksjonsprotokoller på utnyttelse av astaxanthin.

Delmål 4: Gjøre studier av mekanismer for opptak og omsetning av astaxanthin ved bruk av ¹³C NMR spektroskopi.

Prosjektet har dokumentert at både fôrsammensetning, temperatur og stress har betydning for utnyttelse av astaxanthin i laksen.

5 Prosjektgjennomføring

5.1 Delmål 1: Effekt av førkomponenter og temperatur på fordøyelighet og retensjon av astaxanthin

5.1.1 Førsammensetning

I denne arbeidspakken ble fordøyelighet og omsetning av astaxanthin i fôr med høyt innslag av planteråvarer slik som i dagens kommersielle fôr, sammenlignet med et marint fôr i et kontrollert karforsøk. Det ble laget fire dietter med kombinasjoner av høyt eller lavt innhold av fiskemel og fiskeolje (Diett 1-4). Dietten med lavt innhold av marine ingredienser (både fiskemel og fiskeolje) (diett 2) ble tilsatt komponenter som det er mer av i marine ingredienser; marint fosfolipid, (diett 5) og DHA (diett 6) for å teste om disse påvirker opptak og retensjon av astaxanthin. Soyalecitin ble også tilsatt den lavmarine dietten for å teste om marine fosfolipider og soyalecitin har ulik effekt på opptak og omsetning av astaxanthin (diett 7). Konsentratene av marine fosfolipider, soyalecitin, og DHA erstattet en del av fiskeoljen, og ble dosert inn slik at konsentrasjonen av fosfolipid og DHA skulle bli så lik som mulig som i den marine dietten.

En liten mengde fiskemel (7,5 %) ble beholdt i lavmarine dietter og i diett 4 for å unngå reduksjon i vekst. Diett 1 og 4 hadde identisk oljefraksjon (fiskeolje) og diett 2 og 3 hadde samme oljefraksjon (25/75 fiskeolje/rapsolje). Det ble benyttet en Nord-Atlantisk fiskeolje med 1:1 EPA:DHA (sum EPA/DHA 15.7 %). Tilsetning av en blanding i forholdet 1:3 av fiskeolje og rapsolje i vakumcoateren ga en EPA+DHA konsentrasjon på om lag 1 % i lavmarine dietter, som tilsvarte ca 3.7 % av totalt fett i dietten. Alle fôr ble tilsatt yttriumoksid som indikator for å måle fordøyelighet av astaxanthin og fett. Formulering av diettene er vist i Figur 2, mens innhold av de ulike fosfolipidklassene i diettene er vist i Figur 3. Diettene ble formulert slik at de hadde samme innhold av protein, fett og energi. Kjemisk sammensetning er oppgitt i tabell 1. Effekten av å bytte ut marin olje med planteolje og tilsvarende å bytte ut marint protein med planteprotein på retensjon og fordøyelighet ble undersøkt på to temperaturer, 6 og 12 °C. Det ble også inkludert en diett uten astaxanthin (diett 8) for å identifisere eventuelle helseeffekter av astaxanthin og for å se om enkelte gener uttrykkes forskjellig i laks fôret dietter med og uten astaxanthin. Dette ble undersøkt ved hjelp av microarray.

8 dietter ble testet i triplikat på 12 °C:

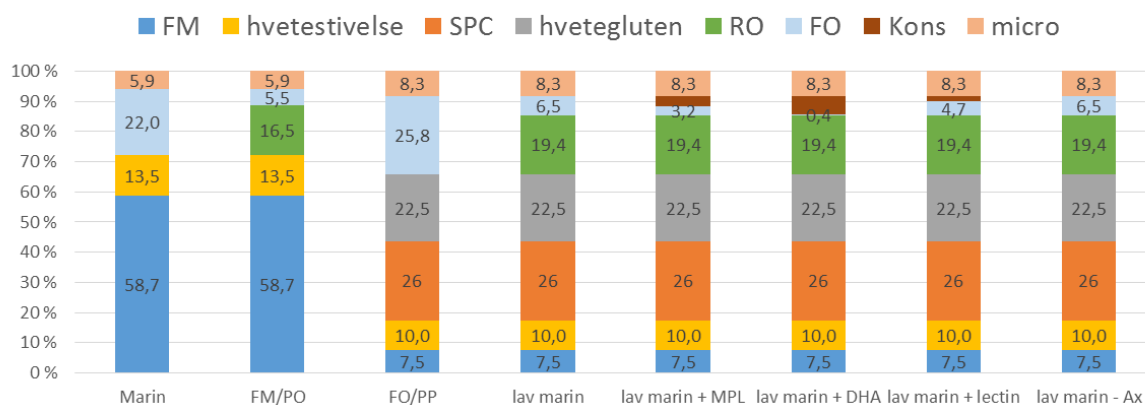
1. Marin diett, fiskemel (FM) + fiskeolje (FO)⁴
2. Lav marin diett, planteprotein (PP) + planteolje (PO)
3. Fiskemel + planteolje (FM + PO)⁴
4. Planteprotein + fiskeolje (PP + FO)⁴
5. Lav marin + marint fosfolipid (MPL)¹
6. Lav marin + DHA²
7. Lav marin + soyalecitin (soy lec)³
8. Lav marin uten astaxanthin (-Ax)

¹ doseres med marint PL opp til nivå i diett 1

² doseres med DHA opp til nivå i diett 1

³ doseres med lecitin opp til nivå på marint PL i diett 1

⁴ testes på 6 og 12°C

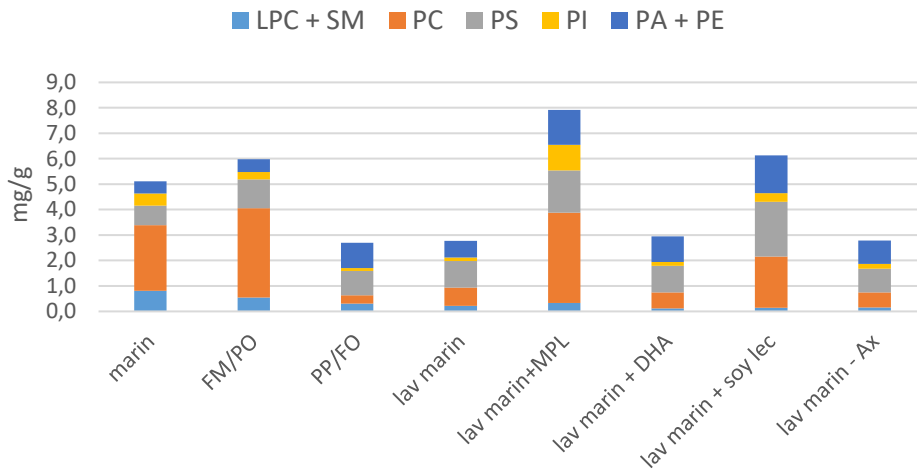


Figur 2 Formulering av de ulike diettene. Forkortelser: FM= fiskemel, SPC = Soyaproteinkonsentrat, RO= rapsolje, FO= fiskeolje, Kons= konsentrat av fosfolipid og DHA, Micro=mikroingredienser.

Tabell 1 Kjemisk sammensetning av de ulike diettene.

	marin	FM+PO	PP+FO	lav marin	lav marin + MPL	lav marin + DHA	lav marin + soya lec	lav marin - Ax
Energi (MJ/kg)	22,5	22,1	23,6	23,9	23,9	23,9	23,9	23,9
Fett (%)	26,6	25,1	26,5	26,8	26,9	26,6	26,3	26,8
Nitrogen (%)	6,7	6,8	7,0	6,9	7,0	7,0	6,9	7,0
Aske (%)	12,3	12,3	5,5	5,4	5,6	5,6	5,4	5,5
Stivelse (%)	9,0	9,1	10,5	10,5	10,2	10,0	10,3	10,5
Astaxanthin (mg/kg)	41,5	41,3	45,8	45,1	48,3	49,7	48,2	<1
Lutein (mg/kg)	<1	2,2	<1	2,6	2,8	3,0	2,8	3,1
Zeaxanthin (mg/kg)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
Sum fosfolipid (%)	0,5	0,6	0,3	0,3	0,8	0,3	0,6	0,3
Sum EPA/DHA (%)	4,1	1,7	3,5	1,1	1,2	3,5	1,2	1,1
Retinol (IU/kg)	120 000	87 300	88 500	30 900	24 700	14 500	24 100	30 900

Fosfolipidsammensetning i diettene



Figur 3 Konsentrasjon av ulike fosfolipid klasser i diettene. LPC = lysophosphatidylcholine, SM = sphingomyeline, PC = phosphatidylcholine, PS = phosphatidylserine, PI = phosphatidylinositol, PA + PE = phosphatidate + phosphatidyletanolamine.

5.1.2 Fiskeforsøket

Atlantisk laks med en startvekt på 197 g ble fordelt i 33 kar (1 m² overflate, 0,5 m³ vannvolum). Alle diettene (1-8) ble fôret til triplikate kar på 12°C i 84 dager og diett 1,3 og 4 ble fôret til triplikate kar på 6°C i 120 dager. Temperatur og oksygen ble målt daglig. Fôrintak ble målt ved å samle opp uspist pellet og beregne mengde spist fôr ved å beregne differansen mellom utfôret mengde og oppsamlet mengde på tørrstoffbasis per kar (Helland m. fl. 1996). Ved slutten av fôringsperioden ble avføring strøket av all fisk i alle kar som beskrevet av Austreng (1978). Samtidig ble 6 fisk per kar tatt ut for prøver av filet, lever, og tarm for analyse av karotenoider og genuttrykk. Prøver for histologi av lever og midt-tarm ble også tatt fra 6 fisk per kar. Leverceller ble isolert fra 4 dietter: Marin diett, lavmarin diett, lavmarin + MPL og lavmarin + DHA. Levercellene ble inkubert med ¹³C-astaxanthin for å studere metabolsk omsetning av astaxanthin i levercellene ved bruk av NMR. Dette er nærmere beskrevet i delmål 4.4. Det ble også tatt blodprøver fra fiskene som det ble isolert leverceller fra, og lipoproteiner ble separert ved ultrasentrifugering (Aas m. fl. 1999). Videre ble innholdet av astaxanthin og idoxanthin i de ulike lipoprotein-fraksjonene analysert som beskrevet i 5.1.3.

5.1.3 Analyser

Prøver av lever ble analysert for totallipid og lipidklasser (Todorčević m. fl. 2009). Fett ble ekstrahert etter en metode beskrevet av Folch m.fl., 1957. Deretter ble fettsyrene i ekstraktet trans-forestret til fettsyre metyl estere (FAME). Fettsyresammensetning ble bestemt ved bruk av Hewlett Packard 6890 gass kromatograf (GC) utstyrt med en ID-BP×70 kolonne (SGE, Melbourne, Australia; 60 m × 0.25 mm i.d., 0,25 µm film) med helium som bæregass. Temperaturprogram; 50°C i 1,2min, 50°C til 170°C med 4°C/min, til 200°C med 0.5°C/min, og til 300°C med 10°C/min. FAME ble detektert ved hjelp av en flammeionisasjons-detektor (FID) og fettsyresammensetning verifisert ved hjelp av standard 68D (Nu-Check Prep Inc). 23:0 ble benyttet som intern standard. For separering av ulike lipidklasser, ble Folch-ekstraktet (tilsatt BHT (0.7 mg/l) dampet inn under nitrogengass og re-oppløst i kloroform. Frie

fettsyrer (FFA), fosfolipider (PL), triacylglyseroler (TAG) ble separert ved hjelp av tynnskiktskromatografi (TLC) med mobilfase: petroleumeter:dietyl eter:eddiksyre (113:20:2 v/v/v). De ulike lipidklassene ble visualisert ved å dyppe platen i en kobber-18 løsningsmiddel. Flekkene som korresponderte til henholdsvis FFA, PL og TAG ble identifisert ved sammenligning med kjente standarder ved hjelp av en Bioscan AR-2000 imaging scanner (Bioscan Inc., Washington, DC, USA).

Astaxanthin og metabolitten idoxanthin ble analysert i filet fra enkeltfisk og i samleprøver av tarm og lever ved bruk av en ekstraksjonsmetode beskrevet av Bjerkeng med flere (1997). Prøvene ble analysert på HPLC på en Spherisorb Phase Sep nitril kolonne (250 mm x 4,6 mm, S5, flow 1,5 ml/min, trykk 50 kgf/cm²). Deteksjon ved VIS 470 nm. Responsfaktor for astaxanthin standard brukes til beregning av astaxanthin og idoxanthin.

Prøver av tarm, lever og muskel ble analysert med microarray. RNA ble ekstrahert med Agencourt RNAdvance Tissue kit (Beckman Coulter). Nofima's genome-wide Atlantic salmon microarray Salgeno med 44k 60-mer oligonucleotide probes ble brukt. Prøvene ble frosset i flytende nitrogen og oppbevart på -80°C til de ble analysert.

5.1.4 Beregninger og statistikk

Spesifikk vekstrate (SGR) = $(e^{(\ln W_1 - \ln W_0)/t} - 1) * 100$

Vekstfaktor (Thermal growth coefficient) (TGC) = $(W_1^{1/3} - W_0^{1/3}) * 1000 / d^\circ$

W₀ er startvekt (g), W₁ er sluttvekt (g), t er antall dager, og d[°] døgnggradsum (antall dager x gjennomsnittstemperatur).

Fôrfaktor (FCR) = fôr spist (kg)/biomasseøkning (kg)

Kondisjonsfaktor (CF) = $W \times L^{-3} \times 100$, hvor L er lengde

Hepatosomatisk indeks (HSI) = levervekt / vekt helfisk * 100;

Tilsynelatende fordøyelighet (ACD) = $100 * [1 - ((X_{\text{faeces}} / Y_{\text{faeces}}) / (X_{\text{fôr}} / Y_{\text{fôr}}))]$,

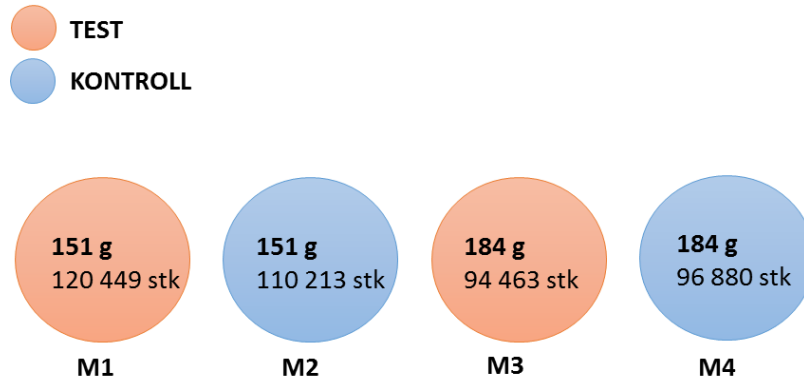
hvor X = konsentrasjonen (mg kg⁻¹) av astaxanthin/fett og Y = konsentrasjon av yttrium

Statistiske analyser av effekter av behandling på vekst (vekt, TGC, SGR), fôrinntak, FCR, ACD, karotenoid sammensetning, og organindekser ble gjort i SAS Jmp ved hjelp en to-vegs ANOVA med proteinkilde og oljekilde som faktorer. Videre ble det brukt Student's t-test for rangering av forskjeller mellom de ulike diettene/behandlingene. P - verdier < 0,05 ble regnet som statistisk signifikante, og P - verdier < 0,1 ble ansett som en tendens.

5.2 Delmål 2: Utnyttelse av astaxanthin i en kommersiell produksjonssyklus

I dette prosjektet ble utnyttelsen av astaxanthin i en kommersiell produksjonssyklus undersøkt i Nofima sine FoU-konsesjoner i Sør-Norge, lokalitet Vikane (Masfjorden, Hordaland) i samlokalisering med Blom fiskeoppdrett AS. To grupper av 0-årig smolt av ulik størrelse ble produsert av Straumsnes settefisk ved hjelp av lysstyring og satt ved sjølokaliteten den 21. september 2017. Den ene gruppen hadde en gjennomsnittsvikt ved utsett på 151 gram, mens den andre gruppen hadde en

gjennomsnittsvekt på 184 gram. Ved sjøutsett ble disse smoltgruppene delt i to og satt ut i hver sin merd (120 m omkrets, Polarcircle, AkvaGroup, Bryne), slik at 2 merder hadde smolt på 151 gram og 2 merder med smolt på 184 gram. Etter dette ble merdene delt opp i en test og en kontroll gruppe, 2 merder per gruppe/behandling, se figur 4 for forsøksoppsett.



Figur 4 Forsøksoppsett, vekt ved utsett, antall fisk og inndeling av grupper ved lokalitet Vikane med 120 m merder.

Både test- og kontrollgruppen gikk på samme kommersielle fôr-serie frem til 28. mars 2018. Etter dette fikk testgruppen et fôr med et økt innhold av protein og mindre fett sammenliknet med kontrollgruppen, som fikk et fôr som tilsvarte et normalt kommersielt fôr. De første kommersielle fôrene brukt etter sjøutsett ble produsert av Skretting, mens fôret brukt fra februar 2018 og frem til forsøkslutt (januar 2019) ble produsert av BioMar. I denne perioden ble innholdet av fett, protein og pigment i fôrene definert av Nofima. Det ble benyttet 50 mg/kg astaxanthin i fôret for både test- og kontrollgruppen fram til den 30. juli 2018. Etter dette fikk testgruppen et fôr med et astaxanthin nivå på 70 mg/kg frem til forsøkslutt, mens kontrollgruppen fortsatte på 50 mg/kg astaxanthin. Dette ble gjort på grunn av det ble observert en svak økning i pigment fra utsett til juli, og man ville da teste om det er mulig å øke pigmentnivå i muskel ved å øke astaxanthin-nivået fra 50 til 70 mg/kg.

Se tabell 2 for deklarte og kjemiske verdier av fett, protein og pigment i de ulike fôrtypene, samt tidsperioden og vektintervallet hvor de ulike fôrtypene ble benyttet. De kjemiske analysene ble utført på et tilfeldig parti av fôr ved lokaliteten innen hver pelletstørrelse og analyser hos Nofima Biolab. Tabell 3 viser vektete verdier over prosentandel av fett og protein basert på on-line NIR analyser av hver fôr-batch innen hver pelletstørrelse. Fôret ble tildelt ved hjelp av et sentralføringssystem og undervannskamera ble benytte for å vurdere appetitt og regulere utfôringen. Vanntemperatur og dødfisk ble registrert daglig, lusetelling ble utført ukentlig og fisken ble oppdrettet etter kommersielle standarder til Blom fiskeoppdrett og etter gjeldene reglement og lovverk.

Tabell 2 Deklarerte og kjemiske verdier av protein, fett og astaxanthin innholdet i kontroll- og testfôr gjennom forsøksperioden, samt tid og vektintervall hvor de ulike fôrene ble benyttet.

Vekt	Fôrgruppe	Pellet størrelse	Deklart nivå			Kjemiske analyser (Nofima Biolab)			Periode
			Protein (%)	Fett (%)	Astaxanthin (mg/kg)	Protein (%)	Fett (%)	Astaxanthin (mg/kg)	
Gram	Behandling	mm							Måned/År
150 - 300	Test og kontroll	3 mm	49	24	50	48,6	23,7	52	Aug 17 – Sep 17
300 - 600	Test og kontroll	5 mm	49	25	50	47,4	24,9	50	Sep 17 – Nov 17
600 - 900	Test og kontroll	7 mm	40	30	50	40,8	31,5	54	Nov 17 – Jan 18
900 - 1200	Test og kontroll	10 mm	37	35	50	34,6	37,2	58	Jan 18 – Mar 18
1200 – 2500	Test	10 mm	47	24	50	46,7	23,8	52	Mar 18 – Jul 18
1200 – 2500	Kontroll	10 mm	37	35	50	37,2	34,6	58	Mar 18 – Jul 18
2500 – 4000	Test	10 mm	45	30	70	44,3	30,1	68	Juli 18 – Jan 19
2500 - 4000	Kontroll	10 mm	33	38	50	34,1	37,6	61	Jul 18 – Jan 19

Tabell 3 Deklarerte og analyserte (on-line NIR-analyser hos BioMar) nivå av protein og fett innhold i kontroll- og testfôr benyttet i løpet av forsøket.

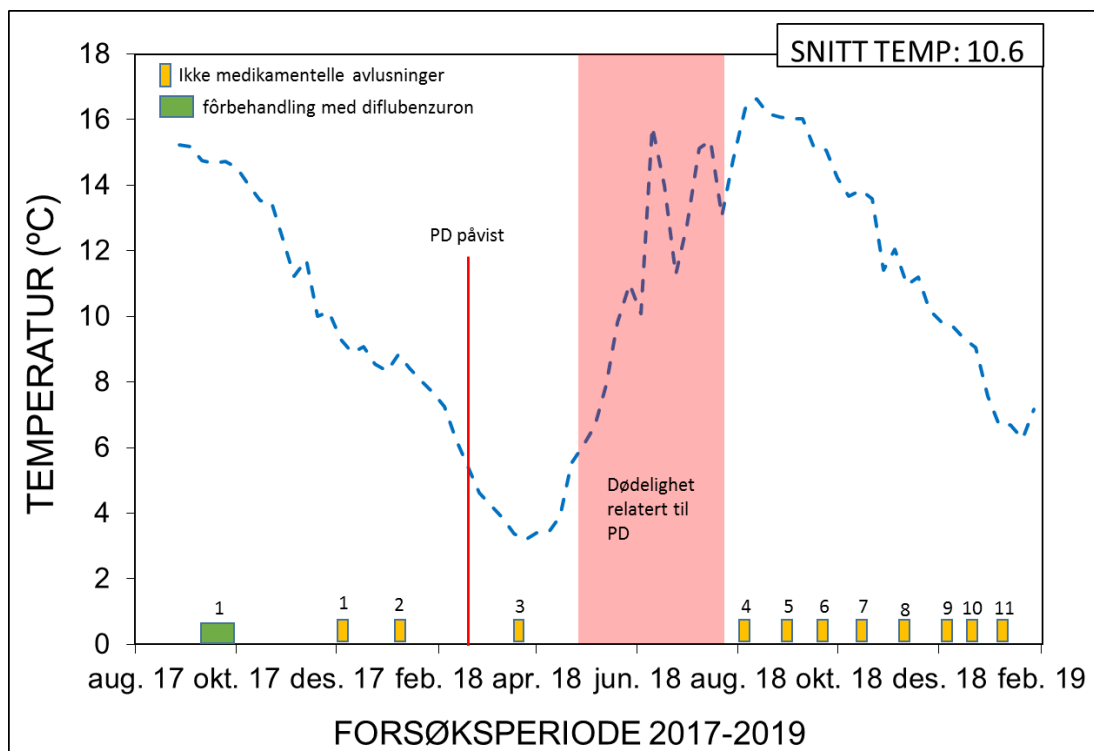
Vekt	Fôrgruppe	Pellet størrelse	Deklart nivå		Online NIR-analyser (BioMar)	
			Protein (%)	Fett (%)	Protein (%)	Fett (%)
Gram	Behandling	mm				
900 - 1200	Test og kontroll	7 mm	40	30	42,6	29,6
1200 – 2500	Test	10 mm	47	24	46,3	24,3
1200 – 2500	Kontroll	10 mm	37	35	37,6	34,4
2500 – 4000	Test	10 mm	45	30	44,7	30,3
2500 - 4000	Kontroll	10 mm	33	38	34,5	38,1

I løpet av sjøfasen ble det jevnlig tatt ut fisk for analyser av fett og pigment i muskel (NKS – Norsk Kvalitetssnitt; NS 9401), samt fett og innholdet av astaxanthin og idoxanthin i lever. Ved hvert uttak ble det registrert vekt og lengde individuelt på 100 fisk fra hver av merdene, og deretter ble 10 fisk med tilsvarende lik vekt og kondisjonsfaktor som de 100 fiskene ($\pm 10\%$) selektert og tatt ut for analyser. Dette for å sikre at man tok ut et representativt utvalg av fisk som tilsvarer gjennomsnittsvekten og kroppsformen i merden. En stor kastenot ble brukt for å fange laks fra merden, før fisken ble håvet over i et 1000 liter kar med 200 ml Benzoak vet. (ACD Pharmaceuticals AS, Leknes, Norge) og bedøvet (ca. 2-5 min) før vekt og lengde ble registret forløpende på individnivå om bord i båten ved merdkanten. Fisk som ble tatt ut til analyser ble avlivet ved et hardt slag mot hode før gjellene ble skåret over og lagt i vannbad for ut-blødning. NKS og lever ble deretter tatt ut, lagt i poser, plassert i isoporkasser med is og fraktet til laboratoriet på Ås samme dag. Leveren ble fryst ved -20, mens NKS ble lagret på is i 3 dager til den var ute av rigor (dødsstivhet), før den høyre NKS siden ble filetert og fotografert med Photofish for hurtiganalyse av fett, pigment og farge. Etter dette ble NKS koteletten fryst ved -20. Alle NKS'er og levere ble deretter sendt til Nofimas laboratorium på Sunndalsøra for kjemiske analyser av astaxanthin og idoxanthin ved hjelp av HPLC. Tabell 4 viser oversikten over dato for uttak av fisk og gjennomsnittsvekt (standardavviket er vist i parentes) på de 10 fiskene som ble tatt ut for analyser i de ulike merdene.

Tabell 4 Oversikt over dato for uttak og snittvekt og standardavviket i parentes på fisk tatt til analyse fra hver merd.

UTTAK	DATO	Test	Kontroll	Test	Kontroll
		M1	M2	M3	M4
S0	05.09.2017	190 (21)	191 (26)	233 (26)	230 (12)
S1	27.10.2017	505 (22)	504 (44)	618 (20)	617 (22)
S2	04.01.2018	999 (61)	994 (79)	1203 (29)	1169 (41)
S3	08.03.2018	1068 (76)	1066 (58)	1408 (39)	1389 (33)
S4	24.05.2018	1474 (38)	1370 (69)	1662 (45)	1722 (56)
S5	23.08.2018	2036 (57)	2271 (124)	2325 (77)	2348 (71)
S6	22.11.2018	3516 (84)	3513 (83)	3849 (92)	3774 (94)
S7	29.01.2019	4274 (157)	4206 (124)	4155 (159)	4270 (126)

Figur 5 viser vanntemperaturen gjennom sjøfasen ved lokalitet Vikane, samt antall avlusinger, tidspunkt for PD påvisning og dødelighetsperioden som var relatert til PD-utbruddet. Gjennomsnittstemperaturen var på 10.6°C med minimum i februar 2018 på 3.2 °C, og maksimum i august 2018 på 16.6°C. I oktober 2017, like etter sjøutsett, ble fisken fôret med diflubenzuron mot lakselus, og i løpet av forsøksperioden ble det utført totalt 11 ikke-medikamentelle avlusninger, to med ferskvann i brønnbåt og resterende med thermolicer.



Figur 5 Oversikt over temperatur utvikling, samt antall og type avlusninger ved lokalitet Vikane gjennom forsøksperioden.

5.3 Delmål 3: Effekt av ulike smoltproduksjonsprotokoller på utnyttelse av astaxanthin

I et prosjekt i SFI'et CtrlAQUA er ulike smoltproduksjonsregimer sammenlignet i et forsøk ved Nofimas resirkuleringsanlegg på Sunndalsøra. Settefisk av ulik størrelse ble produsert med og uten lysstyring, og gikk på ferskvann eller 12 ppt til utsett i sjø ved ca 200 og 600 g. Kontrollgruppa var en tradisjonell smolt som ble lysstyrt og satt ut i sjø ved 100 g. Fisken gikk i sjømerder ved Gildeskål Forskningsstasjon (Gifas) til slaktestørrelse (ca 4-5 kg). Designet på forsøket egner seg godt til å studere eventuell effekter av ulike produksjonsregimer på omsetning og utnyttelse av astaxanthin og om produksjonsbetingelser i tidlig livsfase kan ha betydning for kvaliteten på sluttproduktet. Astaxanthin og metabolitten idoxanthin ble målt i filet og hel fisk før, under og etter smoltifisering, før utsett på 100, 200 og 600 g, og 5 uker etter utsett i sjø. I sjøfasen ble det tatt prøver av fileten (Norwegian quality cut, NQC) ved om lag 1, 3 og 4,5 kg.

Forsøket var designet som et 2x2x2 faktorielt oppsett i RAS med faktorene:

- 1) lysperiode (tradisjonell mørkeperiode, 12:12 L:D i 6 uker eller 24:00 timer lys hele perioden i RAS)
- 2) salinitet i den påfølgende produksjonsfasen (0 eller 12 ppt fra 100 g i RAS) til utsett i sjø
- 3) størrelse ved utsett (200 eller 600 g)

Disse behandlingene ble i sjøfasen sammenlignet med en tradisjonell smoltproduksjon (12:12 L:D i 6 uker, deretter 4 uker med fullt lys, 24h, i ferskvanns RAS, utsett i sjø ved ca. 100 g) med tanke på vekst, overlevelse, kjønnsmodning og kvalitet ved slakt. Det ble benyttet kommersielle fôr fra samme

produsent (Skretting) i hele forsøket. Alle behandlinger i forsøket fikk til enhver tid samme fôr, fra samme batch, uavhengig av om den gikk i RAS eller i sjø. Effekter på pigmentering skyldes derfor miljø og ikke diett. Frem til pelletstørrelse 4 mm inneholdt fôret 70 mg/kg astaxanthin, mens det fra 6-12 mm inneholdt 50 mg/kg astaxanthin.

Det ble det tatt ut prøver til karotenoid sammensetning i hel fisk både i RAS og i sjøfasen. I RAS ble det tatt ut prøver før fisken ble satt på mørkeperiode (start), og så ved utsett av 100 g, 200 og 600 g fisk i sjø. I sjøfasen ble det tatt prøver etter 5 uker i sjø for alle tre utsett, og så ved avslutning av forsøket når fisken var blitt ca. 4.5 kg i snitt. Prøvene av helkropp ble analysert for astaxanthin og reduktive metabolitter av astaxanthin, og for innhold av fett. Prøver av filet (NQC) ble tatt ved utsett av 200 og 600 g, etter 5 uker i sjø, og ved uttakene i mai, september og november når fisken var henholdsvis ca. 1 kg, 3 kg og 4.5 kg i gjennomsnitt. Prøvene av NQC ble analysert for fett og karotenoider.

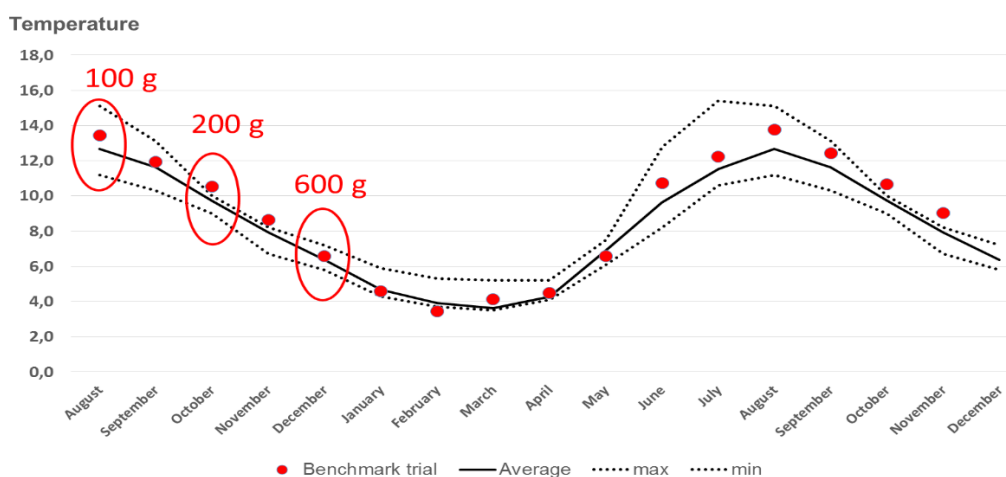
5.3.1 RAS landbasert fase

Laksen ble startfôret i januar 2016 og gikk i gjennomstrømming frem til forsøket ble startet. 5400 parr (300 x 18) ble PIT-merket ved ca 30 g. Hver behandling i gikk duplikate 3,2 m³ forsøkskar i Nofimas senter for resirkulering i akvakultur (NCRA) på Sunndalsøra (beskrevet i Terjesen med flere., 2013). Det ble benyttet kommersielt fôr av samme type til alle kar i RAS (pelletstørrelse tilpasset fiskestørrelser 20-600 g, 2-4 mm). Alle forsøksgrupper ble vaksinert med en kommersiell vaksine fra Pharmaq (Alfa Ject micro 1000). Behandlingene med vintersignal startet 13. juni og varte til 27. juli. Kontrollgruppen ble evaluert til å være ferdig smoltifisert 22. august. Sjøvannstester ble gjort i forkant av utsett i sjø av kontrollgruppen i august 2016 (3 tester, 72 timer, 34 ppt S) og før utsett av 200 og 600 g fisk etter standard prosedyrer (Kolarevic med flere., 2014). Ved utsett til sjø ble fisken transportert med bil til GIFAS. Fisken ble håvet forsiktig ut av karene og over på bilen og Aqui-S (2,7 mg/L) ble brukt til å sedere fisken i karene. 23. august 2016 ble kontrollgruppa transportert til nøter i sjø ved GIFAS. Fra utsett av kontrollfisken ble saliniteten gradvis økt over ca. 2 uker i de behandlingene som skulle gå på 12 ppt frem til utsett i sjø. Sjøvannstester ble også gjort før utsett av fisk på 200 og 600 g den 5. oktober og 9. desember.

5.3.2 Sjøfase

Den første tiden i sjøfasen gikk de ulike behandlingene adskilt i mindre nøter (5x5x5m, 125 m³) med oppsett for måling av fôrinntak. Behandlingene ble deretter blandet i to 11x11 m nøter (8 m dype, ca. 1000 m³) frem til slakt.

Fisken ble fôret etter appetitt, med litt overføring for å sikre godt fôrinntak. Fisken ble fôret to måltid per dag i perioden mars til oktober og ett måltid per dag i perioden november til februar. Fisken ble fôret med fôringsautomater i 11 m merder og håndfôret i 5x5 m merder. Fisken fikk fôr med slice mot lus ved 4 anledninger: 27 sept-3 okt 2016 (100 g utsett), 25 okt-4 nov 2016 (200 g utsett). 3-15 februar 2016 (600 g utsett), og 8-15 mai 2017 (alle grupper). I tillegg ble det benyttet en metode med mekanisk avlusing ved 4 anledninger: 21-23 feb 2017, 29-31 mai 2017, 17-18 august 2017 og 10 november 2017. Vanntemperatur på 1, 3 og 5m, salinitet og oksygenkonsentrasjon på 3m ble logget daglig. Temperatur er vist i figur 6. Det ble tatt prøver av fisken og gjort registreringer av lengde, vekt, vekt av gonader og scoring av velferd og vaksinebivirkninger ved totalt 6 prøveuttak i sjøfasen. Forsøket ble avsluttet 17. november 2017. Ytterligere detaljer omkring forsøksbetingelser og øvrige resultater kan finnes i Nofima rapport 38/2018.



Figur 6 Vanntemperatur på Gifas i løpet av forsøksperioden.

5.4 Delmål 4: Studier av opptak og metabolisme av astaxanthin ved bruk av ^{13}C NMR-spektroskopi

I denne arbeidspakken ble Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) brukt til å identifisere og kvantifisere nedbrytningsprodukter av astaxanthin i cellekulturer og også *in vivo* i levende fisk.

5.4.1 Forsøk med hepatocytter

Hepatocytter ble isolert fra fisk fra fôringsforsøket som beskrevet av Kjær m. fl. (2016) for å studere hvordan ulike fôrkomponenter påvirker opptak og metabolisme av ^{13}C -merket astaxantin i lever. Cellene ble inkubert med ^{13}C -merket astaxanthin i 48 timer for å identifisere metabolitter av astaxanthin ved å bruke NMR (Nukleær Magnetisk Resonans) spektroskopi ved NTNU. NMR-spektroskopi er en metode som kan detektere og kvantifisere frie karotenoider og deres estere i forskjellige vev. I denne studien ble både ^1H og ^{13}C NMR brukt til å måle astaxanthin opptak og omsetning i laks fôret med fire ulike dietter som beskrevet i delmål 2:

Det ble isolert celler fra følgende 4 diettgrupper:

- Diett 1: Marin diett
- Diett 2: Lav marin diett
- Diett 5: Lav marin diett tilsatt marint fosfolipid (MPL)
- Diett 6: Lav marin diett tilsatt DHA

Cortisol ble også tilsatt celler fra fisk fôret marin og lavmarin diett for å indusere stressrespons, for å se om dette ville ha effekter på astaxanthin-opptak og omsetning.

Ekstraksjon ble gjort med bruk av heksan og aceton. Det var en utfordring å detektere karotenoider i hepatocytter og enterocytter på grunn av de små vevsprøvene (7-30 mg). Det var derfor nødvendig med ytterligere metodeoptimalisering av ekstraksjonsprosedyren og av NMR-analysene. Løsningsmidler med forskjellig polaritet ble brukt til å separere den ikke-polare fraksjonen av lipider fra de mer polare komponentene, inkludert astaxanthin og andre karotenoider (for eksempel zeaxanthin, idoxanthin, β -karoten). Astaxanthin er lite løselig i heksan, men mye lettere løselig i

acetone. Derfor ble bare acetonekstrakter brukt til NMR-analyse av astaxanthin. $1D^1H$ -NMR-spektra av alle organiske ekstrakter (både heksan og acetone) ble ervervet ved 300K med et Bruker Avance 600 MHz spektrometer utstyrt med 5-mm z-gradient-TXI (H / C / N) -cryoprobe. I alt 84 spektra ble registrert. Et sett med 2D NMR-spektra fra hel lever av noen replikater fra hver diett ble også tatt opp for å analysere produkter av lipid- og karotenoidmetabolisme i intakt vev. Et sett med NMR-spektra for referanseforbindelsene (astaxanthin, idoxanthin, zeaxanthin, retinol, β -karoten) ble brukt til å identifisere resonansene i prøvematerialet. ^{13}C -anrikt astaxanthin og metabolitter har resonanser ved forskjellige kjemiske skift i NMR-spekteret sammenlignet med naturlige (^{12}C) karotenoider og kan derfor skilles fra hverandre. En ekstern tetramethylsilan (TMS) NMR-standard ble brukt til å kvantifisere de ulike metabolske produktene av astaxanthin.

En ikke-målrettet statistisk analyse ble utført på alle spektroskopiske data for å bestemme spesifisiteten av lipid- og karotenoidmetabolismen i hver gruppe. De viktigste signalene i den delen av NMR-spekteret hvor man finner karotenoider ble identifisert ved bruk av ANOVA-testen (IBM SPSS Statistics). De signifikante signalene ble brukt for å utføre en lineær diskriminerende analyse (LDA, IBM SPSS Statistics) av NMR-data.

5.4.2 Forsøk med enterocytter

Primære tarmceller (enterocytter) ble isolert fra laks fôret en kommersiell diett. Nofima har etablert en metode hvor modne enterocytter isoleres, festes til bunnen av en celleflaske og holdes levende i kultur i ca 48 timer. Slike cellemodeller er egnet til å studere hvilke faktorer som kan påvirke opptak og metabolisme av astaxanthin i tarmceller innen et begrenset tidsrom. Cellene ble inkubert med ulike doser ^{13}C -astaxanthin i 24 timer for se om det var en dose-respons i opptak av astaxanthin. Ved en dose ble det også tilsatt cortisol i mediet for å se om dette påvirket metabolisme av astaxanthin. Det ble gjort tester av cellenes vitalitet for å sikre at de var metabolsk aktive. Etter inkubering ble cellene høstet og ekstrahering og analyse ved NMR ble gjort som for hepatocytter beskrevet i 4.4.1.

5.4.3 *In vivo* stress forsøk med laks

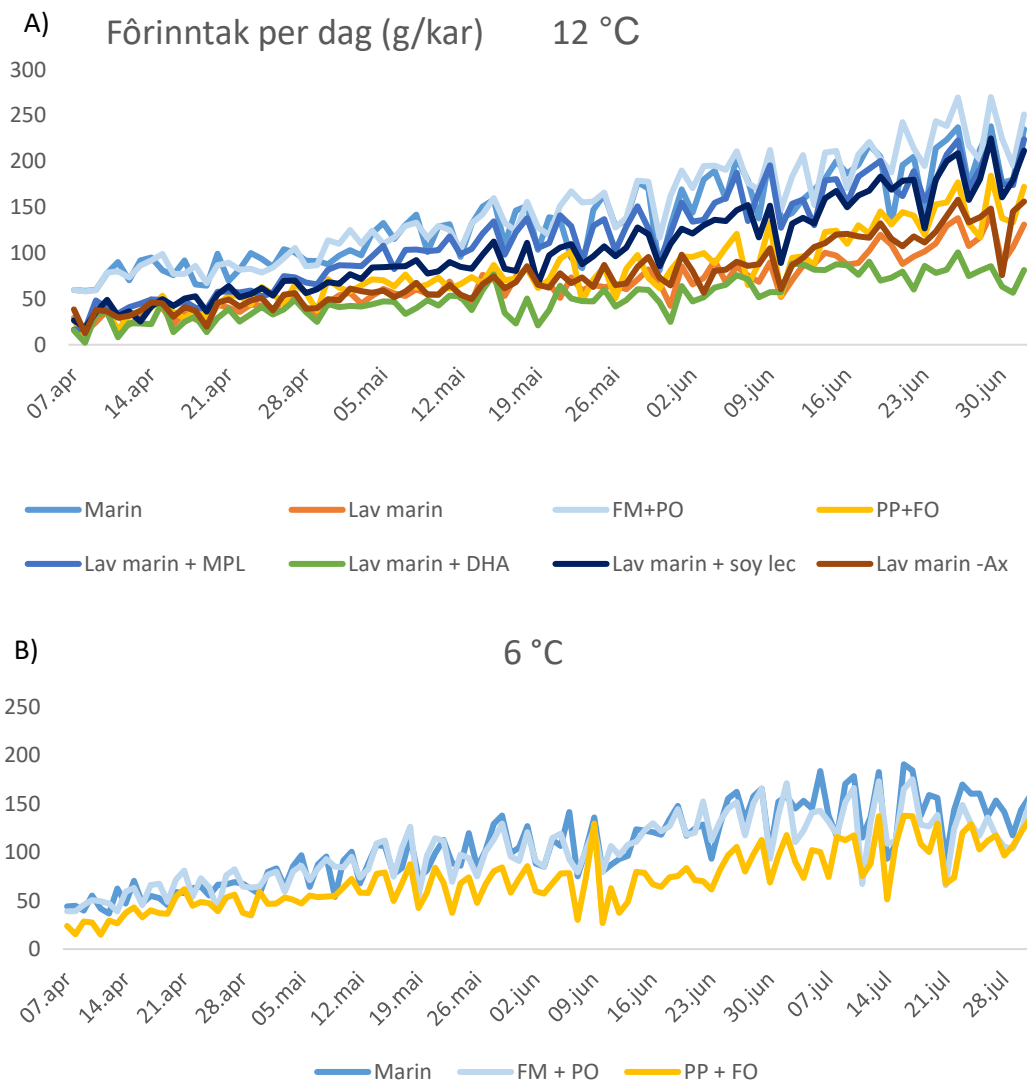
Laks (startvekt 411 g) ble fôret dietter med coatet med ^{13}C -astaxanthin i 12 dager, deretter ble fisken sultet i 4 uker. I denne 4 ukers-perioden ble fisken utsatt for en stressbelastning en gang per uke i 4 påfølgende uker ved at fisken ble trent i karene ved at vannstanden ble tappet ned til ca. 1/3. Fisken ble så håvet ut av karet og over i en stamp og tilbake i karet igjen. Fisken ble ikke bedøvd under håving. Kontrollfisken ble forstyrret minst mulig i løpet av forsøket. Det ble tatt prøver ved avslutning av fôring med ^{13}C -astaxanthin (før stress) og så etter 24, 48 og 72 timer og ved avslutning av forsøket. Innholdet av ^{13}C -astaxanthin og nedbrytningsprodukter ble målt i blod og ulike vev og organer (lever, muskel, tarm). Kjemisk sammensetning av hel fisk ble målt ved avslutning av forsøket.

6 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

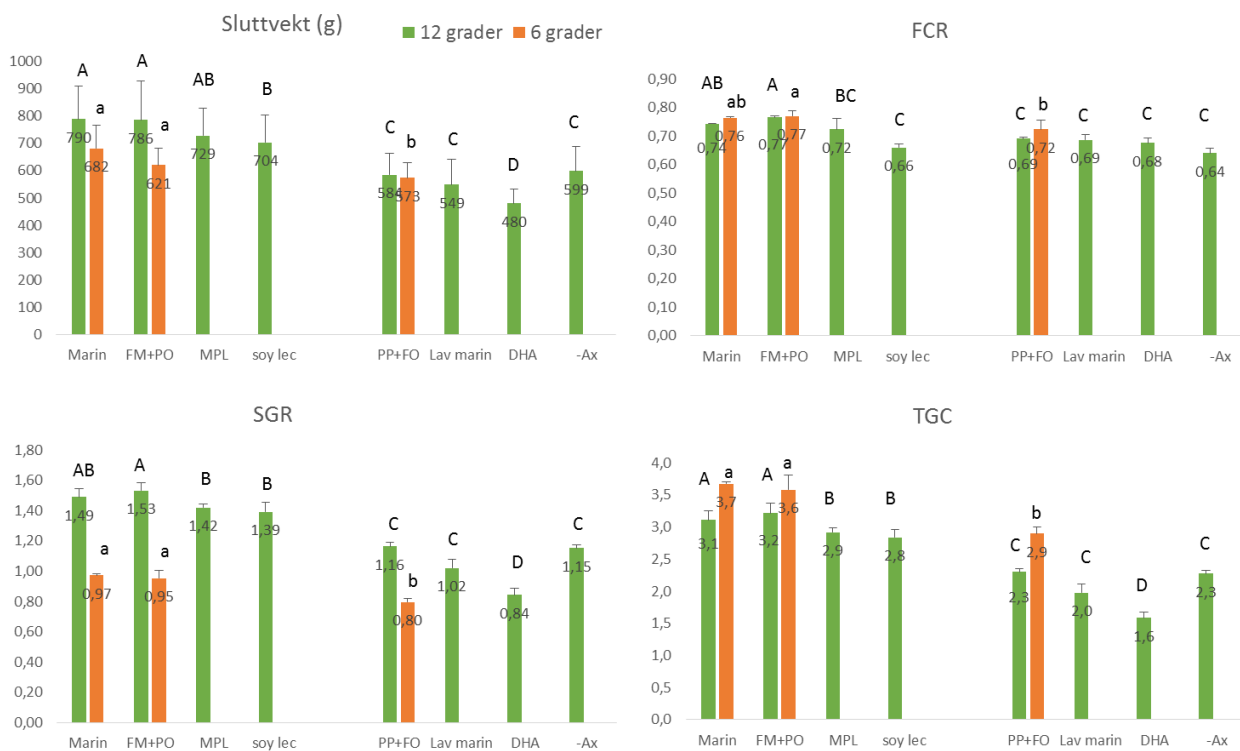
6.1 Delmål 1: Effekt av fôrkomponenter og temperatur på fordøyelighet og retensjon av astaxanthin

6.1.1 Fôrinntak og vekst

Resultatene fra forsøket viste en negativ effekt av lavt innhold av marint protein i fôret på fôrinntak og vekst både på 6 og 12 °C ($p < 0,0001$, Figur 7 og 8). Det var ingen signifikante effekter av oljekilde på fôrinntak og vekst. Tilsats av fosfolipider førte til en bedring i fôrinntak etter ca. tre uker og ut forsøket sammenlignet med dietter med lavt innhold av fiskemel uten tilsatt fosfolipid (Figur 7A). Det var ingen signifikante forskjeller mellom dietter tilsatt marine fosfolipider og soya lecithin i sluttvekt, SGR og TGC, men veksten var litt lavere i disse behandlingene sammenlignet med fisk fôret dietter med fiskemel (Figur 8, $p < 0,05$). Aller dårligst vekst hadde fisk fôret den lavmarine dietten tilsatt ekstra DHA. Tre dietter ble også testet på 6 °C: Marin, FM + PO og PP + FO. Også her var det lavere fôrinntak og vekst i dietten med planteprotein, men forskjellene var mindre enn på 12 °C (Figur 7B og 8). SGR var lavere på 6 enn på 12 °C, men TGC var høyere på 6 °C. Det var ingen signifikant effekt av temperatur på FCR. På 6 °C var det en tendens til høyere FCR på fiskemelsdietter, mens det var ingen effekt av oljekilde. På 12 °C var det en signifikant høyere FCR for fiskemelsdietter og for dietten tilsatt marine fosfolipider ($p < 0,0001$, Figur 8).



Figur 7 Daglig fôrintak per kar (gjennomsnitt av tre kar per behandling) ved A) 12 °C og B) 6 °C. FM=fiskemel, FO= fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.

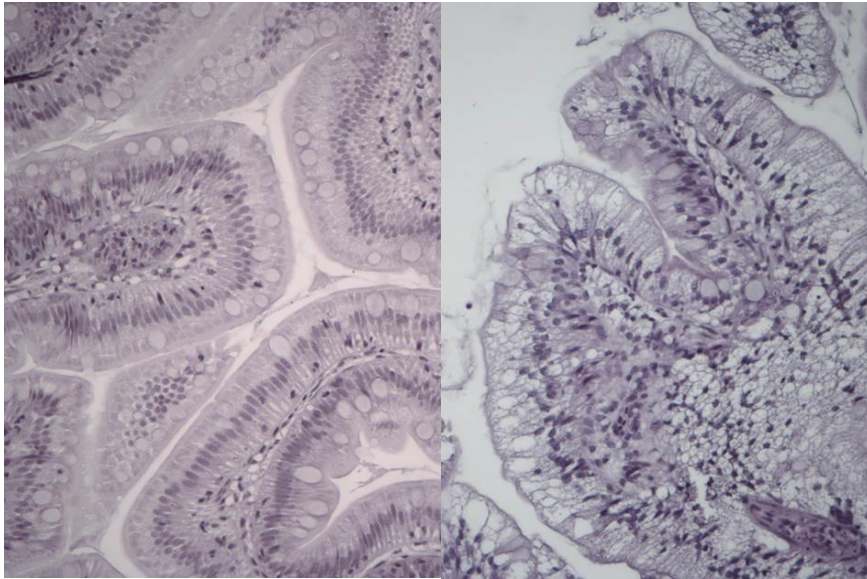


Figur 8 Sluttvekt, fôrfaktor (FCT) og vekstrate (SGR og TGC) i laks (startvekt 197 g) fôret dietter med ulikt innhold av marine ingredienser ved 12 °C og 6 °C. Signifikante forskjeller mellom behandlinger er indikert med store bokstaver ved 12 °C og små bokstaver ved 6 °C ($p < 0,05$). Verdier er snitt per behandling \pm SEM. FM=fiskemel, FO= fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12 °C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre.

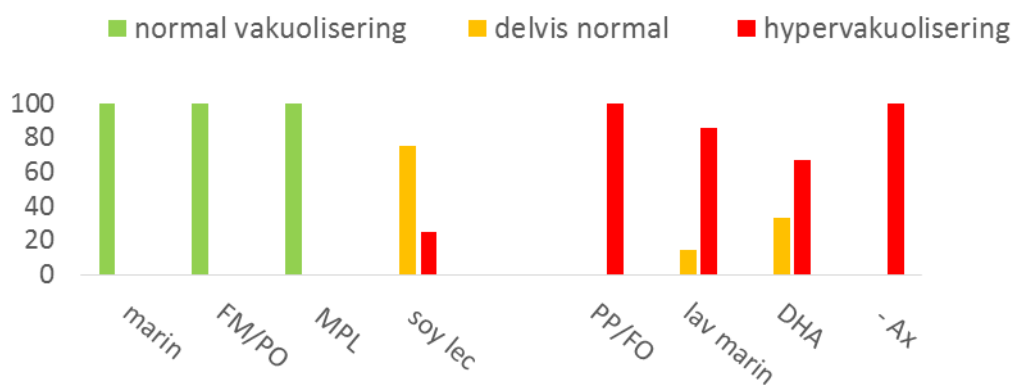
6.1.2 Akkumulering av fett i tarm, lever og innvoller

Fosfolipider er viktige for dannelse av chylomikroner i tarmen. Chylomikroner er transportproteiner for fett og fettløselige forbindelser som astaxanthin og andre karotenoider. Akkumuleringen av fett i tarmveggen tydet på at transporten av fett gjennom tarmcellene ble hemmet når innholdet av fosfolipider i dietten var lavt. Midt-tarmen hos laks fôret en lavmarin diett hadde unormalt mange vakuoler, et tegn på akkumulering av fett i tarm-veggen. Laks som fikk et fôr med fiskemel som proteinkilde hadde normal tarm (Figur 9). Tilsats av marine fosfolipider resulterte i en tarm med normal vakuolisering slik som hos laks fôret en fiskemelsdiett, mens tilsats av soyalecitin ga bare en delvis normalisering av antall vakuoler i tarmen (figur 9B).

A)

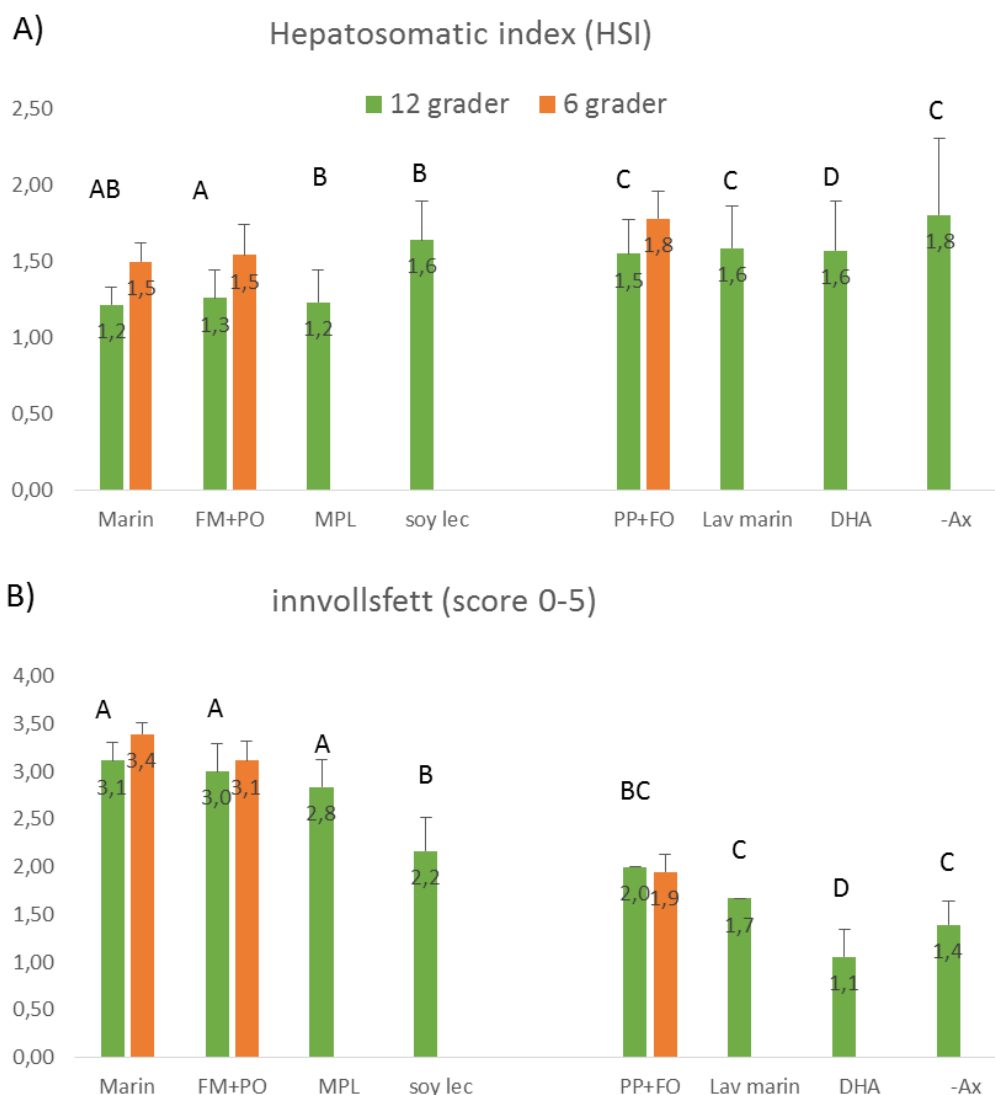


B) Score av tarmvakuolisering (12 °C)



Figur 9 A) Mikroskopibilder av normal og unormal vakuolisering i tarmceller hos laks. B) % andel av fisken som hadde normal, delvis normal og hypervakuolisering i tarmen. Alle prøver er tatt ved 12 °C. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12 °C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre.

Relativ leverstørrelse (leverindeks/hepatosomatisk indeks, HSI) var lavere for dietter med fiskemel og marine fosfolipider sammenlignet med de andre gruppene ($p < 0,0001$, Figur 10A). Fisk fôret en lavmarin diett uten astaxanthin hadde høyest leverindeks av alle behandlinger. Det var ingen effekt av oljekilde på leverindeks, men det var høyere leverindeks på 6 °C enn på 12 °C. Mengden innvolls fett var sterkt positivt korrelert med kroppsvekt ($y = 0,0063x + 1,97$, $R^2 = 0,90$, $p < 0,0001$), fisk med god vekst hadde også mest innvolls fett, slik at fisk fôret marint protein, og dietter med MPL og soyalecitin hadde mest innvolls fett. Det var ingen effekt av temperatur på score for innvolls fett (Figur 10B).

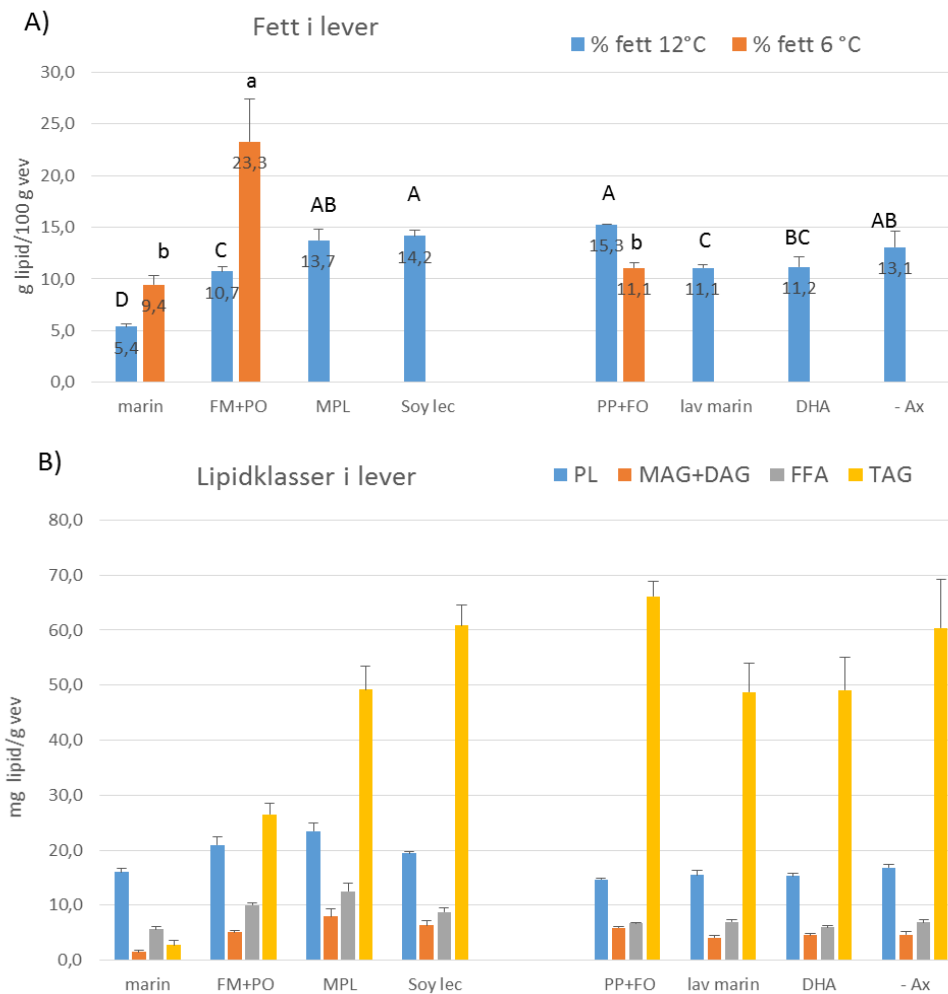


Figur 10 (A) Leverindeks (hepatosomatisk indeks, HSI) og (B) score for mengde innvolls fett i laks fôret dietter med ulikt innhold av marine ingredienser. Signifikante forskjeller mellom behandlinger på 12 °C er indikert med store bokstaver ($p < 0,05$). Verdier er gjennomsnitt per behandling \pm SEM. FM=fiskemel, FO= fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalectin, MPL= marine fosfolipider, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12°C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre.

6.1.3 Lipidsammensetning og % fett i lever

Det var en signifikant effekt av diett på fettinnholdet i lever, både på 6 og 12 °C ($p < 0,0001$). Lavest fettinnhold var det i lever hos laks fôret den marine dietten (Figur 11A). Fettinnholdet i lever var høyere i laks fôret dietter med planteprotein sammenlignet med fiskemelsdietter, men planteolje førte også til en økning i fettinnhold, særlig på 6 °C ($p < 0,0001$). Ved 6°C var det høyere fettinnhold i lever i fisk fôret FM+PO sammenlignet med fisk fôret en marin diett og en diett med planteprotein og fiskeolje (PP +FO). Lipidsammensetningen i lever var også påvirket av diett (Figur 11B). Den marine dietten hadde mye lavere innhold av triglycerid (TAG) enn de øvrige diettene ($p < 0,0001$) og også lavere innhold av monoacyl (MAG) og diacylglycerider (DAG). Når det gjaldt fosfolipid (PL) var det høyest innhold i lever hos laks fôret diettene tilsatt PL og i FM+PO dietten, og ingen signifikante forskjeller mellom de øvrige diettene på 12°C. Ved 6°C var det ingen forskjeller i PL i lever mellom diett-gruppene,

men det var høyere MAG/DAG og TAG i fisk fôret med fiskemel og planteolje (FM+PO) sammenlignet med de to andre diettene.

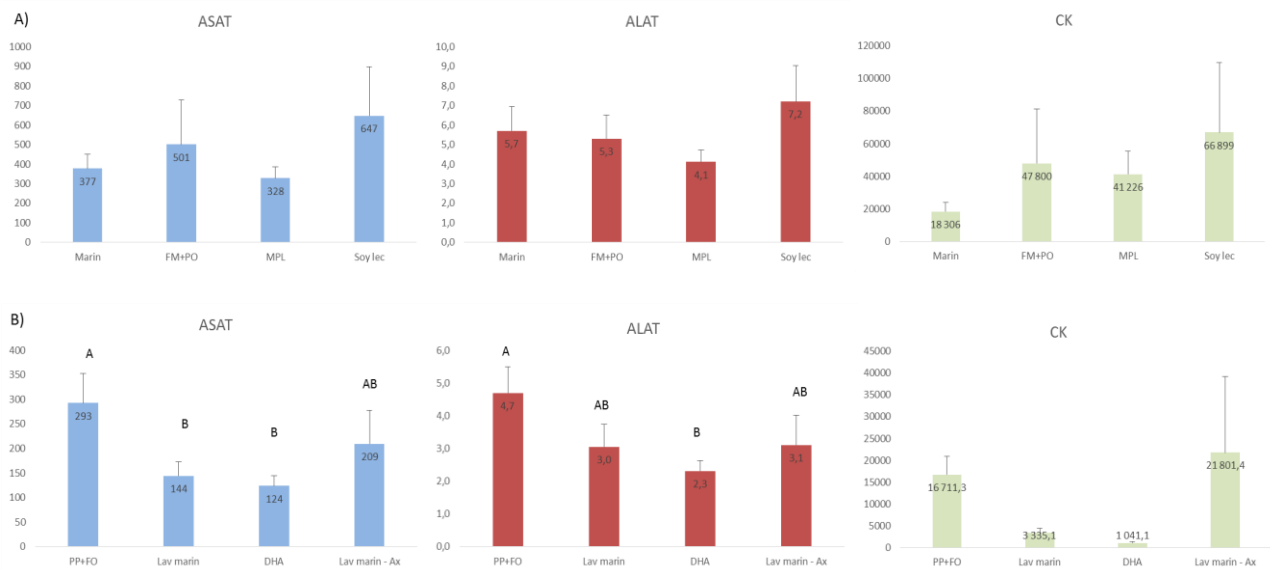


Figur 11 (A) % fett i lever ved 12 og 6 °C, forskjeller mellom behandlinger er markert med henholdsvis store og små bokstaver på 12 og 6 °C, og (B) innhold av ulike lipidklasser i lever fra laks fôret de ulike diettene på 12 °C. Verdier er gjennomsnitt per behandling + SEM (n=3). PL = fosfolipid, MAG = monoacylglycerid, DAG = diacylglycerid, TAG = triacylglycerid, FFA = frie fettsyre. FM=fiskemel, FO=fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12 °C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre.

6.1.4 Indikatorer på lever og muskelfunksjon (ALAT, ASAT, CK)

Det ble analysert innhold i blod av enzymene aspartat aminotransferase (ASAT) og alanin aminotransferase (ALAT) som er indikatorer på leverfunksjon. Det ble også analysert for innhold av kreatinkinase (CK) i blod, som er en indikator på muskelfunksjon. Det var generelt stor variasjon mellom enkeltindivider i både ASAT og ALAT, men det var likevel signifikante effekter av diett for begge enzymer ($p < 0,01$). Men hovedeffekten skyldtes forskjeller i vekst hos laks fôret de ulike diettene, laks fôret dietter som resulterte i lav vekst hadde lavere verdier enn laks fôret dietter som ga normal vekst. Alle tre enzymer var positivt korrelert med vekst ved avslutning av forsøket ($R^2 = 0,47-0,57$). Når man kun sammenlignet dietter som ga sammenlignbar vekst var det ingen signifikante effekter av diett for dietter med normal vekst (Figur 12A), mens det var signifikante effekter på ASAT og ALAT når man

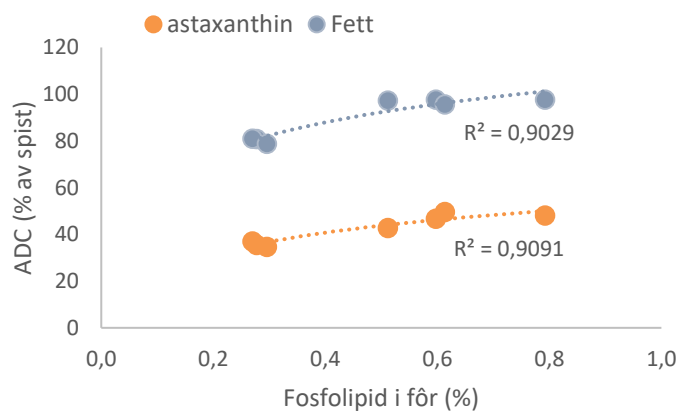
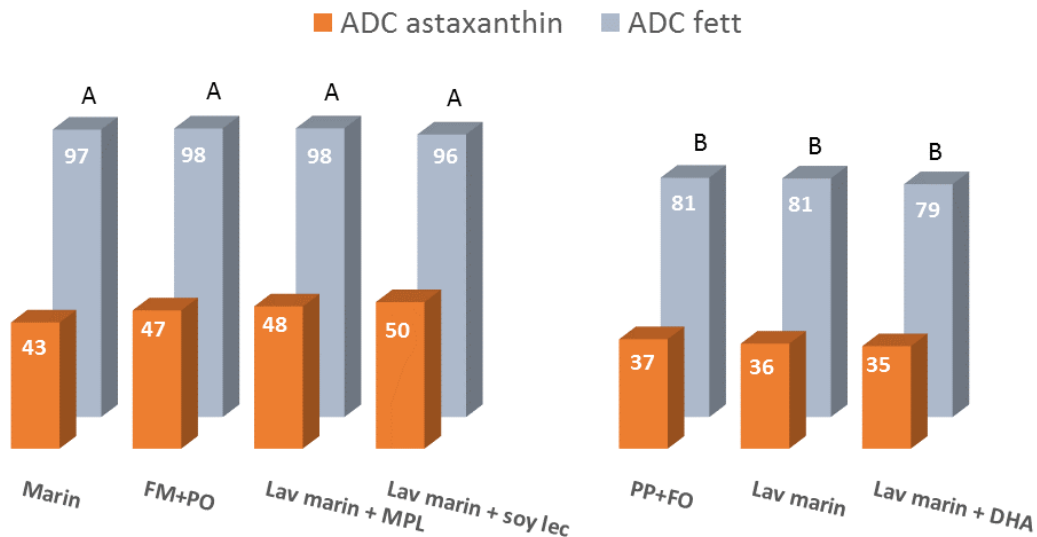
sammenlignet dietter med lav vekst (Figur 12B) med høyest verdier i FM+PO og lavest verdier i dietten med tilsatt DHA, som også vokste dårligst.



Figur 12 Indikatorer på leverfunksjon: Aspartat aminotransferase (ASAT), Alanin aminotransferase (ALAT) og indikator på muskelfunksjon (C) Kreatinkinase (CK) i fisk fôret de ulike diettene. Verdier er gjennomsnitt per behandling \pm SEM. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12 °C, (A) TGC 2,8-3,1 (B) TGC 1,6-2,3. Signifikante effekter av diett er markert med ulike bokstaver.

6.1.5 Fordøyelighet av astaxanthin og fett

Fordøyeligheten av fett og astaxanthin ble kraftig redusert når laksen fikk et fôr med lavt innhold av fiskemel sammenlignet med når laksen fikk et fôr med fiskemel (Figur 13A). Å bytte ut fiskeolje med rapsolje hadde ikke negativ effekt på fordøyeligheten av astaxanthin og fett ved 12°C. Når dietten med lite fiskemel ble tilsatt ekstra fosfolipid, både av marint opphav og som soyalecitin, forbedret det fordøyeligheten av både astaxanthin og fett, og fordøyeligheten av astaxanthin og fett økte proporsjonalt med innholdet av fosfolipid i fôret (Figur 13B). Dette kan tyde på at fosfolipider er viktige for løselighet av astaxanthin og fett i miceller i tarm lumen, noe som er avgjørende for et effektivt opptak i tarmcellene. Innholdet av PL i tarmlumen kan også ha påvirket mengden av miceller som ble dannet i tarmen. Det kan også være størrelsen på micellene som påvirkes av konsentrasjonen av PL i tarmlumen, små miceller kan diffundere raskere og har større overflate/volum og derfor gi høyere opptak av astaxanthin og lipid i tarmcellene. Men effekten på fordøyelighet kan også skyldes at transport gjennom tarmen ble hemmet pga. redusert syntese av apoproteiner som inngår i chylomikroner. Det var ingen signifikant effekt av temperatur på fordøyelighet, ved 6°C var ADC henholdsvis 40, 47 og 35% for marin diett, FM+PO og PP+FO. Dette kan skyldes at fisken på 6°C spiste mindre enn den på 12°C, og dermed var passasjehastigheten gjennom tarmen lavere, og det er mer tid til absorpsjon av astaxanthin. I forsøk hvor fisk på ulike temperaturer parfôres slik at fôrintaket er det samme, er det imidlertid vist en negativ effekt av lavere temperatur på fordøyelighet av astaxanthin (Ytrestøyl med flere 2005).



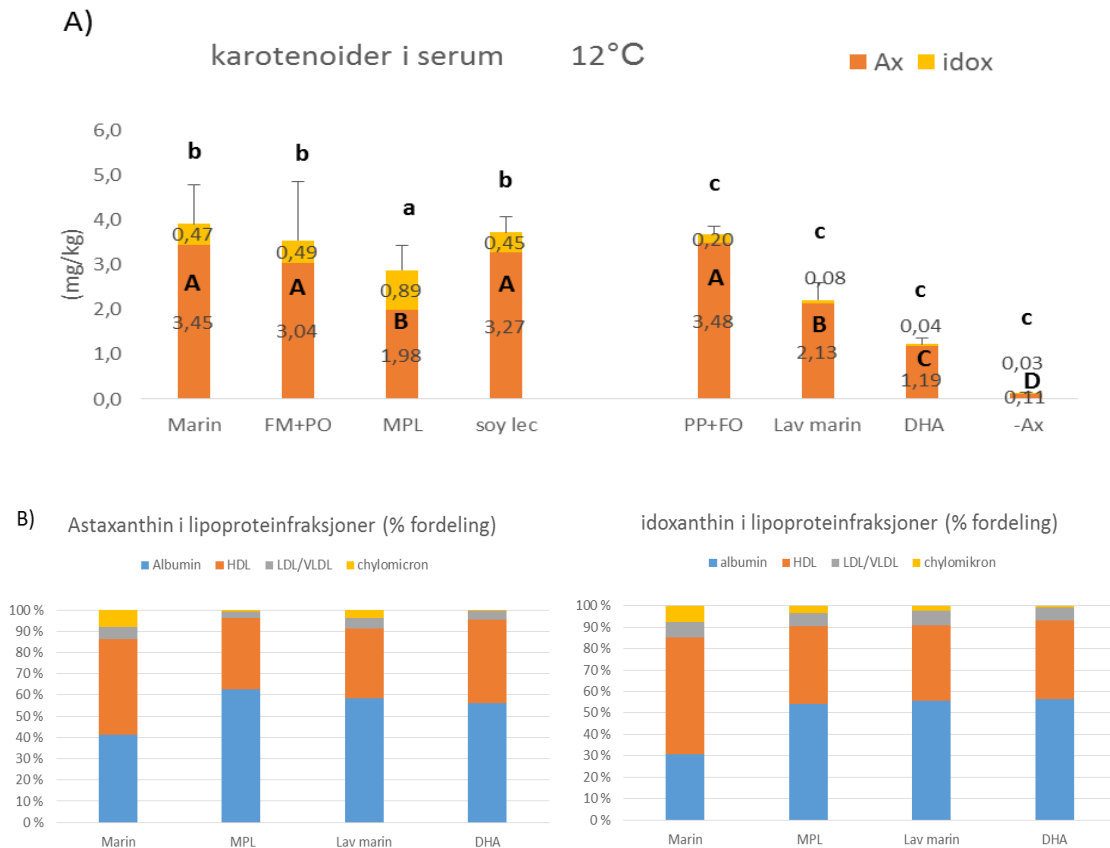
Figur 13 A) Fordøyelighet (ADC) i % av spist for de ulike diettene på 12°C. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12°C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre. B) Korrelasjon mellom innholdet av fosfolipid i fôret og fordøyelighet (ADC) av henholdsvis fett og astaxanthin. Verdier er gjennomsnitt per behandling (n=3). FM=fiskemel, FO= fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalectin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.

6.1.6 Innhold av astaxanthin og metabolitter i ulike vev

Lipoproteiner og serum

Chylomikroner dannes i tarmen og frigjøres til blodbanen. Tarmen syntetiserer også HDL og VLDL. Chylomikronene og VLDL sirkulerer i blodbanen og avgir karotenoider til perifere vev som muskel. Opptakmekanismene for astaxanthin i muskel og andre vev hos laks er ikke kjent. I lever syntetiseres det VLDL og HDL som sendes ut i sirkulasjonssystemet. Karotenoider kan da igjen komme i sirkulasjon og tas opp i vev og organer. Mesteparten av karotenoidene i blodet finnes i HDL og albumin i laksefisk. Det er også mulig at karotenoidene går direkte til lever via portåren. Detaljer for hvordan transport av karotenoider foregår gjennom tarmen og videre over i blod og til lever er imidlertid ikke kjent i laksefisk. Både for astaxanthin og idoxanthin fant vi en større andel i lipoproteiner (chylomikroner,

LDL/VLDL og HDL) i laks fôret den den marine dietten enn hva som var tilfelle for laks fôret diettene med planteprotein (Figur 14, $p < 0,01$). I laks fôret den marine dietten var om lag 60 % av astaxanthin og 70 % av idoxanthin i lipoproteiner, mens i laks fôret planteproteindiettene var i snitt ca 60 % av astaxanthinet i albumin-fraksjonen og ca 55 % av idoxanthin i albumin-fraksjonen.



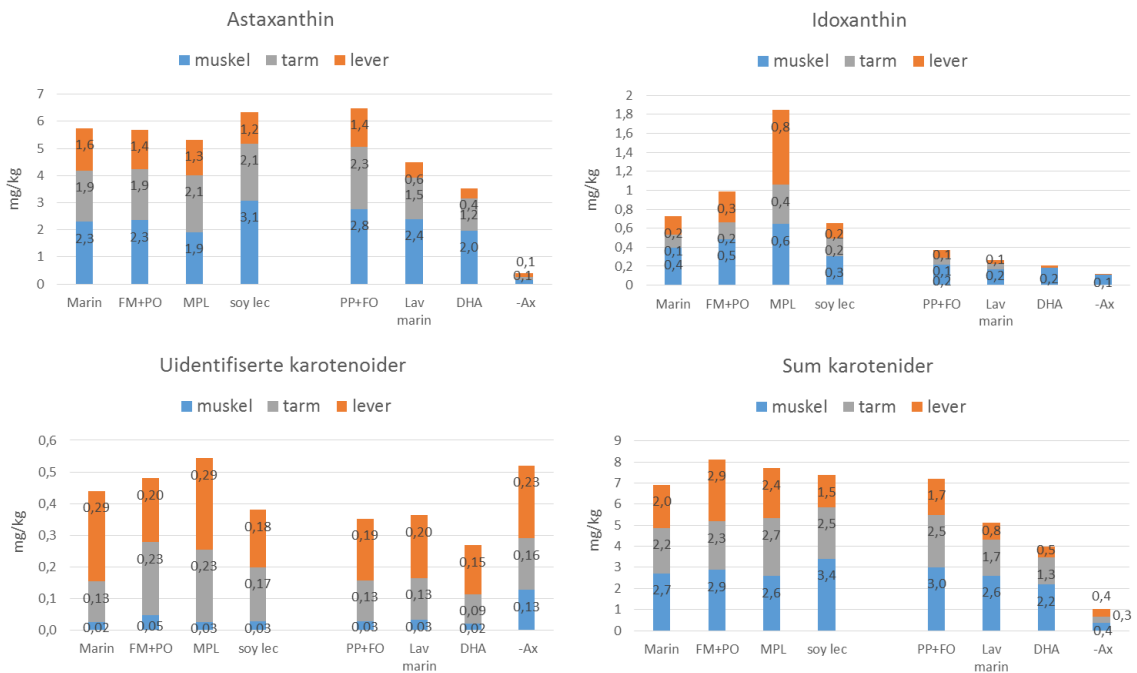
Figur 14 A) Astaxanthin og idoxanthin i serum hos fisk fôret de ulike diettene på 12°C. Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD (n=3). Signifikante forskjeller i innhold av astaxanthin mellom behandlinger for hver temperatur er indikert med store bokstaver, og forskjeller i idoxanthin er indikert med små bokstaver ($p < 0,05$). B) Fordeling av astaxanthin og idoxanthin i de ulike lipoprotein fraksjonene og albumin. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12°C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre. FM=fiskemel, FO= fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.

Muskel

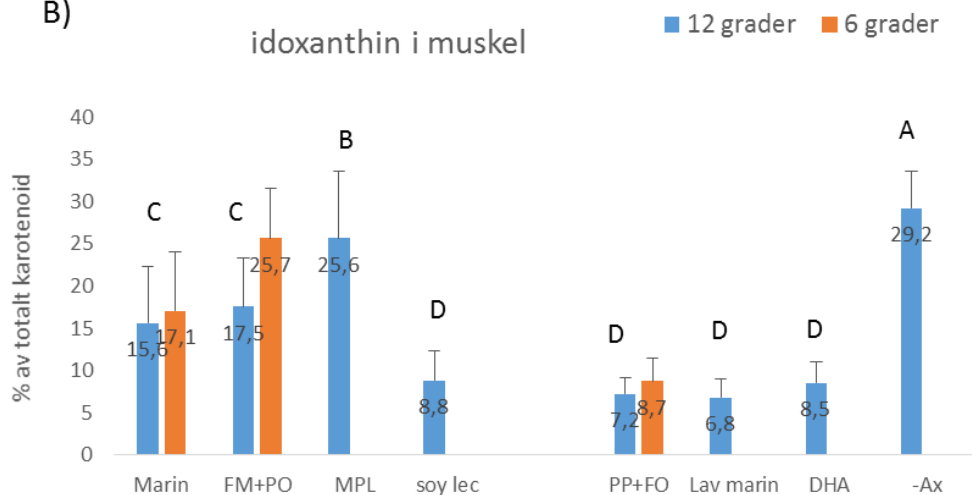
Retensjonen av astaxanthin i muskel er ikke bare avhengig av fordøyeligheten av astaxanthin. Hvor mye av pigmentet som omsettes metabolsk er også viktig. Lever og tarm er antatt å være de viktigste organene for omsetning av astaxanthin. Selv om man kjenner noen metabolitter av astaxanthin så er det fortsatt ukjent hva som styrer omsetning av astaxanthin. Om pigmentet går direkte fra tarmen til lever eller om det går til muskel først kan være avgjørende for hvor mye som omsettes metabolsk og hvor mye som deponeres i muskel. I dette forsøket var innholdet av metabolitten idoxanthin høyere i muskel hos laks fôret dietter som inneholdt fiskemel sammenlignet med hos laks fôret med planteprotein ($p < 0,0001$, Figur 15). Også planteolje økte konsentrasjonen av idoxanthin i muskel ($p < 0,0001$). Tilsats av fosfolipid, særlig marine fosfolipid, økte innholdet av idoxanthin i muskel ($p < 0,05$). Det var en positiv lineær korrelasjon mellom innholdet av idoxanthin i muskel og innholdet av fosfolipid

i fôret ($R^2 = 0,85$). Forskjeller i vekst mellom behandlingene kan ha påvirket retensjon, men sammenligner man dietter som hadde sammenlignbar vekst (TGC 2,8-3,1) det vil si marin diett, FM + PO, og FM + MPL og soya lecithin, så fant vi høyest konsentrasjon av astaxanthin i fileten til laks fôret den lavmarine dietten tilsatt soyalecithin (Figur 15A). Å erstatte fiskeolje med rapsolje i en fiskemelsdiett hadde ingen effekt på innhold av astaxanthin eller idoxanthin i filet. Men når man erstattet fiskeolje med rapsolje i en planteprotein-diett førte det til en nedgang i astaxanthin i filet (Figur 15A). Når man sammenligner astaxanthin i muskel ved 6 og 12°C så var det ingen signifikant forskjell i astaxanthin konsentrasjon for diettene FM + PO og PP + FO, mens det var høyere astaxanthin konsentrasjon for den marine dietten på 6°C sammenlignet med 12°C ($p < 0,05$, Figur 15 A og B). Fisk på 6°C var noe mindre enn fisk på 12 °C, så relativt til kroppsvekt var astaxanthin og totalt karotenoid i muskel høyere i fisk på 6 enn på 12°C ($p < 0,001$, Figur 16). Mengden idoxanthin i muskel var høyere på 6 enn på 12°C ($p < 0,0001$). Det ble også funnet en ukjent metabolitt i muskel. Konsentrasjonen av denne metabolitten var ikke påvirket av proteinkilde, men var høyere i fisk fôret dietter med planteolje ($p < 0,0001$). Total mengde karotenoider i muskel var høyere på 6 enn på 12°C, ($p < 0,01$) selv om fisken var mindre.

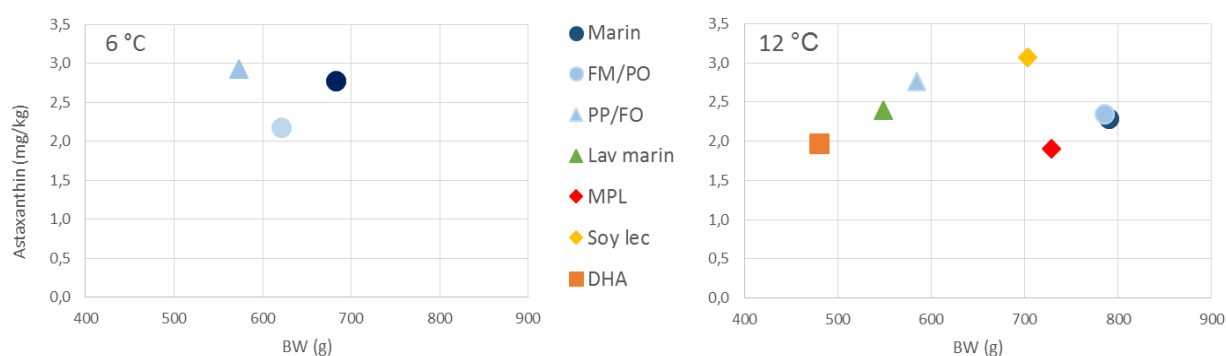
A)



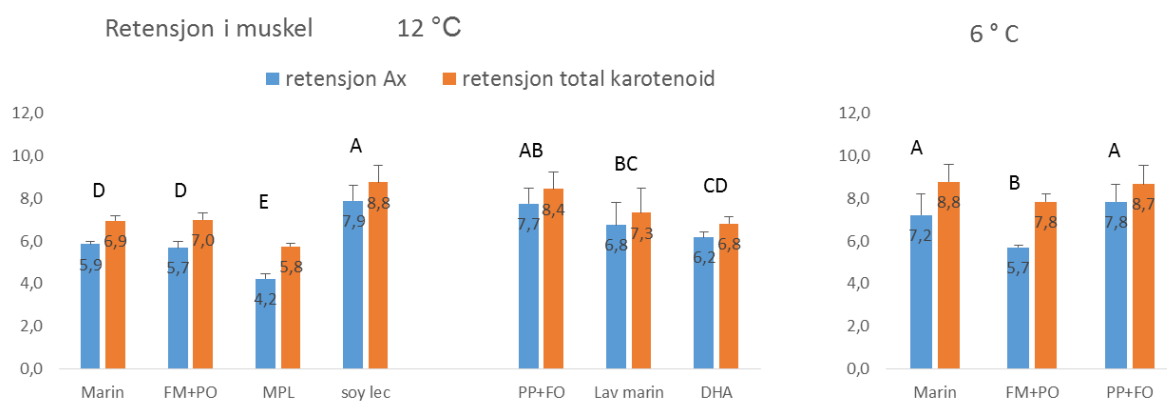
B)



Figur 15 (A) Innhold av astaxanthin, idoxanthin og en ukjent metabolitt i muskel, tarm og lever fra fisk fôret de ulike diettene på 12°C. Verdier er gjennomsnitt per behandling (n=3). (B) Innhold av idoxanthin i muskel (% av totalt karotenoid) ved 12 og 6°C. Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12°C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre. FM=fiskemel, FO=fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.



Figur 16 Astaxanthin i muskel plottet som funksjon av kroppsvekt på 6 og 12 °C. Verdier er gjennomsnitt per behandling (n=3). FM=fiskemel, FO= fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.



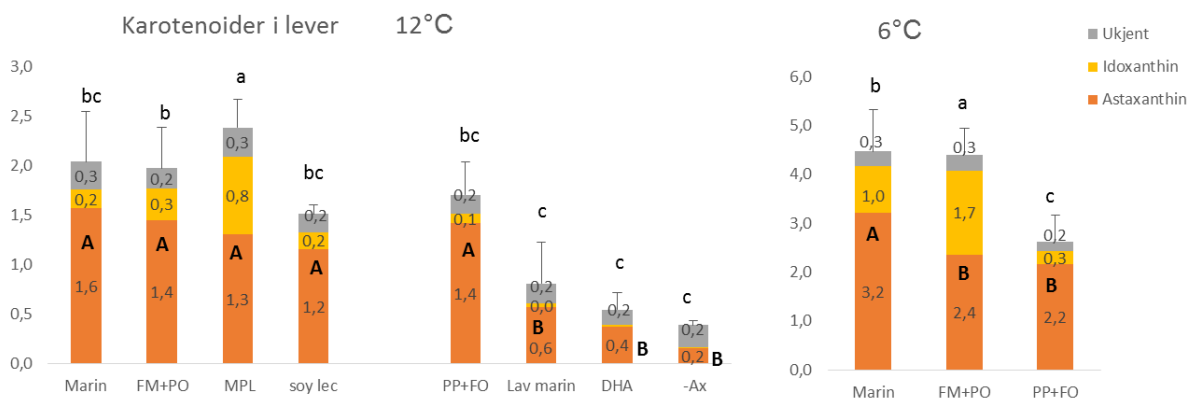
Figur 17 Retensjon av astaxanthin og total mengde karotenoider i muskel, på 12 og 6 °C. Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD (n=3). Signifikante forskjeller i retensjon av astaxanthin mellom behandlinger for hver temperatur er indikert med bokstaver, (p < 0,05). Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekt på 12 °C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre.

Hvor effektivt astaxanthin deponeres i muskel måles gjerne i % deponert av spist mengde, som betegnes som retensjon. For å ta høyde for det som er metabolisert kan man også beregne % retensjon av total mengde karotenoider i muskel, regnet fra mengde spist. Retensjon kan være nyttig å bruke for å sammenligne grupper som ikke har spist like mye, og dermed varierer i vekt, men også når innholdet av astaxanthin varierer litt mellom diettene, slik som i dette forsøket, hvor diettene med fiskemel hadde litt lavere innhold av astaxanthin (41,5 mg/kg) enn diettene med planteprotein (45-50 mg/kg). Men fisk som fikk fôr med fiskemel eller tilsatt fosfolipider vokste derimot bedre og hadde høyere sluttvekt sammenlignet med de andre diettene. Ved 12 °C var det høyest retensjon av astaxanthin og totalt karotenoid i muskel i diettene med soya lecithin og PP+FO (Figur 17). Det var lavere retensjon i dietter med fiskemel og i dietten med MPL, men det var ikke en signifikant effekt av oljekilde på 12 °C. Det var heller ingen signifikant effekt av DHA på retensjon. Retensjonen på 6 of 12 °C var ikke signifikant forskjellig for diettene FM+PO og PP+FO, men det var en økt retensjon av astaxanthin og totalt karotenoid for den marine dietten på 6 °C sammenlignet med på 12 °C (p < 0,05). På 6 °C var det også en positiv effekt av fiskeolje på retensjon av astaxanthin (p < 0,05). Det var ingen signifikant sammenheng mellom fordøyelighet (ADC) av astaxanthin og retensjon av astaxanthin (R² = 0,06) eller

retensjon av totalt karotenoid ($R^2 = 0,002$). Retensjonen av astaxanthin i muskel var negativt korrelert med mengde idoxanthin i muskel både ved 12°C ($R^2 = 0,67$) og ved 6°C ($R^2 = 0,76$).

Lever

Ved 12°C var innholdet av astaxanthin i lever lavere i fisk føret lav marin diett og lav marin diett tilsatt DHA (Figur 18, $p < 0,05$) sammenlignet med de øvrige diettene. (Figur 18, $p < 0,0001$). Ved 6°C var innholdet av astaxanthin høyere i lever hos fisk føret den marine dietten enn i fisk føret FM+PO og PP+FO (Fig 18, $p < 0,05$). Det var også mer astaxanthin i lever ved 6 enn ved 12°C ($p < 0,005$). Ved 12°C var innholdet av idoxanthin høyest i lever fra fisk føret dietten med MPL og lavest i lav marin, lavmarin + DHA (Figur 18). Fisk på 6°C hadde høyere konsentrasjon av idoxanthin i lever enn fisk på 12°C ($p < 0,0001$). Det var ingen effekt av temperatur på konsentrasjonen av et ukjent karotenoid med retensjonstid på 3 minutt i lever, men den utgjorde en større andel av det totale innholdet av karotenoider i lever på 12°C enn på 6°C. Dette karotenoidet er sannsynligvis en metabolitt av astaxanthin. På 6°C ga planteolje i dietten økt innhold av idoxanthin i lever ($p < 0,001$), mens det ikke var noen effekt av planteolje ved 12°C på konsentrasjonen av idoxanthin i lever. Det var ingen korrelasjon mellom innhold astaxanthin og % fett i lever ($R^2 = 0,001$), noe som kan indikere at transport av astaxanthin til lever eller ut av lever skjer ved hjelp av ulike mekanismer.

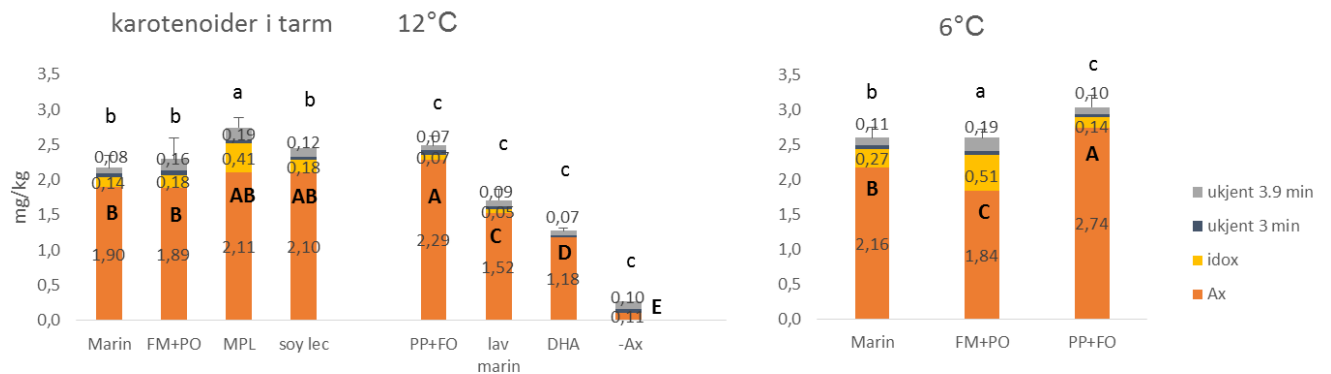


Figur 18 Karotenoider i lever, på 12 og 6°C. Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD ($n=3$). Signifikante forskjeller i innhold av astaxanthin mellom behandlinger for hver temperatur er indikert med store bokstaver, og forskjeller i idoxanthin er indikert med små bokstaver ($p < 0,05$). Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12°C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre. FM=fiskemel, FO=fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.

Tarm

Det var effekter av både diett og temperatur på konsentrasjonen av astaxanthin og metabolitter i tarmen. Konsentrasjonen av astaxanthin i tarm var høyest i diettene tilsatt fosfolipid og i PP+FO dietten. Lavest konsentrasjon ble funnet i den lavmarine dietten og i dietten tilsatt DHA (Figur 19). Ved 12°C var det en signifikant effekt av oljekilde, det var høyere astaxanthin konsentrasjon i tarm hos fisk som fikk fiskeolje ($p < 0,01$) mens det ikke var noen signifikant effekt av proteinkilde. Det var imidlertid en signifikant interaksjon mellom protein og oljekilde ($p < 0,05$). Ved 6°C var det høyest konsentrasjon av astaxanthin i tarmen hos fisk føret med PP+FO dietten, og lavest konsentrasjon i FM+PO dietten. Det var noe høyere astaxanthin konsentrasjon i tarmen på 6°C enn på 12°C ($p < 0,05$). Konsentrasjonen

av idoxanthin var som i lever høyere på 6 enn på 12°C, og det var også en økning i idoxanthin i lever ved bruk av planteolje på 6°C. Det var også høyere konsentrasjon av idoxanthin i dietter med fiskemel og i dietten tilsatt marine fosfolipider (Figur 19). I tarmen ble det i tillegg til astaxanthin og idoxanthin funnet to ukjente metabolitter, en med retensjonstid på ca 3 minutt og en med retensjonstid på 3.9 minutt. Konsentrasjonen av sistnevnte metabolitt og idoxanthin var positivt korrelert ($y = 0.23x + 0.074$, $R^2 = 0,71$).



Figur 19 Karotenoider i tarm, på 12 og 6°C. Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD (n=3). Signifikante forskjeller i innhold av astaxanthin mellom behandlinger for hver temperatur er indikert med store bokstaver, og forskjeller i idoxanthin er indikert med små bokstaver ($p < 0,05$). Dietter er gruppert etter sammenlignbar vekst på 12°C, TGC 2,8-3,1 til venstre, TGC 1,6-2,3 til høyre. FM=fiskemel, FO=fiskeolje, PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.

6.1.7 Genuttrykk i lever, muskel og tarm

Det ble gjort microarray analyser av lever og tarm av 6 fisk per diett fra følgende dietter:

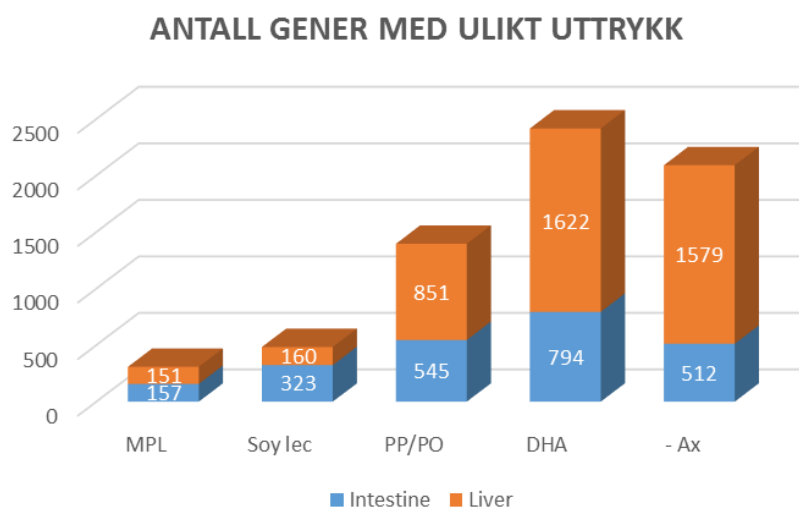
- Marin diett
- Lav marin diett (+ Ax)
- Lav marin diett uten astaxanthin (-Ax)
- Lav marin diett + marine fosfolipider (MPL)
- Lav marin diett + soyalecitin (Soy lec)
- Lav marin diett + DHA (+ DHA)

For å se på eventuelle effekter av astaxanthin i muskel ble genuttrykket muskel analysert i den lavmarine dietten og lavmarin diett uten astaxanthin.

Det ble funnet klare effekter av diett på genuttrykk i samtlige vev, og den mest tydelige forskjellen var mellom fisk føret marin diett eller lav marin diett tilsatt marine fosfolipider og de øvrige diettene. Sammenlignet med den marine dietten var antall gener med ulikt uttrykk høyest i lavmarin diett tilsatt DHA og lavest i dietten tilsatt MPL (Figur 20). Det ble også funnet klare effekter av astaxanthin i muskel, lever og tarm når man sammenlignet lavmarine dietter med og uten astaxanthin. Responsene var ulike i muskel, lever og tarm.

Tarm

I tarmen førte lavmarine dietter til økt uttrykk av gener som øker ved inflammasjon og stress, og en nedregulering av gener knyttet til lipid metabolisme og biotransformasjon (Figur 21). Tilsatt av marine fosfolipider til den lavmarine dietten normaliserte mange av responsene, og denne dietten var mest lik den marine i genuttrykk. En stimulering av syntese av steroider og terpenoider i lavmarine dietter indikerte mangel på omega-3 fettsyrer. Lavmarine dietter førte også til en ned-regulering av genuttrykk av gener involvert i syntese og transport av retinoider, slik som betakaroten 15,15-dioxygenase som spalter betakaroten til retinal som førte trinn i syntesen av A-vitamin i pattedyr (Figur 22). I diettene som ikke var tilsatt fosfolipid var det også en ned-regulering av retinol bindende protein II. I dietten tilsatt MPL var det mindre effekter på gener involvert i retinoidsyntese og transport, med unntak av en oppregulering av retinol saturase og retinol dehydrogenase som ikke var tilfelle i de andre lavmarine diettene. Fravær av astaxanthin i dietten reduserte genuttrykket av gener i retinoid-syntese og transport ytterligere sammenlignet med den lavmarine dietten med astaxanthin.



Figur 20 Antall gener med forskjellig uttrykk i lever og tarm hos fisk føret de ulike diettene. Den marine dietten er referansefôr. PP=planteprotein, PO=planteolje, soy lec = soyalecitin, MPL= marine fosfolipider, DHA = lav marin diett tilsatt DHA, -Ax = Lav marin diett uten astaxanthin.

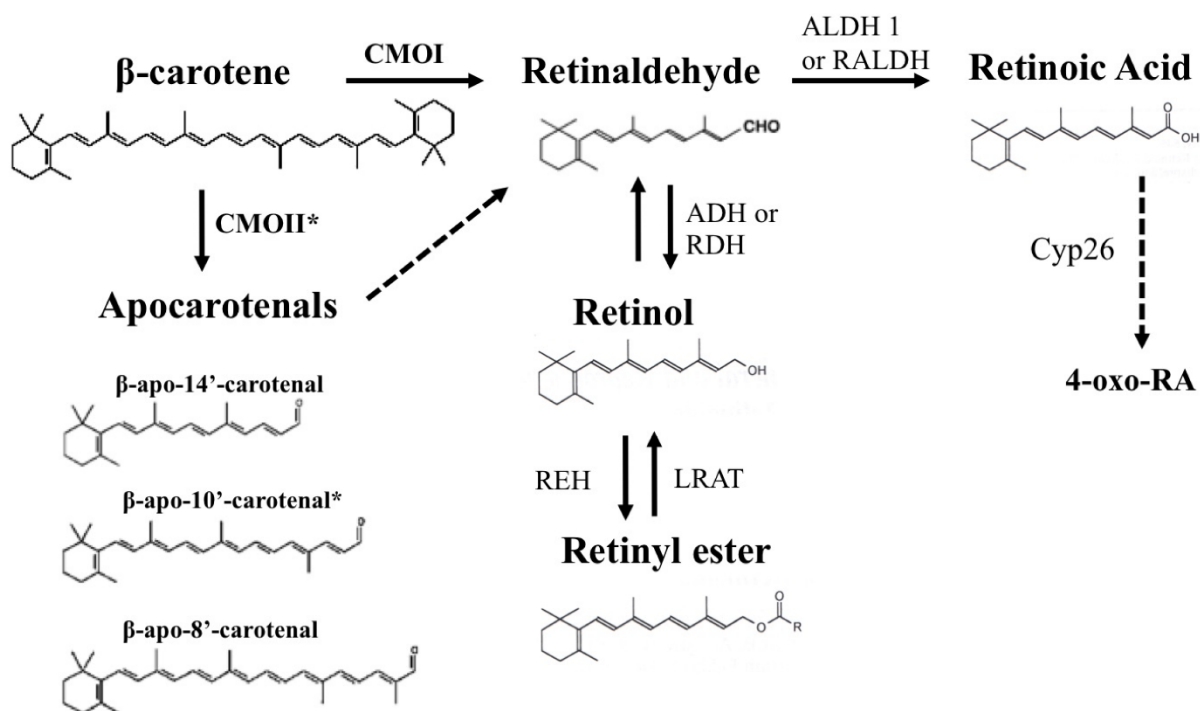


Figur 21 Gen-utrykk i tarm (midt-tarm) hos laks fôret de ulike diettene sammenlignet med laks fôret den marine dietten (n=6 fisk per behandling). Den marine dietten er referansefôr. Data er log₂-ekspressjons ratio. Søylen viser sum av funksjonelle grupper av gener, hvert bånd representerer ett gen.

A)

Gene	MPL	Soy lec	PP/PO	DHA	-Ax
Beta-carotene 15, 15-dioxygenase 2	-0.24	-1.25	-1.16	-1.29	-2.30
Beta-carotene 15,15'-monooxygenase	0.68	-1.68	-2.02	-3.67	-2.66
Beta-carotene dioxygenase 1	0.09	-1.64	-1.85	-2.87	-2.03
Epidermal retinol dehydrogenase 2	0.39	-0.53	-0.57	-1.18	-1.41
Retinol dehydrogenase 3	0.91	-0.76	-0.23	-0.51	-1.52
Retinol dehydrogenase 8b	-0.10	-0.62	-0.36	-1.03	-1.38
Retinol saturase	1.90	-0.17	-0.56	-0.77	-0.64
Retinol-binding protein II	-0.03	-0.37	-0.93	-1.72	-3.26

B)

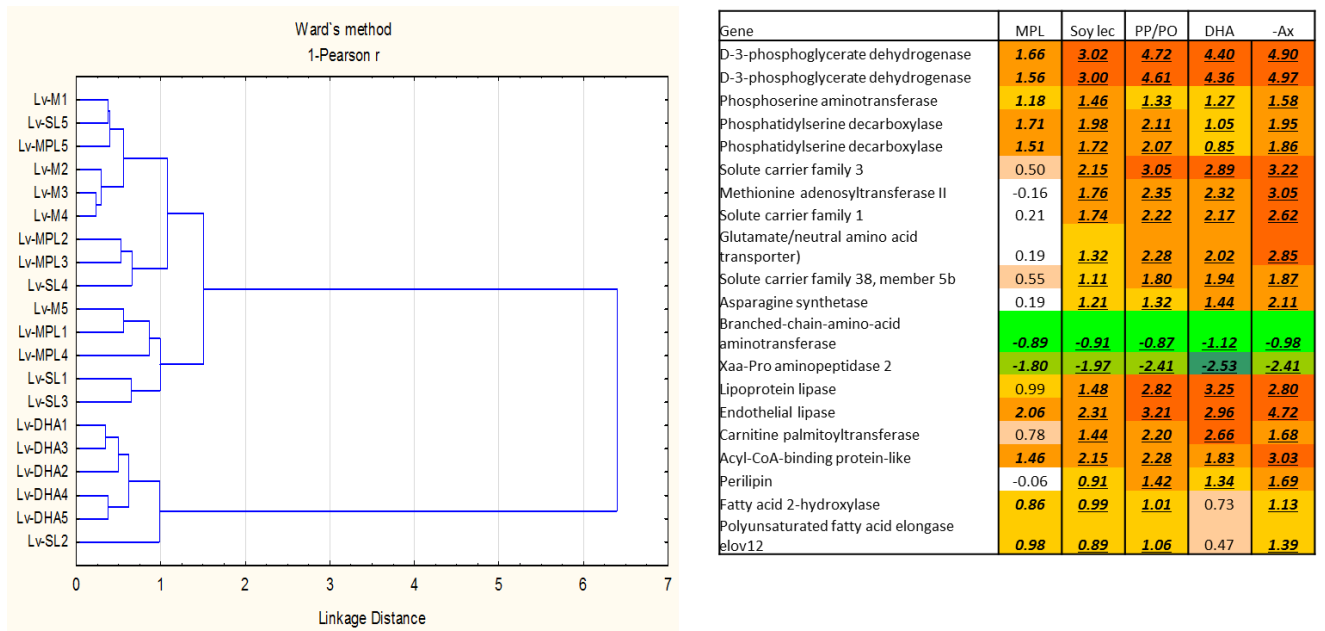


Figur 22 A) Gen-uttrykk i midt-tarm av gener involvert i retinoid syntese og transport i de ulike diettene sammenlignet med gen-uttrykk i den marine dietten. B) Oversikt over metabolisme av beta-karoten til retinol i pattedyr. β-carotene-15,15'-oxygenase (CMOI, = BCMO1 or BCO1), β-carotene 9',10'-oxygenase 2 (CMOII or BCDO2 or BCO2), aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH 1 or RALDH), Cyp26= cytochrome P450 (CYP) 26 family, retinol dehydrogenases (RDH), alcohol dehydrogenase (ADH), lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) (kilde:Shete og Quadro, 2013).

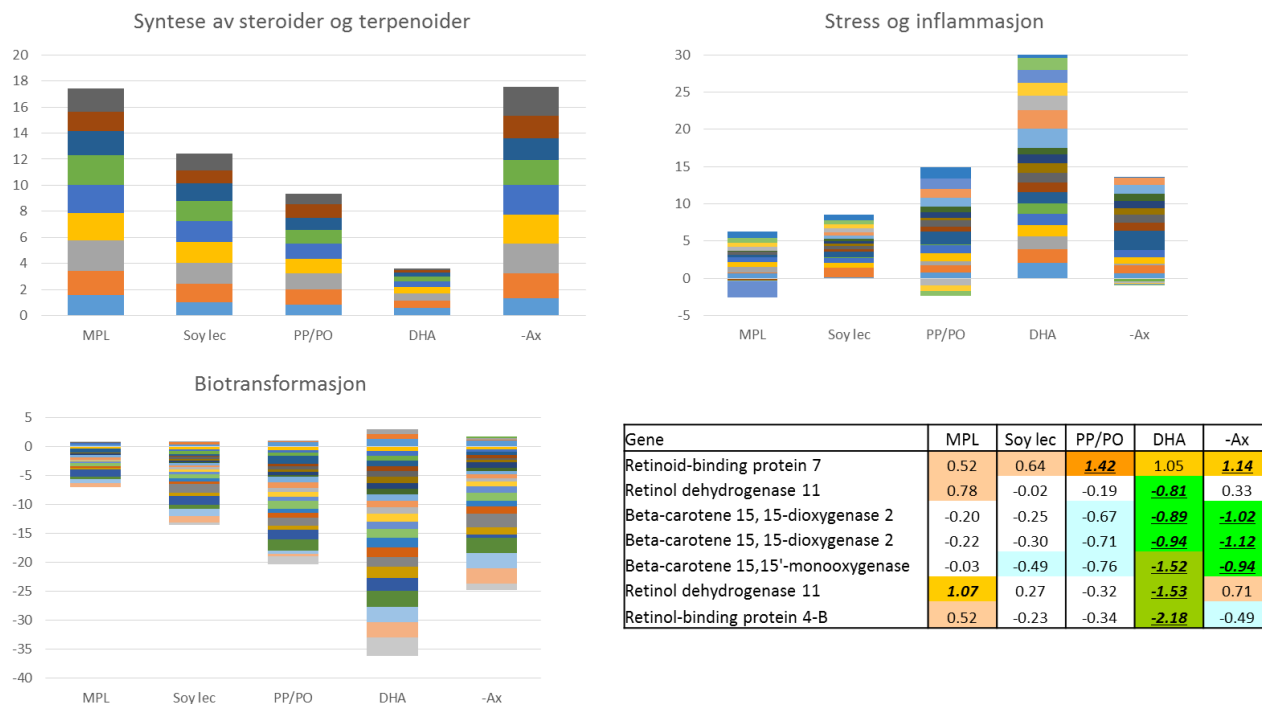
Lever

I lever førte lavmarine dietter til en oppregulering av gener knyttet til aminosyremetabolismen, spesielt til syntese av serin. Det var også en oppregulering av en rekke gener involvert i lipidmetabolisme. I lever var det gen-uttrykket i dietten tilsatt DHA som skilte seg mest fra de øvrige, diettene tilsatt MPL og soya-lecithin var mest sammenlignbare med den marine dietten (Figur 23). Med unntak av dietten tilsatt DHA hadde fisk føret de lavmarine diettene hadde tegn på omega-3 mangel,

indikert ved økt uttrykk av gener knyttet til syntese av steroider og terpenoider. Dietten med DHA skilte seg ut fra de øvrige med høyere uttrykk av gener relatert til stress og inflammasjon og lavere uttrykk av gener involvert i biotransformasjon (Figur 24). For gener involvert i retinoid-syntese og transport var det en nedregulering av samtlige gener involvert i syntese av vitamin A i dietten tilsatt DHA. I lever hos fisk føret en lavmarin diett uten astaxanthin var det en nedregulering av enzymene β,β 15,15 mono- og dioksygenaser som spalter beta-caroten (Figur 24). Alle lavmarine dietter hadde en oppregulering av retinolbindende protein i lever i varierende grad sammenlignet med den marine dietten.



Figur 23 Gen-uttrykk i lever hos laks føret de ulike diettene. Venstre figur: Cluster-analyse av gen-ekspressjonsprofiler. Høyre: Ulikt uttrykk av gener knyttet til aminosyre- og lipidmetabolisme sammenlignet med marin diett.

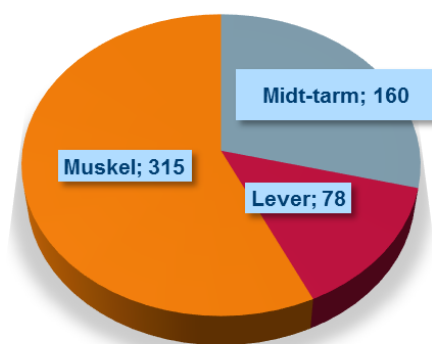


Figur 24 Gen-uttrykk i lever hos laks fôret de ulike diettene sammenlignet med laks fôret den marine dietten (n=6 fisk per behandling). Data er log₂-ekspressions ratio. Søylen viser sum av funksjonelle grupper av gener, hvert bånd representerer ett gen.

Effekter av astaxanthin-mangel på gen-uttrykk i tarm, lever og muskel

Fravær av astaxanthin i en lavmarin diett førte til en rekke endringer i gen-uttrykk i de undersøkte vevene. Responsen var forskjellig i muskel, lever og tarm, både i antall gener som var uttrykt forskjellig og hvilke typer gener som var påvirket i de ulike vevene. I muskel var totalt 315 gener uttrykt forskjellig, men i lever og tarm var henholdsvis 78 og 160 gener uttrykt forskjellig. (Figur 25).

Antall gener med ulikt uttrykk

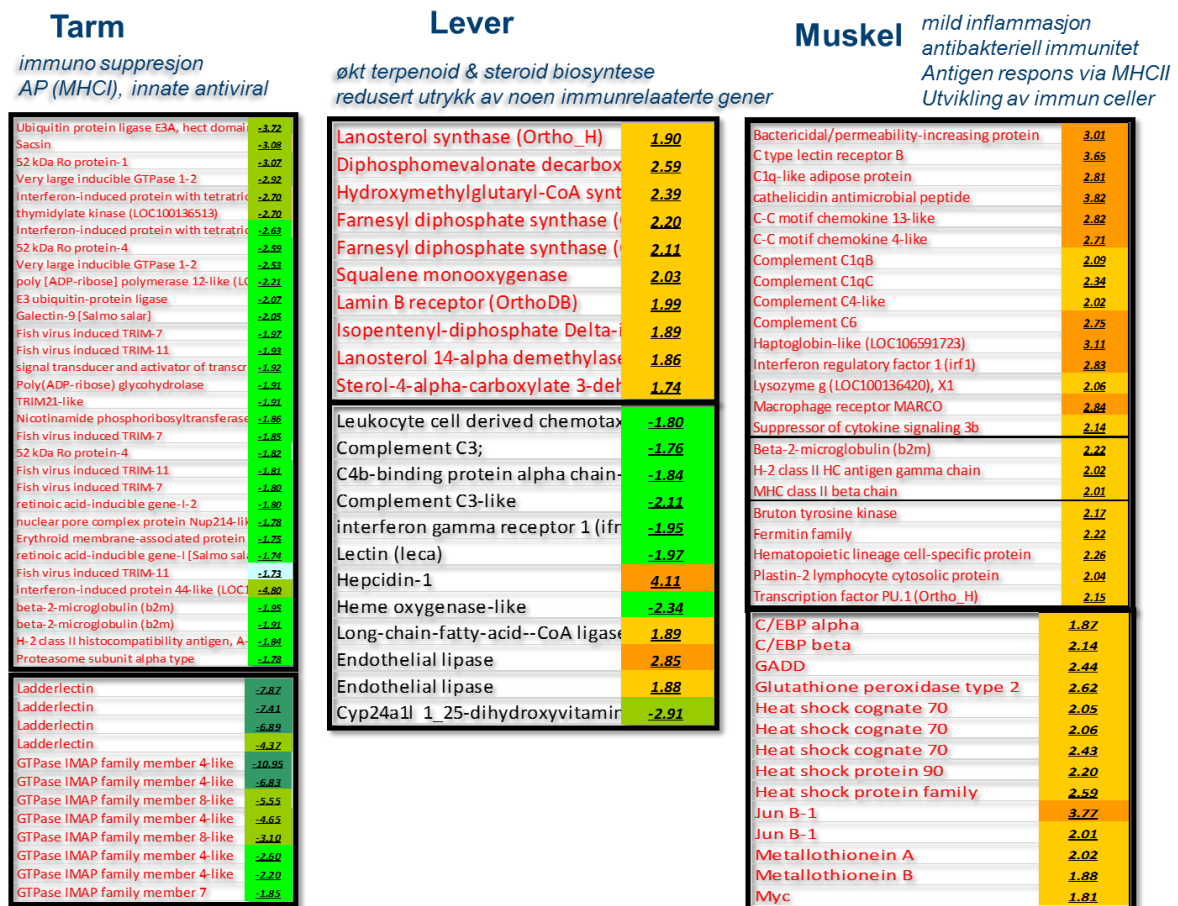


Figur 25 Antall gener med ulikt uttrykk i muskel, lever og tarm hos laks fôret en lavmarin diett med og uten astaxanthin.

I tarm var den største effekten av astaxanthin-mangel en nedregulering av gener involvert i immunforsvaret til laksen. Av de 160 genene med ulikt uttrykk i tarm var 134 nedregulert. Av disse var en relativt stor andel immun-relaterte gener (47 gener). Mange av disse er involvert i forsvar mot virus

(Figur 24). Det var også en markant nedregulering av gener som tilhører gruppen *ladder lectiner*. Lectiner er viktige komponenter i det uspesifikke immunforsvaret og kan også aktivere komplement systemet som er viktig som første forsvar mot patogener. Komplement systemet aktiveres ved at lectiner bindes til lipopolysakkarider på overflaten av bakterier (Hoover med flere 1998), og lectiner er vist å ha antimikrobielle og immunregulerende funksjoner i fisk (Ng med flere 2015). En annen gruppe gener med immunregulerende funksjon, *gimaps*, var også nedregulert i tarmen til fisk som ikke hadde fått astaxanthin. I pattedyr er *gimaps* nødvendige for utvikling og overlevelse av B og T celler (Webb med flere 2016, Datta med flere 2017,). Deres funksjon i fisk ikke er helt kartlagt, men det er sannsynlig at de har en immunstimulerende funksjon.

I lever var det færre gener som var påvirket av mangel på astaxanthin enn i tarm, og mest fremtredende var en økt syntese av steroider og terpenoider (Figur 26). Dette er også karakteristisk ved mangel på omega-3-fettsyrer. Det var også en nedregulering av noen gener relatert til immunforsvar i lever. Genet for enzymet *heme oxygenase* var også nedregulert, dette enzymet beskytter mot betennelse i lever hos pattedyr (Immenschuh med flere 2010, Origassa med flere 2013).



Figur 26 Responser fravær av astaxanthin i en lavmarin diett på gen-uttrykk i tarm, lever og muskel hos laks. Data er ekspresjons ratioer (folds).

Mangel på astaxanthin hadde størst effekt på gen-uttrykk i muskel, av de registrerte endringene var 265 gener oppregulert sammenlignet med fisk føret en diett med astaxanthin. Av de oppregulerte

genene utgjorde gener som induseres ved stress, samt gener relatert til immunforsvaret en stor andel, henholdsvis 15 og 119 gener (Figur 26). Av de oppregulerte stressinduserte genene kan nevnes *heat shock proteins*, *metallothioneins*, *myc* og *gadd*. De oppregulerte immunrelaterte genene tilhørte ulike funksjonelle grupper av immun-gener, gener for proteiner som reagerer og binder seg til antigener, som MCHI og MCHII var oppregulert, det samme var også gener spesifikke for lymfocytter (*btk*, *cd274*, *hcls1*, *hck*) og gener som koder for proteiner med betydning for celle-mobilitet og adhesjon av celler (*cd53*, *coronin*, *connexin*, *fermitin*).

Ut fra resultatene på genuttrykk i tarm, lever og muskel synes astaxanthin å ha viktige og ulike funksjoner i lever, tarm og muskel hos laks. Funksjonen er forskjellig i de ulike vevene, og den største effekten ble funnet i muskel, hvor gen-uttrykket samlet indikerte en mild betennelsesreaksjon og stressresponser. I lever var det størst effekt på steroid-syntese, mens i tarm dominerte nedregulering av immunresponser. Det må imidlertid påpekes at det var unormal fett-akkumulering i lever og tarm i begge dietter, noe som kan indusere inflammasjon og stress-responser i cellene. Det er mulig at man ikke ville fått samme respons på mangel på astaxanthin i en marin diett som ga normal fettakkumulering i lever og tarm.

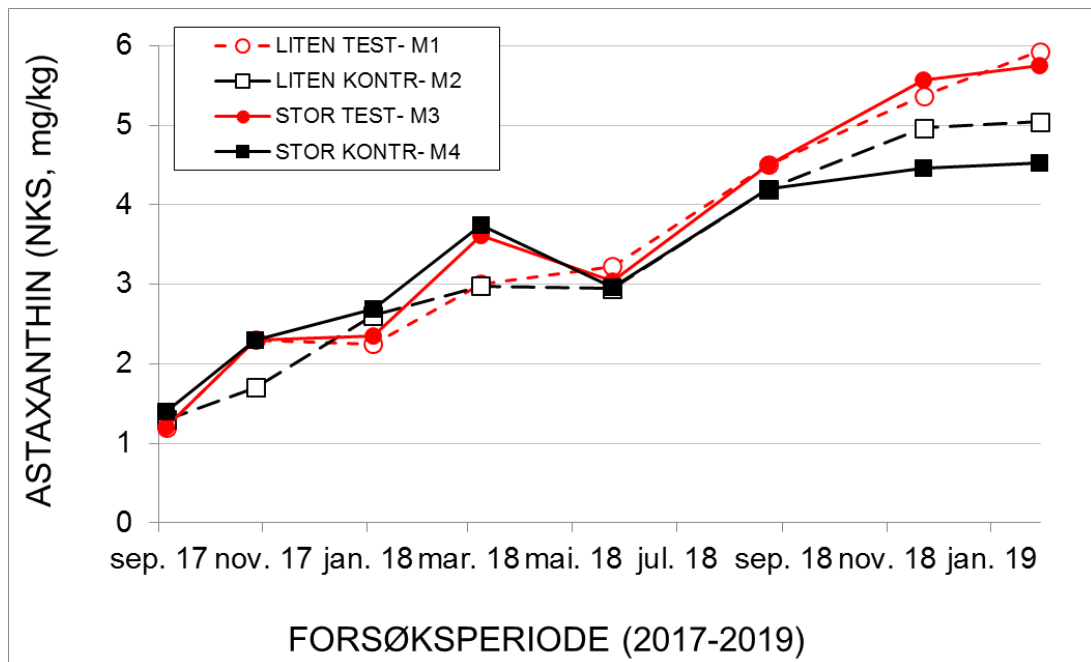
6.2 Delmål 2: Utnyttelse av astaxanthin i en kommersiell produksjonssyklus

6.2.1 Resultater

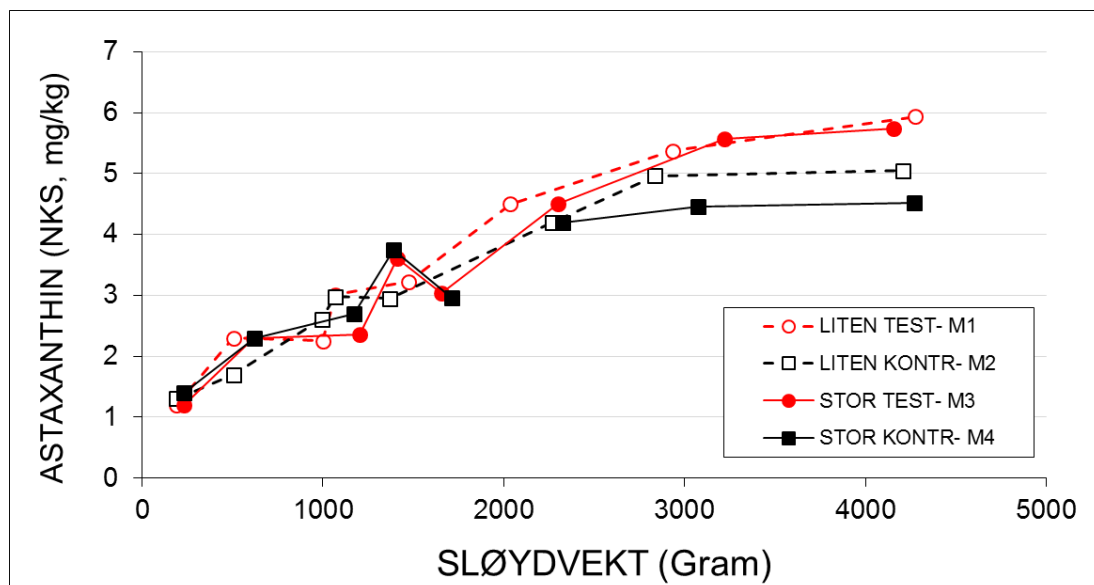
Astaxanthin-nivået i muskel økte i løpet av forsøksperioden i takt med økende fiskevekt (fig 27 og 28). Vi kan se at den store smolten innen både test og kontrollgruppen hadde en nedgang i astaxanthin-nivå fra mars til mai 2018. Dette ble registret etter at PD ble påvist og kan være relatert til denne sykdomspåvisningen. Det var ingen signifikante forskjeller mellom forsøk- og kontrollgruppen i astaxanthin-nivå frem til forsøksslutt. Ved det siste uttak i januar 2019 ble det observert nesten signifikant økt astaxanthin-nivå (test: $5,6 \pm 0,1$ mg/kg vs. kontroll: $4,8 \pm 0,3$ mg/kg, $P=0,06$) i testgruppen sammenliknet med kontrollgruppen. Testgruppen hadde numerisk sett høyere astaxanthin-nivå også ved uttakene i august og november 2018. Dette skyldes trolig økningen i astaxanthin-nivået i fôret til testgruppen fra 50 til 70 mg/kg i slutten av juli 2018. Det har tidligere blitt vist at å øke pigmentinnholdet i fôret utover 50 mg/kg har ingen eller liten effekt for å øke pigmentinnholdet i muskel (Torrison m.fl. 1995). De følgende observasjonene kan indikere at det å øke astaxanthin nivået i fôret over 50 mg/kg har en effekt, og da kanskje spesielt om høsten når fisken lagrer fett. Dette kan være viktig da den stadig kortere produksjonstiden i sjø har gjort at knapt noen laks går mer enn en høst i sjø når man ser bort i fra den innledende smoltperioden. Det skal nevnes at de kjemiske analysene av fôret viste at kontroll-fôret brukt fra mars til juli 2018 hadde 8 mg/kg mer astaxanthin sammenliknet med test-fôret, samtidig som at kontrollfôret brukt fra juli til januar 2019 kun hadde 7 mg/kg mindre astaxanthin sammenliknet med testfôret brukt i samme periode. Det skal likevel understrekes at dette kun er analyserte verdier fra en batch med fôr, og ikke av alle batchene for de respektive fôrene innen hver pelletstørrelse.

Til tross for hyppige avlusninger og nedgang i temperatur, ser vi en god innfarging i muskel i løpet av høst og vinterperioden i 2018. Idoxanthin-nivået i muskel var høyest etter utsett og ble redusert etter hvert som fisken vokste (fig 29 og 30). Det ble ikke funnet noen forskjeller i idoxanthin-nivå i muskel mellom test- og kontrollgruppen. Merd 3 hadde et lavere nivå av idoxanthin sammenliknet med alle de andre merdene etter sjøutsett, men fulgte samme mønsteret som de andre merdene.

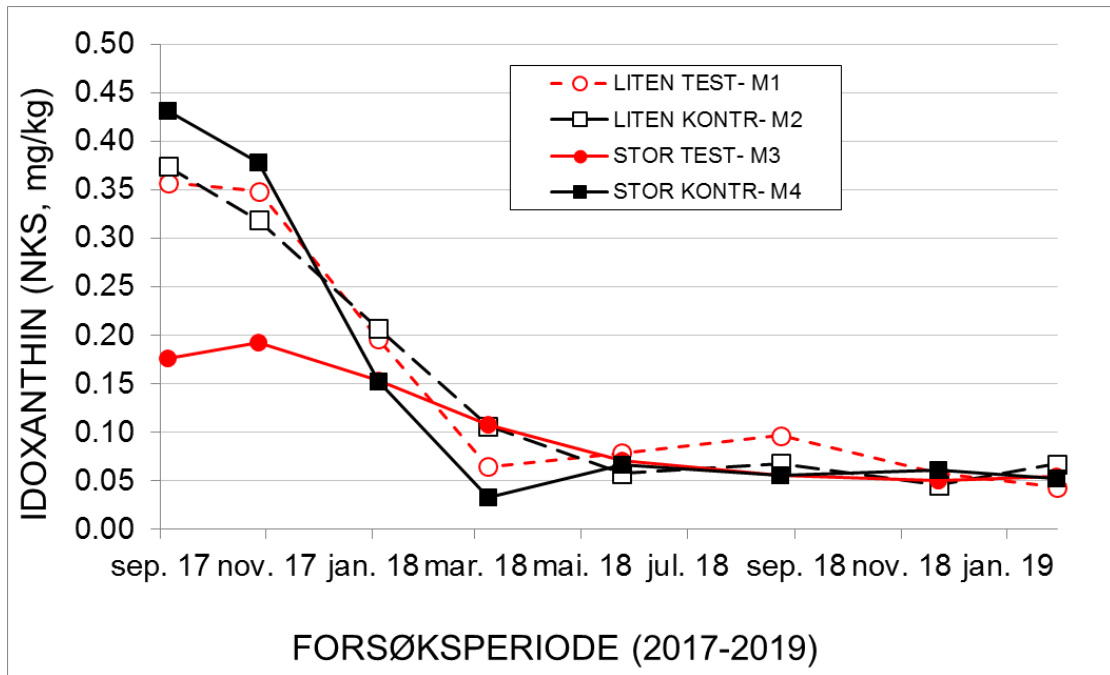
Fettinnholdet i muskel økte i løpet av forsøksperioden (figur 31 og 32) og i takt med økende fiskevekt, slik som pigmentnivået. Det var ingen forskjeller i fettinnhold mellom test- og kontrollgruppen gjennom forsøksperioden.



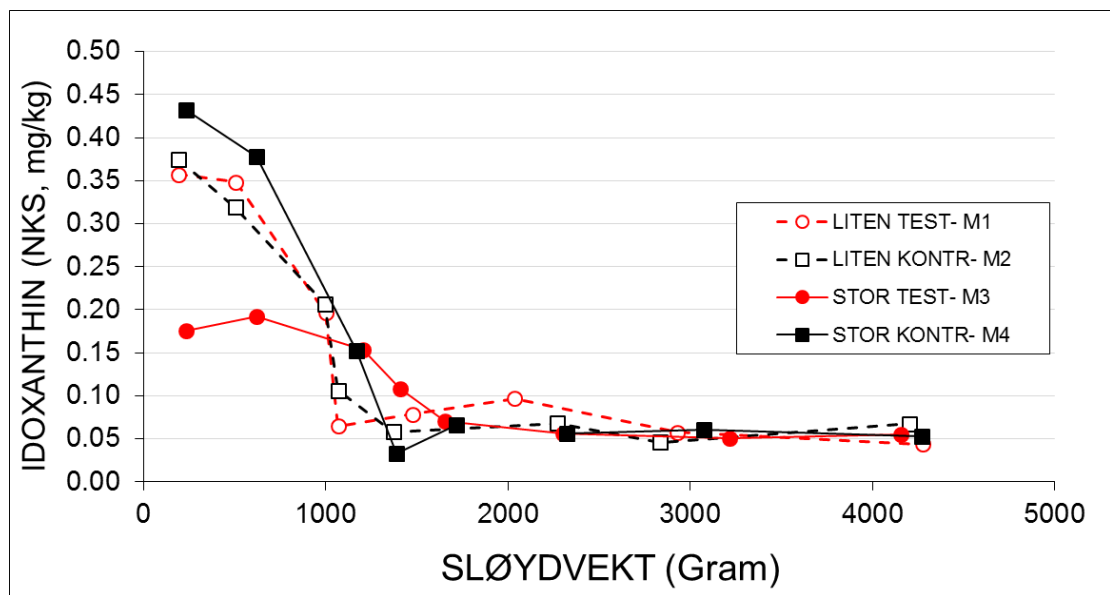
Figur 27 Astaxanthin (mg/kg) i NKS for fisk tatt ut til analyser i de ulike merdene gjennom forsøksperioden. Verdier er gjennomsnitt per merd.



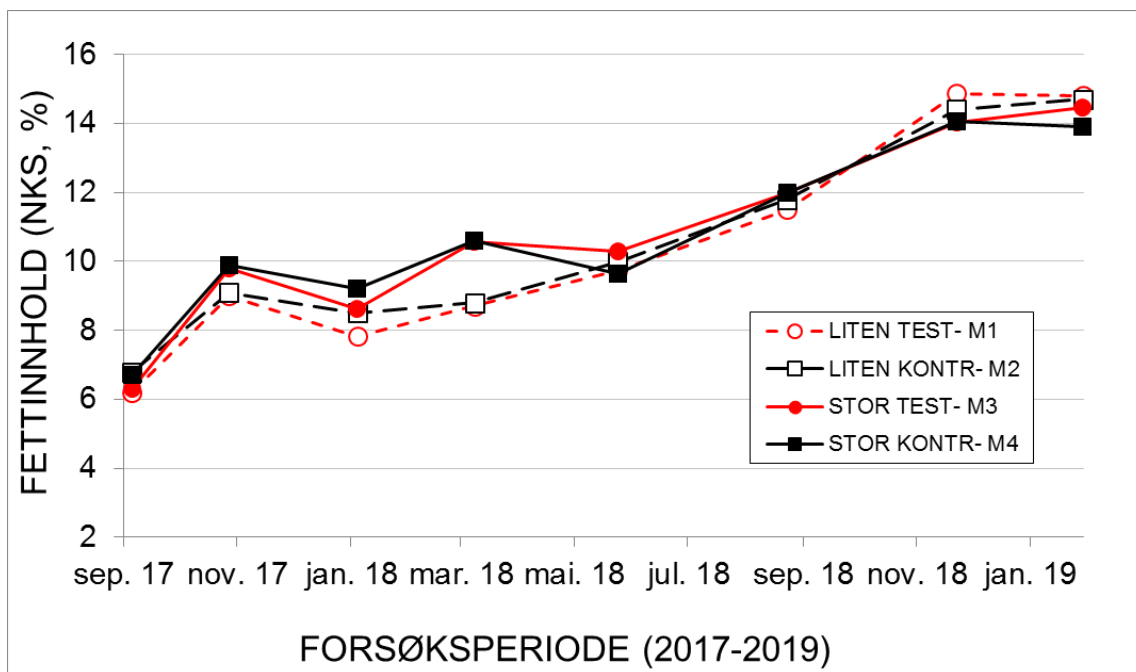
Figur 28 Astaxanthin (mg/kg) i NKS basert på sløydvekt av fisken tatt ut for analyser. Verdier er gjennomsnitt per merd.



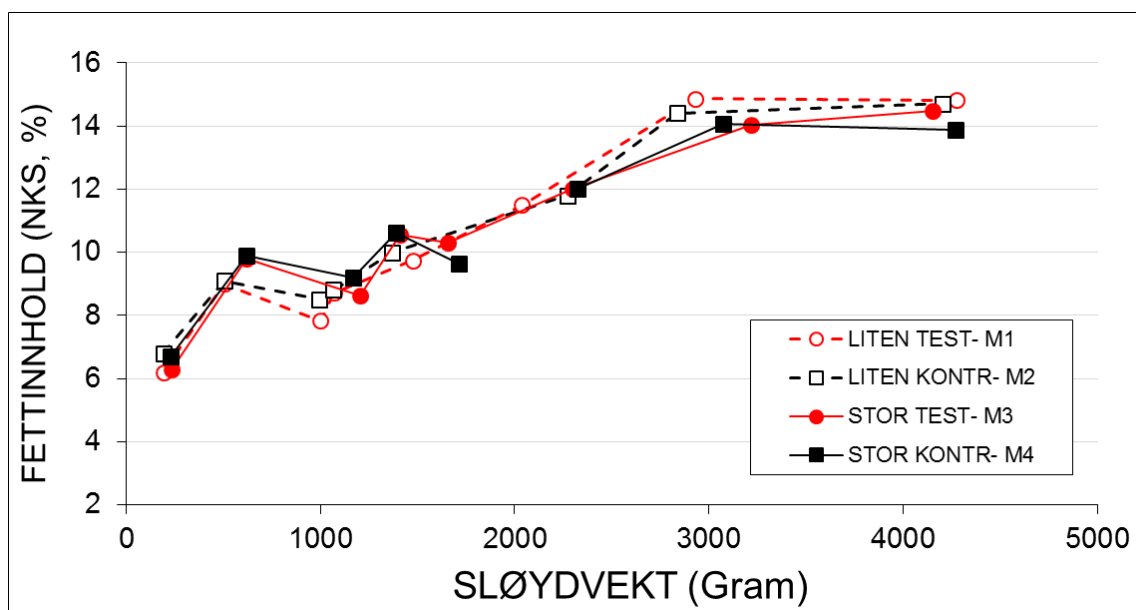
Figur 29 Idoxanthin (mg/kg) i NKS for fisk tatt ut til analyser i de ulike merdene gjennom forsøksperioden. Verdier er gjennomsnitt per merd.



Figur 30 Idoxanthin (mg/kg) i NKS basert på sløydvekt av fisken tatt ut for analyser. Verdier er gjennomsnitt per merd.

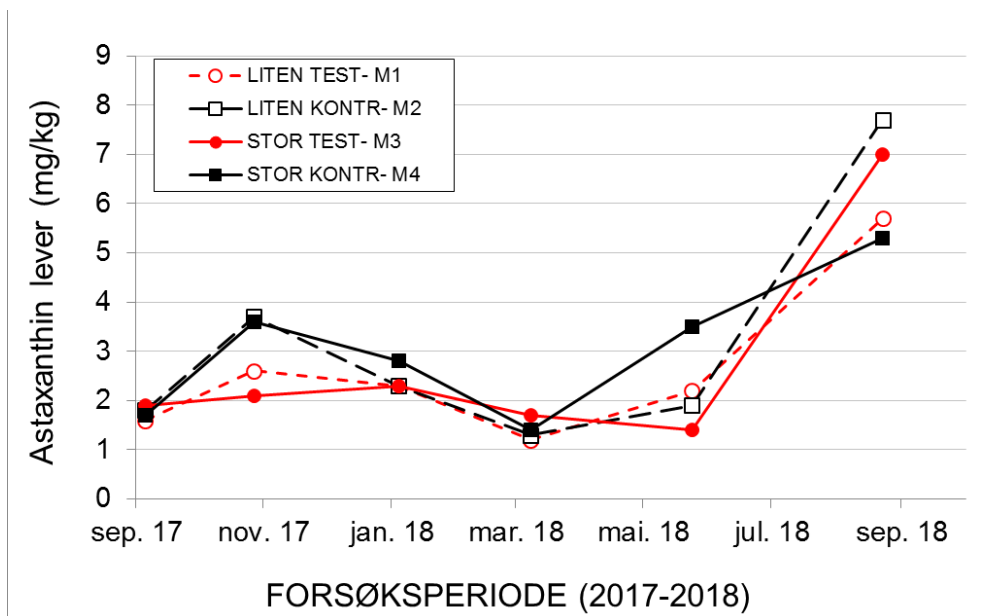


Figur 31 Fatt (%) i NKS for fisk tatt ut til analyser i de ulike merdene gjennom forsøksperioden. Verdier er gjennomsnitt per merd.

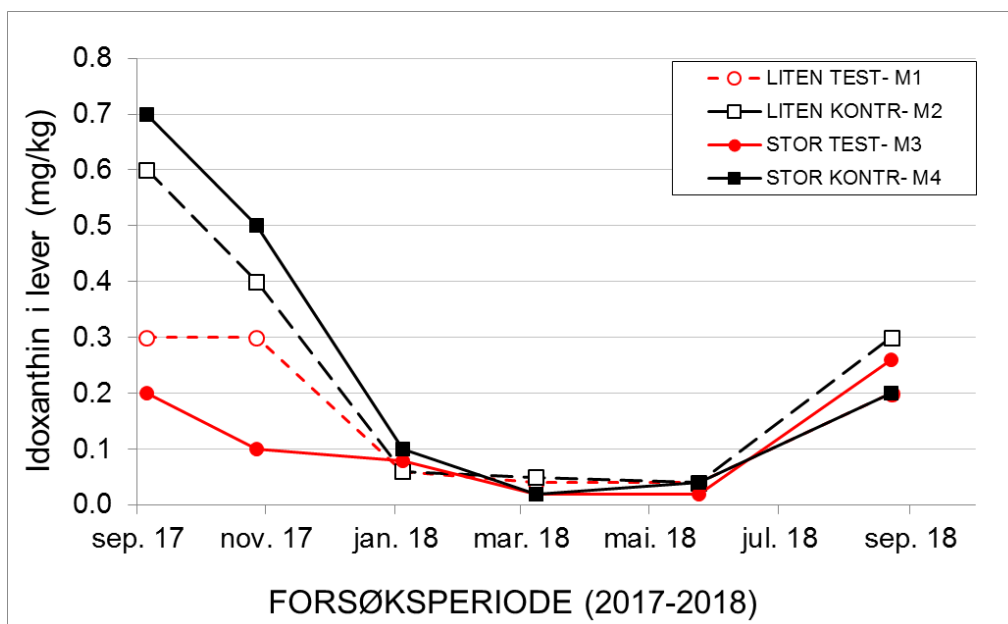


Figur 32 Fatt (%) i NKS basert på sløydvekt av fisken tatt ut for analyser. Verdier er gjennomsnitt per merd.

Figur 33 og 34 viser henholdsvis astaxanthin og idoxanthin-nivået i lever fra utsett og frem til august 2018. Det var et signifikant ($P = 0,04$) lavere nivå av astaxanthin i lever hos fisk i testmerdene sammenliknet med kontroll ved uttaket i slutten av oktober 2017. Det ble observert en økning i astaxanthin nivået i lever fra mai til august 2018 hos alle merder. Idoxanthin-nivået i lever fulgte samme mønster som idoxanthin-nivået muskel i begynnelsen av forsøksperioden, ved at det var høyt etter utsett og ble gradvis redusert frem til våren 2018. Etter dette ble observert en økning i idoxanthin fra mai til august 2018, i likhet med nivået av astaxanthin. Testgruppen hadde et signifikant ($P = 0,03$) lavere nivå av idoxanthin ved utsett, sammenliknet med kontrollgruppen.



Figur 33 Astaxanthin (mg/kg) i lever for fisk tatt ut til analyser i de ulike merdene gjennom forsøksperioden. Verdier er gjennomsnitt per merd.



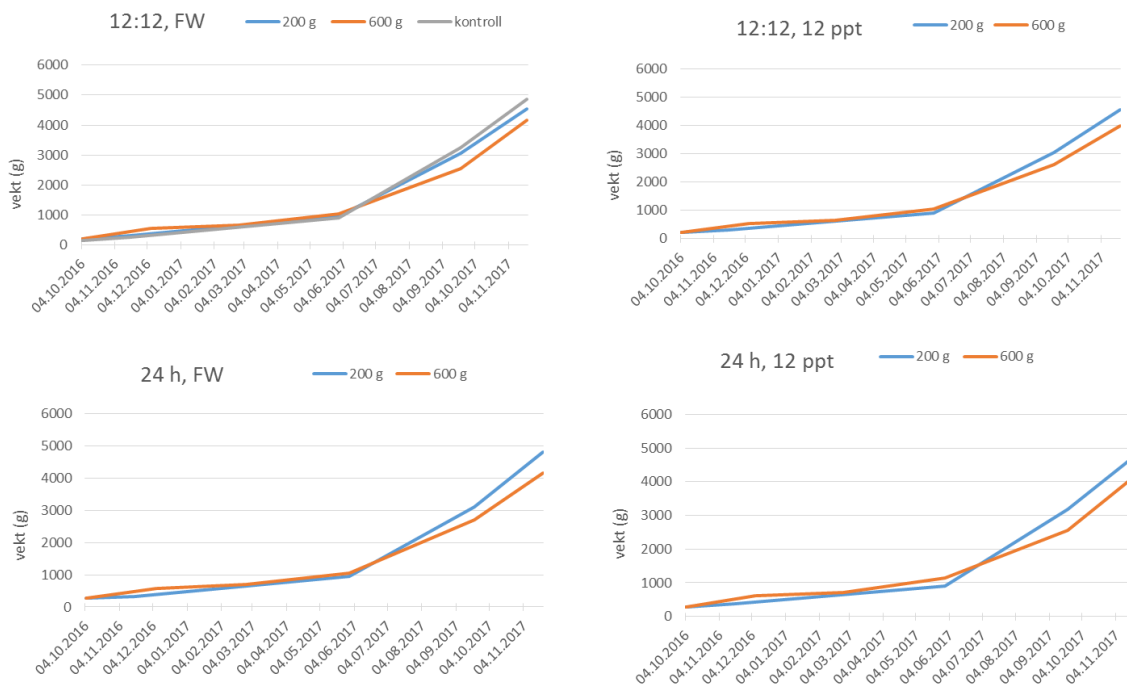
Figur 34 Idoxanthin (mg/kg) i lever for fisk tatt ut til analyser i de ulike merdene gjennom forsøksperioden. Verdier er gjennomsnitt per merd.

6.3 Delmål 3: Effekt av ulike smoltproduksjonsprotokoller på utnyttelse av astaxanthin

6.3.1 Vekst

Kontrollfisk som ble satt ut på 100 g ($100,4 \pm 4,5$ g, CF $1,21 \pm 0,02$) hadde en SGR i RAS på $1,8 (\pm 0,06)$ og TGC $1,82 (\pm 0,06)$. Fisk som gikk på kontinuerlig lys i RAS vokste bedre enn den som fikk 12:12 i 6 uker og de hadde høyere kondisjonsfaktor ($p < 0,001$). Ved utsett av 100 g lysstyrt smolt den 23.08 var fisken som hadde gått på 24h i snitt 151 g ($\pm 7,7$) med en CF på $1,34 (\pm 0,02)$ og SGR var $2,3 (\pm 0,08)$ og TGC $2,5 (\pm 0,11)$. Frem til 200 g var det også en signifikant positiv effekt av 12 ppt på vekst ($p < 0,05$), mens det ved 600 g ikke lenger var en effekt av salinitet på vekt eller kondisjonsfaktor, men fortsatt en positiv effekt av 24h på vekst ($p < 0,05$).

Vektutvikling i forsøket er vist i figur 35. Den første perioden etter utsett i sjø var det en negativ effekt av kontinuerlig lys (24h) sammenlignet med lysstyrt fisk på fôrinntak og fôrutnyttelse, mens det ikke var noen effekt av å bruke brakkevann i RAS. Fisk satt ut ved 600 g hadde svært dårlig fôrinntak de første ukene etter sjøutsett, mens fisk satt ut på 100 og 200 g begynte å spise kort tid etter utsett. Vekst i sjøfasen var først og fremst påvirket av størrelse ved utsett, fisk satt ut ved 600 g hadde lavere TGC i sjøfasen (2,9) enn fisk satt ut ved 100 og 200 g (3,3). Hovedårsaken var dårligere vekst i løpet av sommeren for 600 g utsett (TGC i snitt på 2,7) enn for 100 og 200 g utsett (TGC på 3,8 og 3,7). Ved avslutning av forsøket var fisk satt ut ved 600 g i snitt 4,12 kg, mens fisk satt ut ved 100 og 200 g var 4,87 og 4,67 kg.



Figur 35 Vektutvikling i løpet av forsøket (fra oktober 2016 til november 2017) for de ulike behandlingene og utsett. Verdier er basert på samleprøver av 10 individ per not, Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD (n=2).

6.3.2 Pigmentering

Innholdet av astaxanthin i hel fisk økte fra 200 til 600 g i RAS ($p < 0,01$) (Tabell 5). Konsentrasjonen av astaxanthin-metabolitten idoxanthin var høyere i fisk som ikke var lysstyrt (24h) ved 200 g, mens det var ingen effekt av behandling ved 600 g. Andelen idoxanthin (i % av totalt karotenoid) avtok fra 200 til 600 g i RAS ($p < 0,05$).

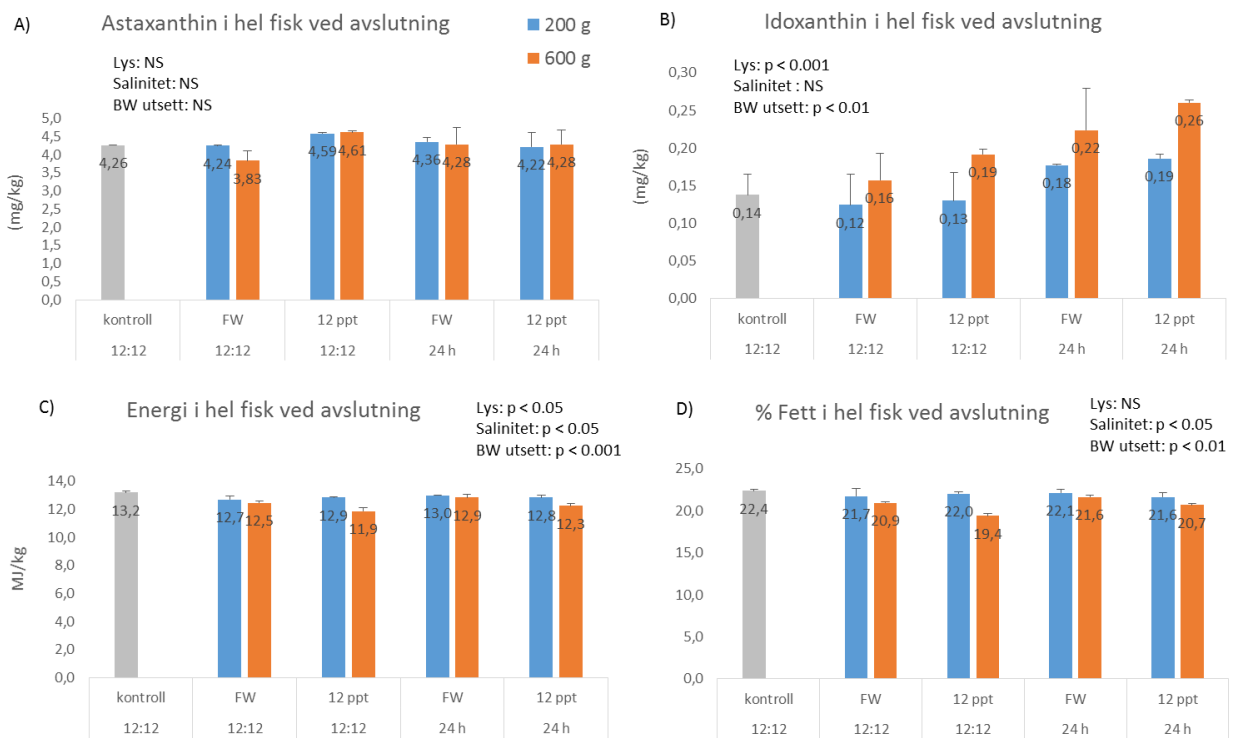
For både 200 og 600 g utsett var det ingen endring i innholdet av astaxanthin de første 5 ukene i sjø. For 200 g utsett var det en signifikant nedgang i innholdet av idoxanthin i løpet av de første 5 ukene i sjø, mens det ikke var noen endring de første 5 ukene i 600 g utsett. Fôrintaket og vekst var også veldig dårlig i denne perioden for 600 g utsett, mens 100 og 200 g utsett begynte å spise kort tid etter utsett. Etter 5 uker i sjø var det ingen effekt av behandling i RAS på konsentrasjonen av idoxanthin i 200 g fisk, mens det for 600 g fisk var en signifikant høyere konsentrasjon av idoxanthin i fisk som hadde gått på 24 h og 12 ppt i RAS før utsett sammenlignet med de andre behandlingene ($p < 0,01$, interaksjon lysperiode*salinitet). Ved avslutning av forsøket når fisken var mellom 4,2-4,8 kg var det ingen forskjeller mellom gruppene i innhold av astaxanthin i hel fisk, men fisk som hadde gått på 24 h i RAS hadde fortsatt litt høyere innhold av idoxanthin sammenlignet med de som var lysstyrt ($p < 0,001$). Fisk satt ut i sjø ved 600 g hadde høyere idoxanthin ($p < 0,01$) og lavere energi- og fettinnhold sammenlignet med fisk satt ut ved 100 g og 200 g ($p < 0,01$, Figur 36). Det var også en effekt av lysbehandling i RAS på energi i hel fisk ved slakt, fisk som ikke var lysstyrt (24 h) hadde litt høyere energi-innhold, for fett var det samme trend, men forskjellen var ikke signifikant ($p = 0,11$). Fisk som gikk på ferskvann i RAS hadde også litt lavere astaxanthin enn de som gikk på 12 ppt, men forskjellen var ikke signifikant ($p = 0,12$).

I RAS ble pigment målt i NQC (Norwegian quality cut) ved utsett av 200 og 600 g fisk. I sjø ble pigment målt 5 uker etter utsett og fett ble målt i NQC i mai, september og november 2017. Ved utsett både ved 200 og 600 g var det ingen effekt av behandling i RAS på astaxanthin i NQC, men som i hel fisk var det høyere idoxanthin i NQC fra fisk som hadde gått på kontinuerlig lys (Tabell) ($p < 0,05$). Etter 5 uker i sjø var det en tendens til høyere innhold av astaxanthin i NQC i 100 g utsett sammenlignet med 200 g ($p = 0,09$). I begge disse gruppene hadde innholdet av astaxanthin i NQC økt signifikant de første 5 ukene i sjø ($p < 0,001$). Innholdet av astaxanthin i NQC var høyere enn ved overføring til sjø ($p < 0,01$). For fisk satt ut på 600 g var det ingen signifikant endring i astaxanthin i NQC fra utsett og etter 5 uker i sjø. Det var en tendens til at fisk som hadde gått på 12 ppt i RAS hadde høyere astaxanthin i NQC etter 5 uker i sjø ($p = 0,09$). Mengden idoxanthin i NQC gikk ned etter overføring til sjø både i fisk satt ut på 100, 200 og 600 g ($p < 0,001$).

I løpet av vinteren og våren økte pigmentnivået i fisken til mellom 3-4 mg/kg ved uttaket i mai når fisken i snitt var rundt 1 kg (Figur 37A, 38A). I denne perioden vokste 200 og 600 g utsett tilnærmet like godt (TGC på 3,4 og 3,3), men kontrollgruppa hadde en TGC på 3,8. Det var en signifikant effekt av vekt ved utsett på astaxanthin i NQC ($p < 0,001$). Høyest astaxanthin-konsentrasjon i NQC hadde kontrollfisken, og 600 g utsett hadde lavest konsentrasjon, til tross for at den var størst på dette tidspunktet. Motsatt var det for idoxanthin, det var lavest konsentrasjon i 100 g utsett og høyest i 600 g utsett (Figur 37B, 38A, $p < 0,001$). Det var fortsatt høyere idoxanthin i fisk som hadde gått på kontinuerlig lys i RAS, mens lysbehandling og salinitet ikke hadde noen effekt på astaxanthin konsentrasjonen.

Tabell 5 Innhold av astaxanthin (mg/kg) og metabolitten idoxanthin (mg/kg og % av totalt karotenoid) i hel fisk i RAS og etter 5 uker i sjø. Verdier er gjennomsnitt av 2 kar ±SD. Analysene ble gjort på samleprøver av 10 fisk per kar.

Uttak	Lysperiode	Salinitet	Astaxanthin	Idoxanthin	% idoxanthin
40 g		0 ppt	< 0,1	< 0,1	-
100 g RAS	12:12	0 ppt	0,20 ± 0,00	0,10 ± 0,00	33,3 ± 1,0
	24 h	0 ppt	0,12 ± 0,06	0,07 ± 0,01	38,0 ± 12,2
200 g RAS	12:12	0 ppt	0,55 ± 0,07	0,20 ± 0,00	26,8 ± 2,5
	12:12	12 ppt	0,55 ± 0,06	0,25 ± 0,07	31,3 ± 8,8
	24 h	0 ppt	0,70 ± 0,00	0,40 ± 0,00	36,4 ± 0,0
	24 h	12 ppt	0,65 ± 0,21	0,50 ± 0,14	43,9 ± 10,5
600 g RAS	12:12	0 ppt	0,74 ± 0,01	0,27 ± 0,00	26,9 ± 0,3
	12:12	12 ppt	0,91 ± 0,13	0,30 ± 0,07	25,0 ± 6,8
	24 h	0 ppt	0,82 ± 0,22	0,31 ± 0,04	27,6 ± 2,8
	24 h	12 ppt	0,93 ± 0,09	0,30 ± 0,12	24,4 ± 6,4
200 g 5 u sjø	12:12	0 ppt	0,90 ± 0,21	0,26 ± 0,05	22,9 ± 8,0
	12:12	12 ppt	0,77 ± 0,02	0,18 ± 0,06	18,8 ± 4,6
	24 h	0 ppt	0,66 ± 0,07	0,23 ± 0,06	25,3 ± 7,3
	24 h	12 ppt	0,40 ± 0,10	0,15 ± 0,05	28,7 ± 1,3
600 g 5 u sjø	12:12	0 ppt	0,81 ± 0,06	0,35 ± 0,03	30,0 ± 0,3
	12:12	12 ppt	0,90 ± 0,29	0,30 ± 0,09	25,0 ± 0,0
	24 h	0 ppt	0,43 ± 0,22	0,15 ± 0,04	27,1 ± 4,9
	24 h	12 ppt	0,90 ± 0,21	0,55 ± 0,04	38,3 ± 4,8



Figur 36 A) Astaxanthin, B) Idoxanthin, C), Energi, og D) fett i hel fisk ved avslutning av forsøket i November 2017. Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD (n=2).

Tabell 6 Innhold av astaxanthin (mg/kg) og metabolitten idoxanthin (mg/kg og % av totalt karotenoid) i NQC i RAS og etter 5 uker i sjø. Verdier er gjennomsnitt av 2 kar ±SD. Analysene ble gjort på samleprøver av 10 fisk per kar.

Uttak	Lysperiode	Salinitet	Astaxanthin	Idoxanthin	% Idoxanthin
200 g RAS	12:12	0 ppt	0,82 ± 0,13	0,44 ± 0,08	35,0 ± 0,5
	12:12	12 ppt	0,62 ± 0,09	0,49 ± 0,06	44,0 ± 6,3
	24 h	0 ppt	0,68 ± 0,25	0,86 ± 0,16	56,4 ± 9,7
	24 h	12 ppt	0,77 ± 0,24	0,89 ± 0,08	54,3 ± 13,5
600 g RAS	12:12	0 ppt	1,51 ± 0,17	0,48 ± 0,03	24,3 ± 1,1
	12:12	12 ppt	1,72 ± 0,29	0,49 ± 0,20	22,5 ± 9,8
	24 h	0 ppt	1,34 ± 0,17	0,82 ± 0,17	37,9 ± 1,2
	24 h	12 ppt	1,74 ± 0,54	0,72 ± 0,10	30,2 ± 9,4
100 g 5 u sjø	12:12	0 ppt	1,78 ± 0,07	0,34 ± 0,04	15,9 ± 2,2
200 g 5 u sjø	12:12	0 ppt	1,54 ± 0,19	0,32 ± 0,09	17,1 ± 2,1
	12:12	12 ppt	1,24 ± 0,14	0,40 ± 0,04	24,4 ± 3,9
	24 h	0 ppt	1,17 ± 0,03	0,78 ± 0,02	40,2 ± 0,1
	24 h	12 ppt	1,49 ± 0,14	0,43 ± 0,05	26,1 ± 0,2
600 g 5 u sjø	12:12	0 ppt	1,27 ± 0,39	0,17 ± 0,03	13,7 ± 5,88
	12:12	12 ppt	1,51 ± 0,29	0,52 ± 0,30	22,4 ± 7,94
	24 h	0 ppt	1,07 ± 0,11	0,33 ± 0,20	22,3 ± 9,21
	24 h	12 ppt	1,21 ± 0,03	0,34 ± 0,00	22,1 ± 0,55

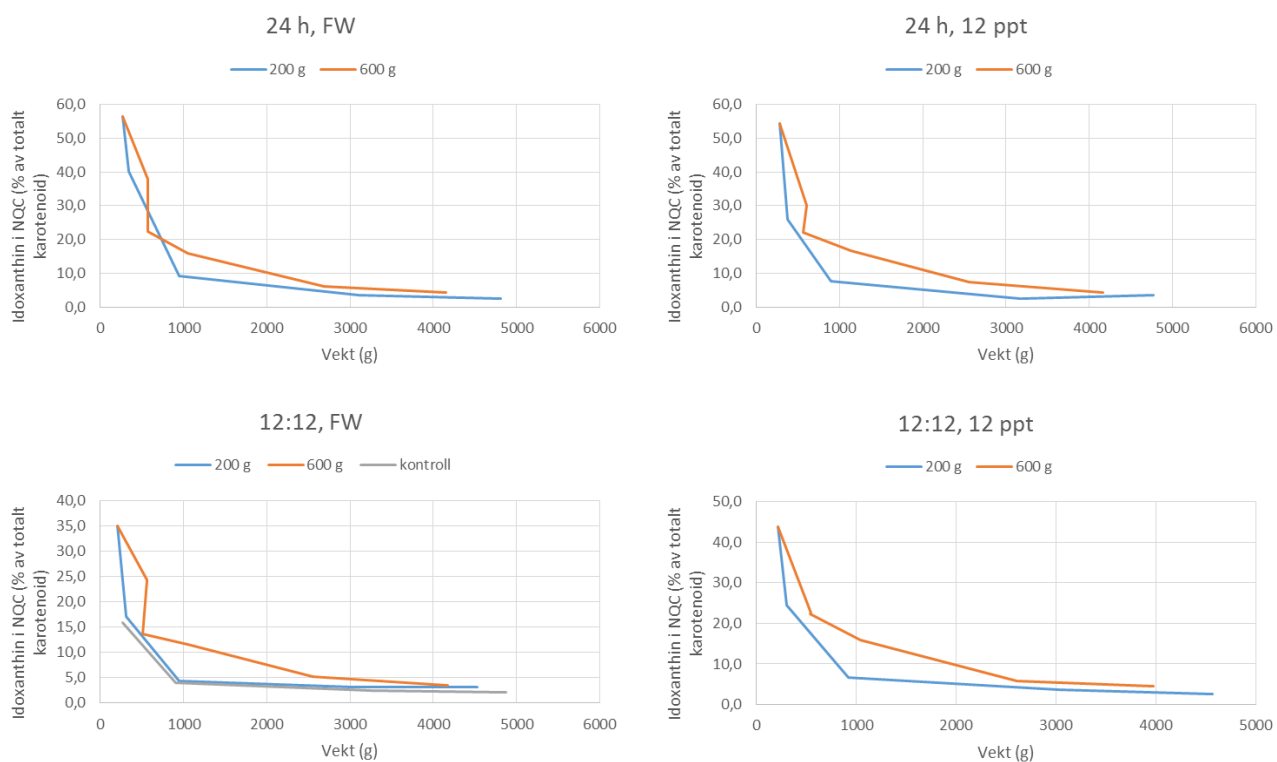
I løpet av sommeren vokste 100 og 200 g utsettet svært bra (TGC henholdsvis 3,8 og 3,7), mens 600 g fisken hadde dårligere vekst (TGC i snitt 2,7), og var derfor mindre enn de andre utsettene i september 2017. Gjennomsnittsvekt for 200 g utsettet var på 3090 g og for 600 g utsettet 2600 g, mens kontrollfisken veide 3250 g i september. Astaxanthin i NQC hadde økt siden uttaket i mai, og var i snitt 5,8 mg/kg. Det var nå høyest astaxanthin konsentrasjon i NQC hos 200 g utsettet ($p < 0,001$), mens det var ingen forskjell mellom 100 og 600 g utsettene. Innholdet av idoxanthin hadde falt betraktelig siden uttaket i mai i alle grupper, og lå nå mellom 2,5 og 6 % av totalt karotenoid i NQC (Figur 38B). Idoxanthin konsentrasjonen var lavest i 100 g utsettet, og høyest i 600 g utsettet ($p < 0,0001$). Fettinnholdet i NQC hadde også økt siden mai, og var nå på mellom 15-19 %. Fettinnholdet var høyest i 100 g utsettet, og lavest i 600 g utsettet (Figur 38B, $p < 0,001$).

Ved avslutning av forsøket 17.-19. november 2017 var det ingen signifikante effekter av tidspunkt for utsett eller betingelser i RAS på innhold av astaxanthin i NQC, selv om 600 g utsettet var mindre enn de andre utsettene (Figur 38C). Det var ingen økning i astaxanthin i NQC fra september til november, gjennomsnitt for alle grupper var ved slakt 5,8 mg/kg og total-karotenoid var i snitt på 6,0 mg/kg. Idoxanthin utgjorde i snitt 3,6 % av totalt karotenoid ved slakt, men det var fortsatt litt høyere idoxanthin i NQC hos fisk satt ut på 600 g (4,1 %) sammenlignet med fisk satt ut på 200 g (2,9 %). Fettnivået i NQC var litt høyere i november (17,8 % i snitt for alle behandlinger) enn i september (16,7 %). Det var ingen effekter av salinitet og lysperiode i RAS på fett i NQC ved avslutning av forsøket, men det var en signifikant effekt av størrelse ved utsett ($p < 0,05$) med høyest fett% i kontroll (20,4), mens 200 g og 600 g utsett hadde i gjennomsnitt 18,4 og 17,3 % fett i NQC (Figur 38C).

A) Astaxanthin



B) Idoxanthin

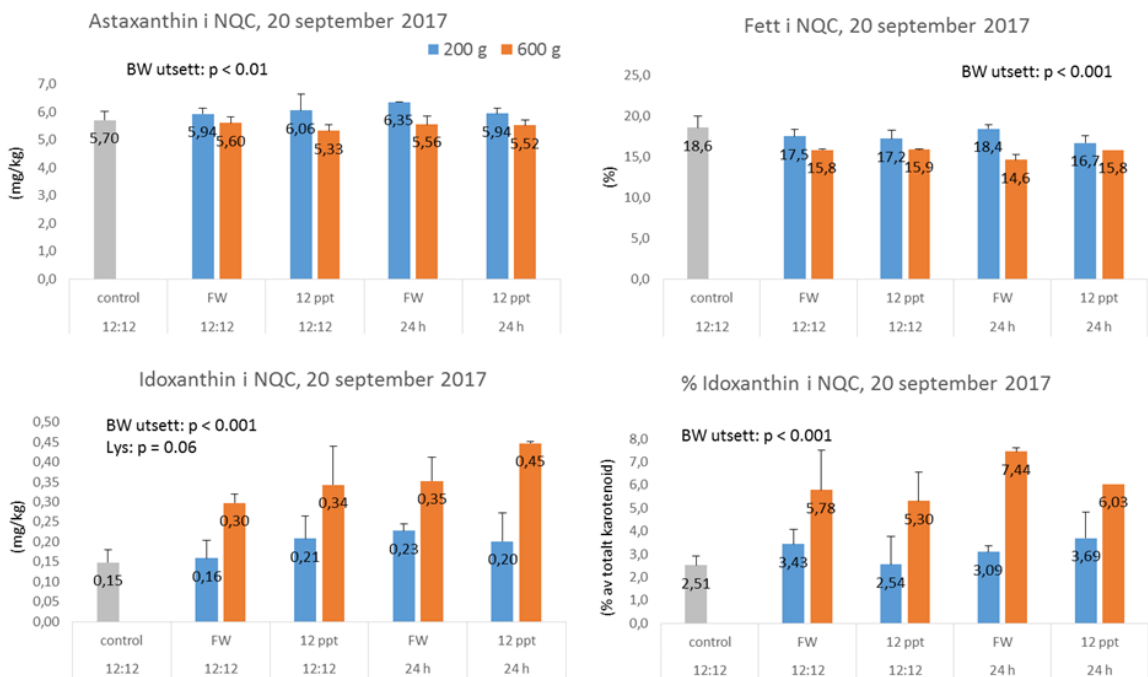


Figur 37 (A) Astaxanthin (A) og (B) idoxanthin (% av totalt karotenoid) i NQC som funksjon av vekt for de ulike behandlingene og utsett. Verdier er basert på samleprøver av 10 individer per not, Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD (n=2).

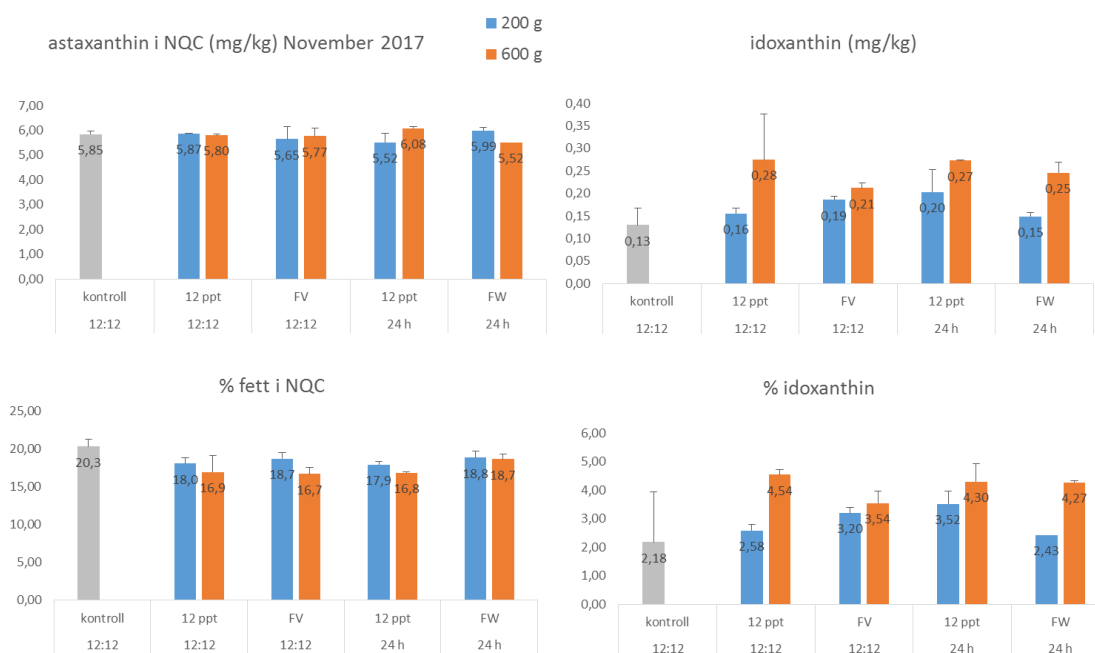
A) Mai



B) September

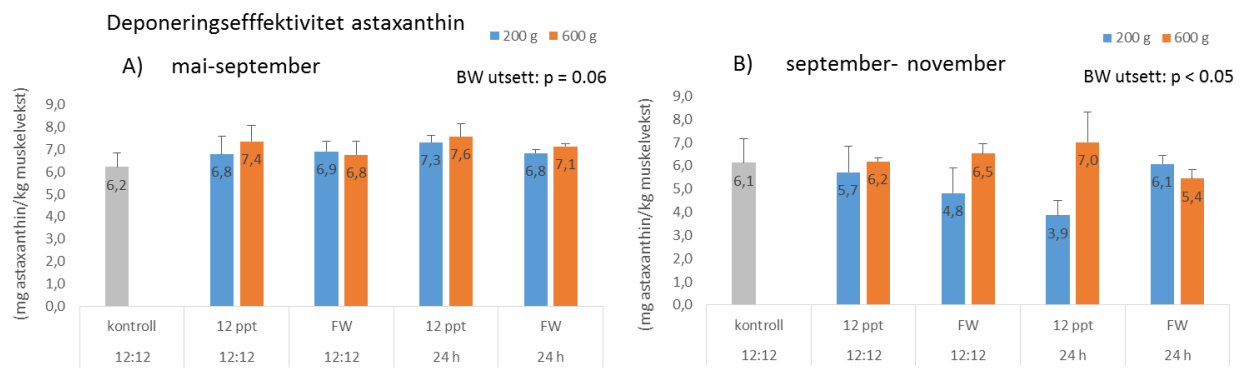


C) November



Figur 38 Konsentrasjon av astaxanthin, idoxanthin og % fett i NQC i mai (A) og september (B) og ved sluttuttaket i november 2017 (C). Verdier er basert på samleprøver av 10 individ per not, 2 nøtter per behandling.

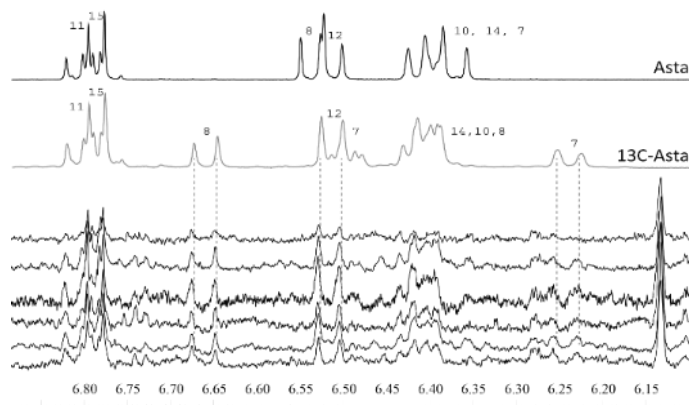
Tradisjonelle retensjonsberegninger av astaxanthin (% retinert av spist) kan ikke gjøres i dette forsøket da det ikke var mulig å samle forspill for de ulike behandlingene ettersom de gikk i felles merd. Siden de ulike utsettene hadde ulik vekst og fettdeponering i de ulike periodene har de mest sannsynlig også ulik førfaktor, så å beregne retinert av spist ved å anta en førfaktor blir heller ikke riktig. Men det går an å beregne hvor mye astaxanthin som deponeres i muskel relativt til øking i kroppsvekt. Basert på muskelkonsentrasjonen av astaxanthin og kroppsvekt ved start og slutt av en periode, og antakelsen at muskel utgjør 65% av kroppsvekt, kan man beregne relativ deponeringseffektivitet som økning i totalt astaxanthin i muskel (mg)/øking i muskelmasse (kg). I perioden mai til september var det en tendens til at kroppsvekt ved utsett hadde en effekt på deponeringseffektivitet ($p=0,07$). 100 g kontroll hadde lavere deponeringseffektivitet enn 600 g utsett (figur 39) men det var ingen effekter av lysbehandling eller salinitet i RAS. I perioden september til november var det heller ingen effekt av behandling i RAS, men igjen hadde 600 g utsett høyest deponering av astaxanthin i forhold til økning i muskelmasse ($p < 0,05$). Relativ deponeringseffektivitet (mg astaxanthin/kg muskel) var 6,3 i 600 g utsett, 5,1 i 200 g utsett og 6,1 i kontrollfisken mellom september og november.



Figur 39 Deponeringseffektivitet av astaxanthin i sjøfasen for de ulike behandlingene. Verdier er gjennomsnitt per behandling + SD.

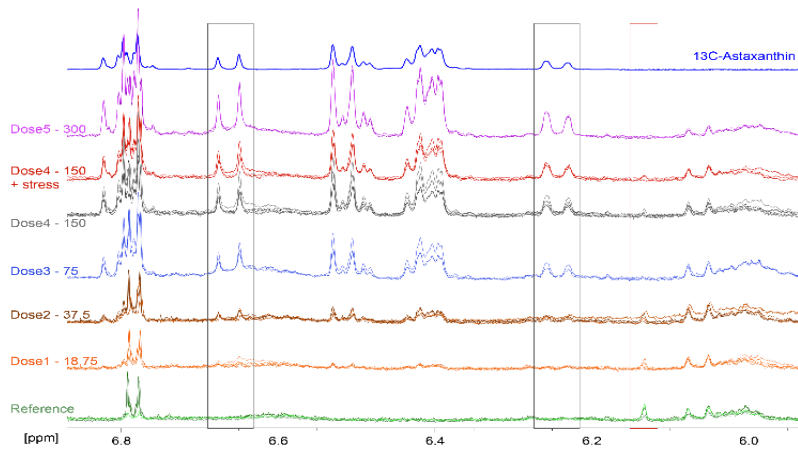
6.4 Delmål 4: Studier av opptak og metabolisme av astaxanthin ved bruk av ^{13}C NMR spektroskopi

Fôret til laksen inneholdt både ^{12}C -astaxanthin, (i form av Carophyll Pink), og vitamin A (retinol) fra vitaminblandingen og de marine råvarene. Innholdet av vitamin A var imidlertid svært forskjellig i de fire diettene, det var mye mer vitamin A i den marine dietten enn i de tre andre diettene. Enterocytter ble isolert fra laks fôret en kommersiell diett som også var tilsatt Carophyll Pink og vitamin A. Etter at hepatocytene og enterocytene var isolert fra laks fôret de ulike diettene ble de inkubert med ^{13}C -astaxanthin i henholdsvis 48 og 24 timer. Derfor var karotenoidblandingen i disse cellene et resultat av metabolisme av ^{12}C astaxanthin *in vivo* og metabolisme av ^{13}C -astaxanthin *in vitro*. Spektrene til referanse- (^{12}C) karotenoider og ^{13}C -isotoper ble derfor sammenlignet med spektrene av aceton-ekstrakter fra cellene. Noen resonanser av ^{12}C -astaxanthin og derivater ble funnet i celler fra enkelte dietter, mens resonansene av ^{13}C -astaxanthin ble funnet i alle cellekulturer (figur 40 og 41A). I tillegg til ^{13}C -astaxanthin-signalene inneholdt hepatocyttspektrene også andre signaler fra metabolske produkter av ^{13}C -astaxanthin. Både ^{12}C - og ^{13}C -astaxanthin kan imidlertid ha vært bundet til proteiner, som albumin og ulike lipoproteiner, og vil da ikke kunne detekteres med NMR. Intracellulær transport av astaxanthin og metabolitter er lite kjent i laks, men det må antas at ulike transportproteiner er involvert ettersom disse forbindelsene er svært lite polare. Imidlertid vil ekstraksjon med løsemidler normalt frigjøre astaxanthin ved at proteiner denatureres når de kommer i kontakt med løsemidler.

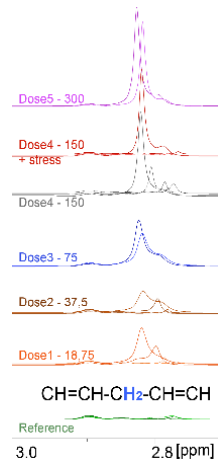


Figur 40 ^1H -NMR-spektra av aceton-ekstrakter av seks replikaer av hepatocytene fra laks fôret diett 1; sammen med referansen til det naturlig (^{12}C) og ^{13}C -astaxanthin.

A



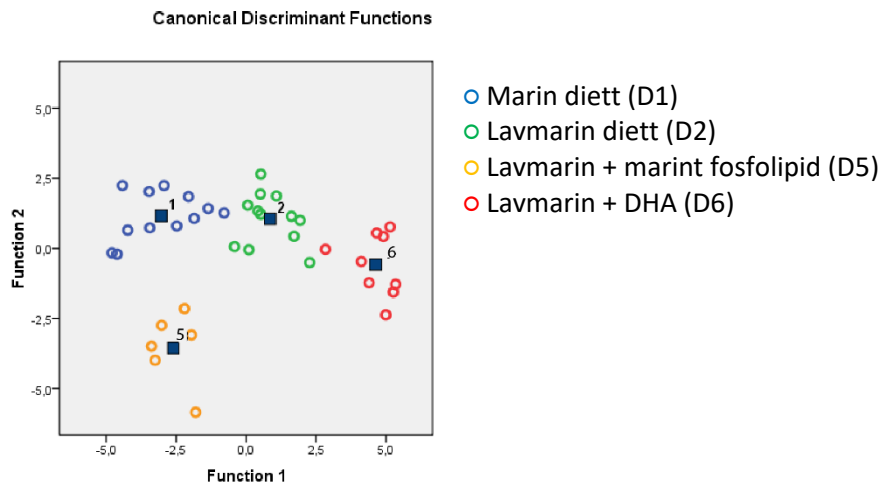
B



Figur 41 $^1\text{H-NMR}$ -spektra av aceton-ekstrakter fra enterocytter. A) karotenoider i cellekulturer tilsatt økende doser ^{13}C -astaxanthin (^{13}C -astaxanthin-signalene øker fra bunnen til toppen av bildet vist ved rektangler); B) lipider bis-allysiske protoner i enterocytter tilsatt økende doser ^{13}C -astaxanthin.

Hepatocytter

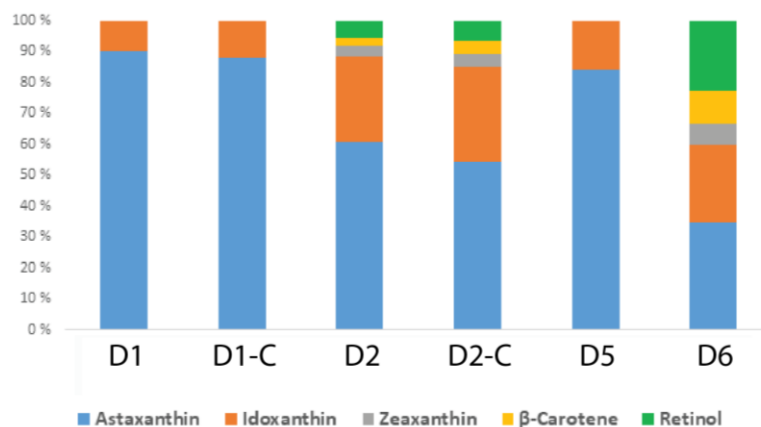
Den statistiske analysen (LDA) av hepatocyttenes spektra viser en distinkt gruppering av karotenoidprofilene i celler fra de ulike diettene (Figur 42). Dette tyder på at det er forskjellig metabolisme av astaxanthin i hepatocytter isolert fra laks føret de ulike diettene.



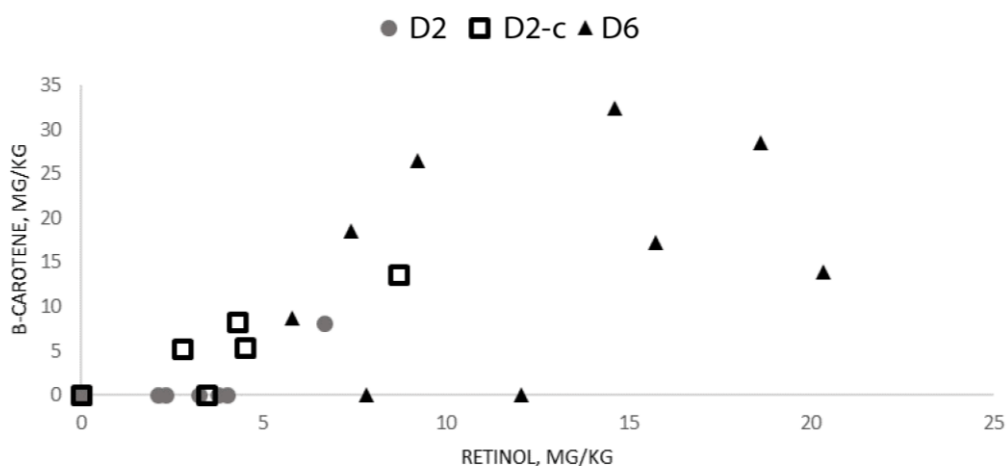
Figur 42 Plot som viser resultatet av Lineær diskriminerende analyse (LDA) av NMR- spektrene fra hepatocytterne.

NMR-analyse gjorde det mulig å kvantifisere ^{13}C -astaxanthin og metabolitter i hepatocytter fra de ulike diettene (idoxanthin- \rightarrow zeaxanthin- \rightarrow β -karoten- \rightarrow retinol). Hepatocytterne fra laks føret den marine dietten (D1) hadde den høyeste mengden ^{13}C -anrikt astaxanthin (17 mg / kg). Hepatocytter fra laks føret en lavmarin diett (D2) og lavmarin diett + marine fosfolipid (D5) hadde lavere innhold av ^{13}C -astaxanthin i hepatocytterne. Sammensetningen av karotenoider i hepatocytter fra laks føret diett 2 og 5 var imidlertid forskjellig. I hepatocytter fra laks føret den lavmarine dietten (D2) ble både astaxanthin

og metabolittene idoxanthin, zeaxanthin, og β -karoten funnet i cellene, mens det i hepatocytter fra laks fôret dietten tilsatt marint fosfolipid (D5) hovedsakelig ble funnet astaxanthin og idoxanthin og ukjente karotenoider som inneholdt en epoksygruppe. Dette tyder på en oksidativ astaxanthin-metabolisme. Den laveste mengden ^{13}C -astaxanthin ble funnet i hepatocytterne fra fisk fôret med lavmarin + DHA (D6). Flere nedbrytningsprodukter av astaxanthin ble også detektert i denne gruppen, inkludert det antatte epoksy-karotenoidet. Mengden dannet retinol relativt til mengde astaxanthin kan brukes som et mål på hvor astaxanthin som omsettes til retinol. Den høyeste mengden retinol ble funnet i hepatocytterne fra diett 6, lavmarin + DHA (Figur 43). En økt omsetning av astaxanthin til retinol ble også observert i hepatocytterne fra den lavmarine dietten inkubert med kortisol (figur 44).



Figur 43 %-vis innhold av ^{13}C -astaxanthin og metabolitter av ^{13}C -astaxanthin i leverceller isolert fra laks fôret en marin diett og en diett basert på planteråvarer med og uten tilsats av ekstra DHA og marint fosfolipid (MPL). Leverceller fra to dietter (D1 og D2) ble også inkubert med kortisol (C) i mediet. D1 = Marin diett, D2 = lavmarin diett, D5 = lavmarin diett tilsatt marint fosfolipid, D6 = lavmarin diett tilsatt DHA.

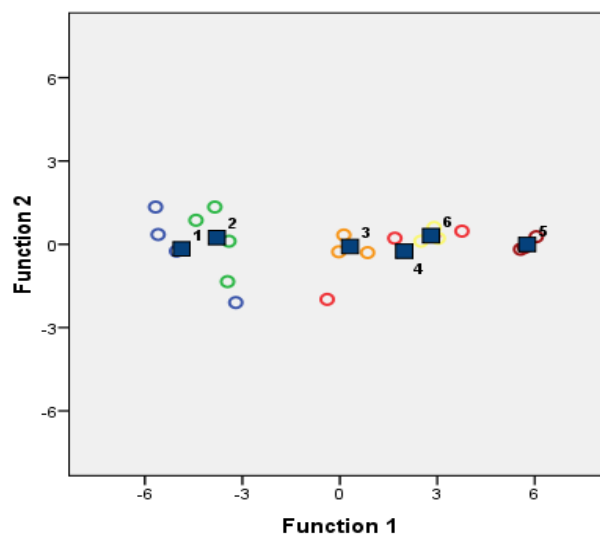


Figur 44 Konsentrasjoner av ^{13}C β -karoten og retinol i hepatocytter isolert fra diett 6 og diett 2 inkubert med ^{13}C astaxanthin med og uten kortisol.

Tolkningen av resultatene fra cellekulturer krever noen forbehold. Leverkvaliteten i fisk fôret de lavmarine diettene var dårligere enn i fisk fra den marine dietten, med lys porøs lever med høyere fettinnhold sammenlignet med den marine dietten. Levercellene fra lavmarine diett-grupper kan ha hatt dårligere celler med høyt fettinnhold, slik at tettheten av leverceller var forskjellig i de ulike cellekulturene. Dette kan ha påvirket konsentrasjonen av karotenoider i kulturene. Derfor er det kanskje mest interessant å se på den %-vise fordelingen av astaxanthin og metabolitter i hepatocytter fra de ulike diettene. Karotenoid-profilen i cellekulturene er et resultat av den direkte interaksjonen av komponentene i isolerte hepatocytter med albumin-bundet ^{13}C -astaxanthin tilsatt i vekstmediet og av den intracellulære metabolismen av astaxanthin. *In vivo* kan karotenoid-profilen i lever også være avhengig av transportmekanismer siden astaxanthin først vil passere gjennom andre organer, hvorav tarm er det som kan påvirke opptak og hvor astaxanthinet går. Dersom en større andel går direkte til muskel bundet til albumin i stedet for til lever med chylomikroner og HDL kan innholdet av astaxanthin og metabolitter i lever bli lavere. Imidlertid viser våre funn at det er betydelige forskjeller i metabolisme av astaxanthin i hepatocytter isolert fra laks som har fått plantebaserte og marine dietter.

Enterocytter

For å studere omsetning av astaxanthin i tarm ble ^{13}C -astaxanthin tilsatt i økende mengde til de isolerte enterocytterne (se metoder). Astaxanthinet ble tilført bundet til albumin (bovint serum albumin, BSA, Sigma Aldrich). Spesifisiteten av astaxanthinopptaket ble verifisert av Linear Discriminant Analysis (LDA). Resultatene er vist i figur 45.



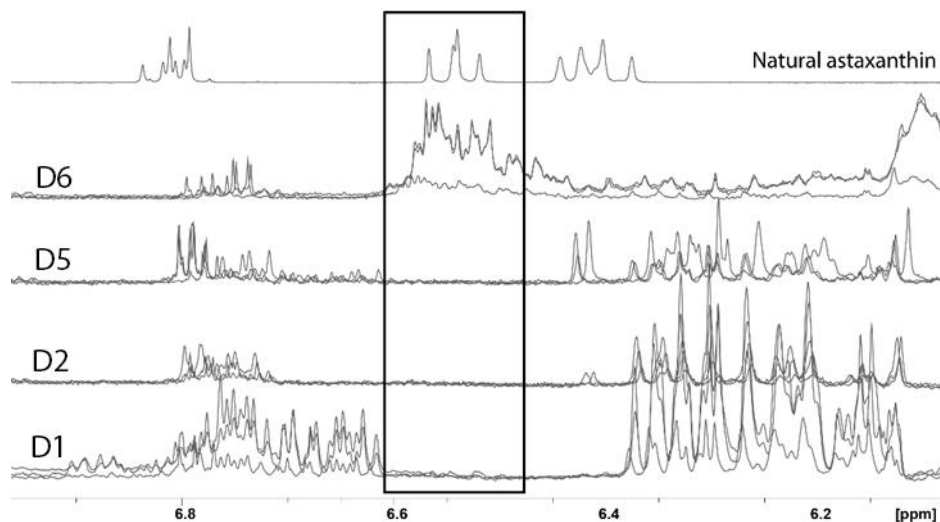
Figur 45 LDA av enterocyttenes NMR spektra. 1 - Dose 1; 2 - Dose 2; 3 - Dose 3; 4 - dose 4; 5 - dose 5; 6 - Dose 4 med kortisol (se metoder).

Selv om mengden astaxanthin øker i hver gruppe med en faktor på 2 (18,75 - 37,5 - 75 - 150 - 300), er fordelingen av gruppene i LDA ikke lineær. Første og andre dose ligger nær hverandre mens de andre dosene ligger lengre fra hverandre. Dette indikerer at mengden astaxanthin i cellene er avhengig av dosen cellene er inkubert med. NMR-analysen viser korrelasjonen av mengden av det tilførte ^{13}C -astaxanthin med innhold i enterocytterne. Tilsats av kortisol til cellene endret ikke mengden astaxanthin i cellene, siden prøver fra gruppe 4 og 6 ligger nært hverandre på LDA-plottet. Foruten ^{13}C -astaxanthin ble det ikke detektert noen metaboliske produkter av astaxanthin i enterocytterne (figur 41 A). Tilsetning av astaxanthin påvirket imidlertid sammensetningen av lipider i enterocytterne. Økning

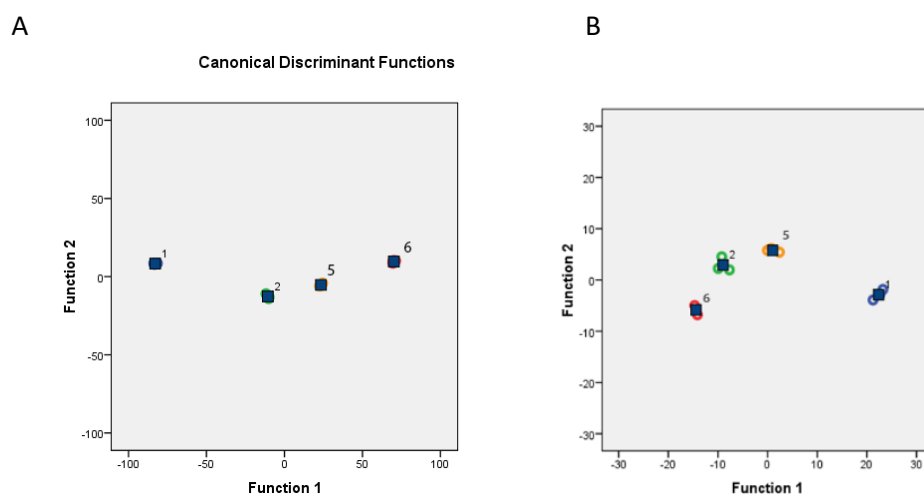
av astaxanthin i cellene økte antall bis-allyliske protoner ($\text{CH} = \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH} = \text{CH}$), dvs. mengde PUFA i enterocytterne (Figur 41B). Dette indikerer at det er interaksjoner mellom karotenoider og metabolisme av lipider i enterocytter. Saw med flere (2013) studerte antioksidanteffekten til astaxantin alene eller i kombinasjon med PUFA og fant at den synergistiske antioksidant effekten var spesielt sterk ved lave nivå av astaxanthin og omega-3-fettsyrer. Dette kan forklare forskjellene mellom gruppe 1-2 (med lav astaxantin konsentrasjon) og de andre gruppene med høyere astaxanthin dose.

Analyser av hel lever fra fôringsforsøket

NMR-spektra fra lever inneholdt et bredt spekter av forskjellige produkter sannsynligvis fra metabolsk omsetning av astaxantin (Figur 46). LDA av både karotenoid- og lipidprofiler er vist i figur 47.



Figur 46 ^1H -NMR-spektra av acetonekstrakter av leverprøver fra fôringsforsøket sammen med referanse naturlig (^{12}C) astaxanthin.

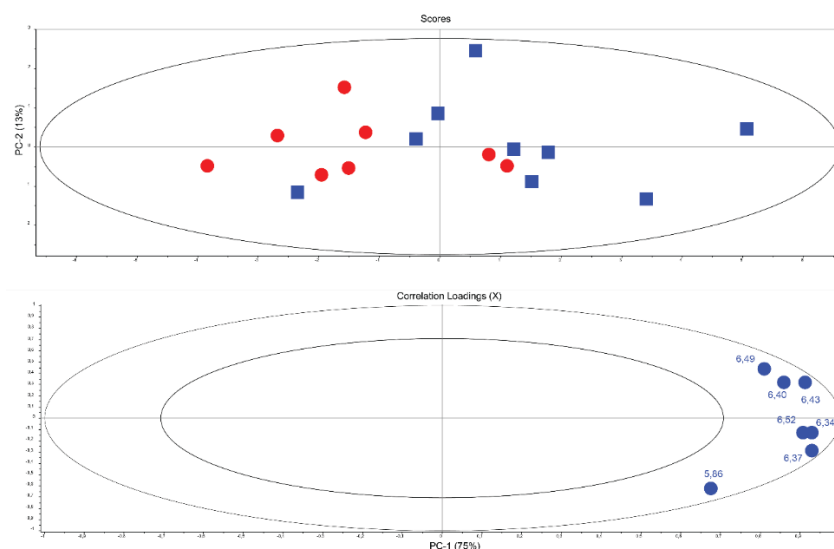


Figur 47 Karotenoid (A) og lipid (B) –profilene i acetonekstrakt fra hel lever. ○ Marin diett (1) Lavmarin diett (2) ○ Lavmarin + marint fosfolipid (5) ○ Lavmarin + DHA (6).

LDA-analysen viser at lipid- og karotenoidprofilene i lever er svært spesifikke for hver diett. Det er også større spredning mellom diettene i karotenoid og lipid-profil i lever enn det som var tilfelle for hepatocytter og enterocytter. Diett 1 (marin diett) og diett 6 (med DHA) er de som er mest ulike både i lipid og karotenoidsammensetning i lever. Disse diettene var også mest ulike med tanke på genuttrykk i lever. Dette tyder på at tilsetning av DHA til et lavmarint fôr endrer karotenoidmetabolismen mer signifikant i forhold til de andre lavmarine fôrene. Det var også fisk fôret med dietten tilsatt DHA som hadde dårligst vekst og lavest innhold av astaxanthin i muskel av samtlige fôr-grupper i forsøket. En mulig forklaring på den dårlige veksten er at når opptaket av lipid i tarmen ikke fungerer på grunn av for lite fosfolipider i fôret, så vil det først oppstå problemer når det blir en høy konsentrasjon av flerumettet fett i tarmen som lett vil oksideres. Astaxanthin er en kraftig antioksidant, som derfor kan forbrukes i større grad hvis konsentrasjonen av flerumettet fett blir høy slik at det dannes frie radikaler. Lever og tarm er antatt å være det viktigste organ for omsetning av astaxanthin. Selv om man kjenner noen metabolitter av astaxanthin, er det fortsatt ukjent hva som styrer omsetning av astaxanthin. Om pigmentet går direkte fra tarmen til lever eller om det går til muskel først kan være avgjørende for hvor mye som omsettes metabolsk og hvor mye som deponeres i muskel. De utførte eksperimenter viser at enterocytene kan inneholde en økende mengde fritt astaxanthin uten det akkumulerte metabolitter i målbare mengder. Samtidig metaboliserte hepatocytene astaxanthin til forskjellige sluttprodukter, avhengig av deres tidligere diett.

Effekt av stress på omsetning av astaxanthin *in vivo*

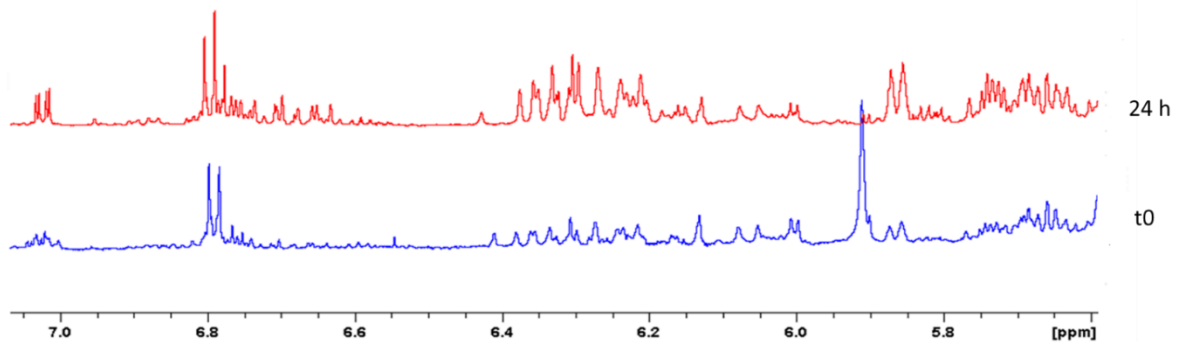
Laks ble fôret med et fôr coatet med ^{13}C -astaxanthin som beskrevet i 4.5.1. Før dette var fisken fôret en kommersiell diett med et lavt innhold av astaxanthin (5 ppm). Analyser av lever, muskel og tarm etter at fisken var utsatt for stress i form av håving viser en endring i karotenoidprofil særlig i muskel og lever (figur 48 og 49). Det ble også gjort analyser av kjemisk sammensetning av hel fisk etter 4 uker. Det var lavere innhold av fett og energi i stresset laks ($p < 0.05$), men ingen signifikant forskjell i astaxanthin. Det var imidlertid høyere konsentrasjon av idoxanthin i laksen som var stresset ($p < 0,05$).



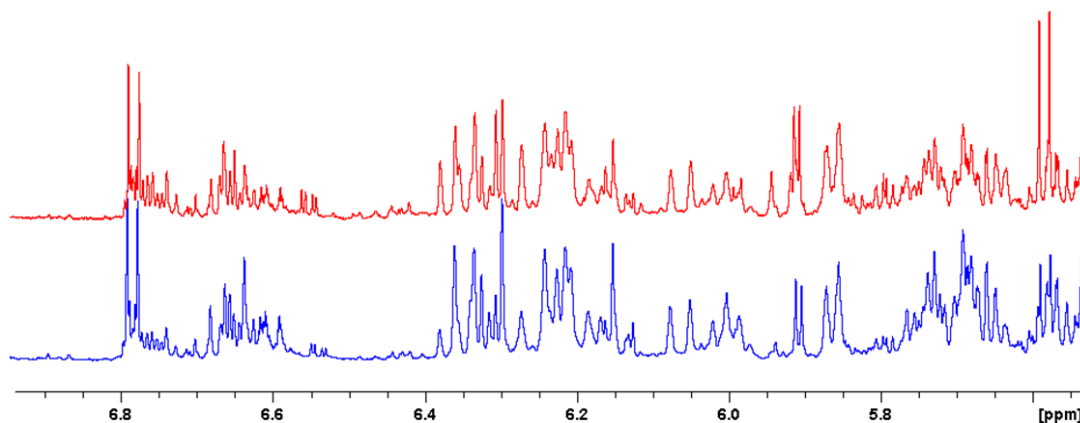
Figur 48 (øverst) PCA plott av karotenoid-profil i muskel fra stresset laks ■ og laks som ikke var stresset ● 72 timer etter stress i form av håving (nederst).

Prøver av lever og tarm ble analysert 24 timer etter at laksen var påført stress. Sammenlignet med ustresset laks fant vi i stresset laks nye signaler i spekteret fra lever og høyere intensitet i regionen omkring retinol (Figur 48A) mens det var mindre forskjell på stresset og ustresset i laks i spekteret fra tarm (Figur 50B). For å identifisere de ulike karotenoidene og kvantifisere dem er det nødvendig med ytterligere analyser. Samlet sett tyder imidlertid resultatene på at stress in vivo fører til en endring i karotenoid profilen i særlig muskel og lever, noe som tyder på en endring i metabolisme av astaxanthin til retinoider, tilsvarende det vi fant in vitro i leverceller. Stress in vivo ga kun en mindre endring av karotenoidprofilen i tarm og tilsats av cortisol til enterocytter ga heller ingen endring i karotenoidprofil.

A) Lever



B) Tarm



Figur 49 Karotenoid-regionen i NMR-spekter fra (A) lever og (B) tarm hos stresset fisk (rød linje) og ustresset fisk (blå linje) 24 timer etter påført stress.

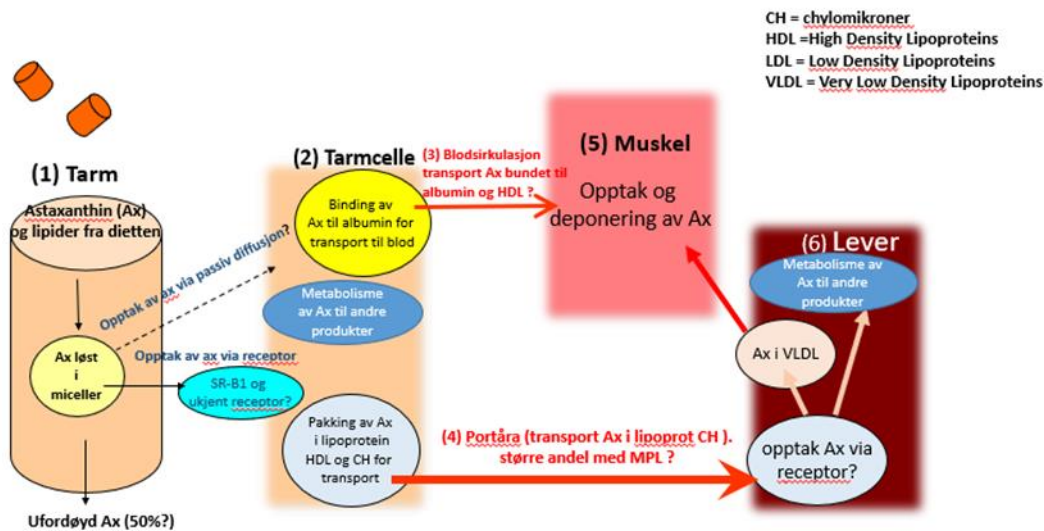
Konklusjoner

For å øke deponeringen av astaxanthin i fiskemuskel må minst mulig av astaxanthinet bli metabolisert eller oksidert. I denne sammenhengen spiller sammensetningen av fiskefôret en viktig rolle. Optimaliseringen av fôrblendingen krever studier av astaxanthin-metabolismen i fiskens forskjellige organer. Dette er svært utfordrende studier på grunn av den høye redoksaktiviteten til astaxanthin og dets metabolitter. De kan fungere som en pro- eller antioxidant i forskjellige miljøer og dermed bli oksidert eller redusert. Reaktiviteten til astaxanthin er direkte forbundet med lipidsammensetningen. Karotenoider og lipider kan virke annerledes i kombinasjon enn når de er tilstede separat, på grunn av synergisme og muligens felles regulering av metabolske spor.

7 Sammenstilling og diskusjon av sentrale resultater

7.1 Forklarings-modeller og hypoteser for virkningsmekanismer for resultater fra fôringsforsøk

Absorpsjon, transport og opptak av karotenoider



Figur 50 Flow-skjema for opptak og distribusjon av astaxanthin i laks.

1) Resultat for opptak (fordøyelighet) av astaxanthin (Ax)

- Marint fôr (FM+FO): **ADC Ax 43 %** (Ax i tarmvev: 1,9 mg/kg)
- FM+PO: **ADC Ax 47 %** (Ax i tarmvev: 1,9 mg/kg)
- Lav Marin (PP+PO): **ADC Ax 36 %** (Ax i tarmvev: 1,5 mg/kg)
- PP+MPL: **ADC Ax 48 %** (Ax i tarmvev: 2,1 mg/kg)
- PP + Soylec: **ADC Ax 50 %** (Ax i tarmvev: 2,1 mg/kg)

Høyest opptak og nivå av astaxanthin i tarm

Tilsetting av enten MPL eller Soylec til en diett basert på planteprotein, bedret opptaket av fett og astaxanthin i tarmen, antagelig pga. bedre løselighet (micelledannelse i tarm, figur pkt 1). Det var ca. like mye astaxanthin tatt opp i tarmen til diettgruppene PP+MPL og PP+Soylec, men i MPL-gruppen var det gjenfunnet mer totalkarotenoid i tarmvev, men det skyldtes høyere forekomst av idoxanthin og andre ukjente karotenoider. Genuttryksanalyser av tarmvev til lavmarin gruppene (PP) sammenlignet med marin gruppe (FM+FO) viste at PP+Soylec hadde nedregulert gener i retinol syntesen, mens PP+MPL hadde oppregulert enkelte gener i retinolsyntesen, noen som kan indikere høyere grad av metabolisme av karotenoider i gruppen tilsatt MPL enn i gruppen tilsatt Soylec, noe som også er i overensstemmelse med flere karotenoider (metabolitter av astaxanthin) funnet i MPL gruppen i tarm.

2) Tarm enterocyt

- **FM+FO:** **Normal tarm** (ikke hypervakuolisering som tegn på fettakkumulering)
- **FM+PO:** **Normal tarm**
- **PP+PO:** **Hypervakuolisering av tarm** (bedres ikke dersom FO erstatter PO)
- **PP+MPL:** **Normal tarm**
- **PP + soylec:** **Delvis normal tarm** (noe hypervakuolisering)

Lavmarin-dietten PP+PO førte til hypervakuolisering (fettakkumulering i tarm) som videre resulterte i lavere fôrintak og vekst. Tilsetning av MPL gav normal tarm, mens tilsetning av Soylec bare delvis normaliserte tarmen. Det kan tyde på at MPL, som bl.a. består av en blanding av ulike fosfolipider i større grad sikrer lipoproteindannelse og transport av fettløselige komponenter fra tarmen til ulike vev (figur pkt. 2,3,4). Det var økt uttrykk av gener forbundet med inflammasjon og stress i tarmen til PP+PO gruppen sammenlignet med tarmen til FM+FO-gruppen. Tilsetning av MPL til planteprotein dietten resulterte i normalisering av genuttrykk (liten forskjell fra FM +FO-gruppen). Tilsetning av Soylec viste noe økt uttrykk av gener relatert til stress og inflammasjon, men ikke i like stor grad som i PP+PO-gruppen. Dette tyder på at økt fettakkumulering og hypervakuolisering gir økt stress og inflammasjonsrisiko i tarmen.

Tabellen under viser at tarmen til PP+MPL-diettgruppen har relativt likt uttrykk av gener relatert til flere apolipoproteiner/lipoproteindannelse som FM+FO-gruppen. Disse genene er på den annen side signifikant nedregulert i tarmen til PP+soylec og PP+PO-gruppene, noe som indikerer mindre syntese av apoproteiner for dannelse av chylomikroner og HDL. Mangelfull lipoproteindannelse for transport av fett ut av tarmen kan være en mulig årsak til akkumulering av fett i tarmen. Dette viser at MPL og Soylec har ulike effekter i tarmen, mens MPL tilsetning til en lav fiskemelsdiett normaliserer tarmen og hindrer hypervakuolisering, så gir tilsetning av tilsvarende nivå av Soylec kun delvis normalisering av tarmen. Det kan imidlertid ikke utelukkes at et høyere nivå av Soylec kunne gi ytterligere reduksjon i fett-akkumulering, ettersom det er vist i forsøk med lakseyngel at tilsats av fosfolipider fra krill og soya-lecithin begge ga bedring i vekst og redusert fettakkumulering i tarm, men det måtte tilsettes mer Soylec for å oppnå samme effekt som av krill PL, henholdsvis 3,6 og 2,5 % av fôret (Taylor m fl. 2015), som også er høyere dosering enn det som ble gitt i dette forsøket.

Nyere data tyder på at perilipin-2 er et sentralt gen/protein som koordinerer lipid homeostasen i tarmen ved å modulere kapasitet til lipidopptak og transport i enterocytter. Tabell 7 viser at perilipin-2 var oppregulert i PP+soylec- og PP+PO-gruppene, men ikke i MPL-gruppen sammenlignet med den marine dietten.

Tabell 7 Uttrykk av gener relatert til lipoproteintransport i tarm i lavmarine dietter (PP = planteprotein, PO = planteolje, MPL = Marint fosfolipid, SL = soyalecitin).

Uttrykk av gener relatert til lipoproteintransport i tarm	PP+MPL	PP+SL	PP+PO
Apolipoprotein B-100	0,22	-1,46	-1,37
apolipoprotein Eb-like (LOC106570128)	0,04	-1,11	-1,09
apolipoprotein E [Oncorhynchus mykiss]	0,00	-1,10	-1,10
Apolipoprotein A-IV - Ident 93	-0,49	-0,79	-0,95
Apolipoprotein CII [Oncorhynchus mykiss]	-0,90	-0,68	-1,18
Apolipoprotein A-II	-0,11	-0,22	-0,47
perilipin-2-like (LOC106602803), X1	-0,44	0,73	1,07

Høyest grad av hypervakuolisering hadde diettgruppen PP+DHA, dette kan skyldes at DHA-gruppen var rik på flerumettede fettsyrer som gir lavere smeltepunkt og normalt bedre fettabsorpsjon i tarmen. Når PP-gruppene manglet fosfolipider til å frakte fett bort, så ble tilstanden verst i DHA-gruppen. I dette forsøket kan vi derfor ikke si noe om DHA har effekt på muskelfarge, grunnet problemer i tarmen.

3-4) Transport av Ax i serum

- **FM+FO:** Ax 3,5 mg/kg (60 % av Ax transporteres i lipoproteiner og ca. 40 % bundet til albumin i blodbanen)
- **FM+PO:** Ax 3,1 mg/kg (ikke analysert lipoprotein)
- **PP+PO:** Ax 2,1 mg/kg (60 % av Ax transporteres i albumin 40 % i lipoproteiner i blodbanen)
- **PP+MPL:** Ax 2,0 mg/kg (60 % av Ax transporteres i albumin 40 % i lipoproteiner i blodbanen)
- **PP + soylec:** Ax 3,3 mg/kg (ikke analysert lipoprotein)

Det ble gjenfunnet mer astaxanthin i serum i FM+FO-gruppen enn i PP+PO-gruppen. Analyse av lipoproteinsammensetningen i plasma i disse to diettgruppene viste at 60 % av astaxanthinet ble transportert i lipoproteinene chylomikroner og HDL og 40 % bundet til albumin i den marine diettgruppen, mens 60 % av astaxanthinet ble transportert i blodet bundet til albumin i lavmaringruppen og kun 40 % i lipoproteiner. Videre viste genuttrykket som diskutert over en nedregulering av en rekke gener relatert til apolipoproteinsyntese i PP+PO-gruppen. Dette kan være tegn på mangel på fosfolipid i dietten med lite fiskemel (PP), dvs. ikke nok byggesteiner tilgjengelig for lipoproteinsyntese. Dette kan indikere at Ax i større grad transporteres fra tarmen til blodbanen bundet til serum-albumin, mens annet fett akkumulerer i tarmen pga. mangel på lipoprotein for transport. Musestudier har vist at dersom man injiserer radioaktivt merket HDL i blodbanen, så vil det aller meste av HDL tas opp av lever og adskillig mindre i andre vev. En mulig hypotese kan være at fett og Ax bundet i HDL og Chylomikroner transporteres via portåren direkte til lever før videre transport ut fra lever via VLDL til perifere vev som muskel. Denne transporten via lever før videre transport til muskel kan føre til noe metabolisme/nedbrytning av Ax i lever og dermed mindre Ax tilgjengelig for deponering i muskel.

Det var like godt opptak av Ax i tarmen, og mindre fettakkumulering i tarm i PP+MPL-gruppen sammenlignet med PP+Soylec-gruppen (noe som tydet på bedre transport av lipidkomponenter ut fra tarmen og til perifere vev), men det ble gjenfunnet mindre Ax i blodet i PP+MPL-gruppen enn i PP+Soylec-gruppen. Dette funnet har vi ikke noen klar forklaring på, men dataene indikerer også

høyere grad av metabolsk omdanning av Ax i MPL-gruppen både i tarm og lever, noe som kan være en medvirkende årsak til mindre Ax gjenfunnet i serum.

5) Astaxanthin retensjon i muskel

- **FM+FO:** Ax 5,9 (15,6 % idoxanthin av total kar)
- **FM+PO:** Ax 5,7 (15,6 % idoxanthin av total kar)
- **PP+PO:** Ax 6,8 (PP+FO= Ax 7,7) (15,6 % idoxanthin av total kar)
- **PP+MPL:** Ax 4,2 (25,6 % idoxanthin av total kar)
- **PP + soylec:** Ax 7,9 (8,8 % idoxanthin av total kar)

Til tross for dårligere opptak av astaxanthin i tarm og mindre mengde gjenfunnet i blodet til lavmaringgruppene (PP) uten tilsatt fosfolipid i dietten, så var det absolutt mest astaxanthin deponert i muskel i disse gruppene (med unntak av PP+MPL), noe som kan synes som et paradoks. Dette til tross for at laksen var større i de marine gruppene og i PP-gruppene tilsatt fosfolipid enn i lavmaringgruppene, og astaxanthin-nivået i muskel ofte øker med økt fiskestørrelse. En mulig forklaringsmodell er at når mer astaxanthin i PP-gruppene transporteres bundet til albumin enn i HDL og Chylomikroner, så vil albuminbundet astaxanthin kunne tas direkte opp i muskel fra blodet, mens astaxanthin bundet i lipoproteiner i større grad vil tas opp i lever og metaboliseres. I en tidligere studie av Ytrestøyl og Bjerkeng (2006), ble astaxanthin injisert i bukhulen til laksen slik at man omgikk tarmen, og da fant man at opptaket i muskel økte lineært med økende mengde astaxanthin injisert uten at det var tegn til en metning av transportkapasiteten i blodet. Mest sannsynlig ble astaxanthin bundet til serumproteiner som albumin i blodet før direkte opptak i muskel.

Årsaken til at PP+MPL-gruppen gir dårligere retensjon av Ax i muskel enn de andre PP-gruppene, spesielt PP+ Soylec, er det ikke et entydig svar på ut ifra våre resultater. Men det kan skyldes at det er økt nedbrytning/metabolisme av Ax i MPL-gruppen i tarmen (i overensstemmelse med genuttryksdataene), slik at mindre kommer over i blodbanen og videre inn i muskel. Det ble funnet en større andel nedbrytningsprodukter fra Ax i lever og i muskel i denne gruppen.

6) Astaxanthin i lever

- **FM+FO:** Ax 1,6 (0,5 andre ukjente karotenoid produkter)
- **FM+PO:** Ax 1,4 (0,5 andre ukjente karotenoid produkter)
- **PP+PO:** Ax 0,6 (PP+FO=1,4) (0,2 andre karotenoid produkter)
- **PP+MPL:** Ax 1,3 (1,3 andre ukjente karotenoid produkter)
- **PP + soylec:** Ax 1,2 (0,4 andre ukjente karotenoid produkter)

Dataene viser høyest nivå av astaxanthin i lever i gruppen føret FM+FO, dette er den samme diettgruppen hvor en større andel av astaxanthin ble fraktet i lipoproteinene HDL og chylomicroner som antagelig blir transportert i større grad direkte fra tarmen via portåren til lever, og med noe lavere nivå av astaxanthin i muskel. Det er lavere astaxanthin i lever PP-gruppene, noe som stemmer overens med hypotesen om at mer astaxanthin i denne gruppen blir transport bundet til albumin direkte til muskel. I MPL-gruppen er det større grad av omdanning til andre karotenoidprodukter inkludert idoxanthin (noe som også ble observert i tarm og muskel).

Hepatocytter fra forsøksfisken ble isolert og inkubert med stabil isotop av astaxanthin. I det forsøket så man at lavmaringgruppene (PP+PO og PP+DHA) hadde større omdanning av ¹³C astaxanthin til retinol enn i den marine gruppen, (FM+FO), noe som er i overensstemmelse med lavere nivå av astaxanthin i

lever til denne gruppen. Det kan skyldes effekter av forskjeller i A-vitaminsnivåer i dietten. I FM+FO-dietten var det 120 000 IU retinol /kg fôr, mens det i PP+PO var ca 30 000 IU retinol /kg fôr. Dette kan indikere at retinolnivået i fôret har betydning for Ax-metabolismen i lever. Retinolnivået i dietten var lavest i PP+DHA-gruppen 14 500 IU retinol /kg fôr og det var høyest omdanning av astaxanthin til retinol i lever i denne gruppen. I gruppen PP+MPL, var det lavere omdanning til retinol, og hovedsakelig omdanning til idoxanthin.

7) Andre effekter i lever

- **FM+FO:** Normal lever (fett % 5,4, **ASAT 377**)
- **FM+PO:** Økt fettnivå i lever (fett % 10,7, **ASAT 501**)
- **PP+PO:** Økt fettnivå i lever (fett % 11,1, **ASAT 144**)
- **PP+FO :** Økt fettnivå i lever (fett % 15,3, **ASAT 293**)
- **PP+MPL:** Økt fettnivå i lever (fett % 13,7, **ASAT 326**)
- **PP + soylec:** Økt fettnivå i lever (fett % 14,2, **ASAT 647**) Høyest TAG nivå i lever

Det var kun FM+FO-gruppen som hadde helt normalt nivå av fett og triglyserider i lever. En diett med PO og FM gav økt triglyseridnivå i lever. Alle PP-diettgruppene hadde høyt nivå av triglyserider, men det var aller høyest i PP+Soylec-gruppen som også viste tendens til forhøyet nivå av ASAT i blodet sammenlignet med de andre diettgruppene, og som kan indikere tegn på mild grad av levercelleskade.

Genuttrykket av perilipin var ikke signifikant forskjellig mellom FM+FO- og PP+MPL-gruppene, men var signifikant oppregulert i PP+PO- og PP+Soylec-gruppene. I museforsøk er det vist at leverspesifikke perilipiner er sentrale for initiering og patologisk utvikling av fettlever.

PP+PO+MPL-dietten ga også forhøyet mengde fett og triglyserid sammenlignet med fiskemelsdietten. Dette tyder på at andre faktorer i fiskemelet enn fosfolipid påvirker fettnivået i lever.

Nyere studier har vist at uttrykket av gener relatert til serinmetabolisme i stor grad er påvirket av fettlever. Dette er i overenstemmelse med våre funn som viser oppregulering av gener i serinmetabolismen i alle PP-gruppene (Tabell 8) sammenlignet med FM+FO-gruppen (normal).

Tabell 8 Uttrykk av gener relatert til metabolisme av serin i lavmarine dietter med og uten tilsats av marine fosfolipider (MPL) og soyalecitin (SL).

Uttrykk av gener relatert til serine metabolisme	PP+MPL	PP+SL	PP+PO
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,66	3,02	4,72
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1,56	3,00	4,61
Phosphoserine aminotransferase (Ortho_H)	1,18	1,46	1,33
Phosphatidylserine decarboxylase (pisd)	1,71	1,98	2,11
Phosphatidylserine decarboxylase (pisd)	1,51	1,72	2,07
Solute carrier family 3 (amino acid transporter h	0,50	2,15	3,05

Oppsummering kritiske faktorer

- **Kilde til og nivå av fosfolipid i dietten** påvirket både opptak og metabolisme av astaxanthin i lever og tarm og deponering av astaxanthin i muskel.
- **Retinolnivået i fôret synes å påvirke** metabolismen av astaxanthin til retinol i lever.
- **Fiskeolje** bedret retensjonen av astaxanthin i muskel i en planteproteinbasert diett.
- Andre **ukjente faktorer i fiskemelet** forhindret fettakkumulering i lever. Kun en fiskemeldi diett ga en normal lever i dette forsøket.
- **Planteolje** kombinert med fiskemel førte til økt fettakkumulering i lever, spesielt ved lave vanntemperaturer.
- Lav temperatur ga økt omsetning av astaxanthin til idoxanthin.
- **Fiskemel og PP+MPL ga normale tarmer, PP-Soylec gir hypervakuolisering.**

Dataene fra fôringsforsøket viser et komplekst samspill, og at metabolisme og deponering av astaxanthin i stor grad er påvirket av andre næringsstoffer i fôret. Det er også vist at også ytre faktorer som stress og temperatur har betydning for metabolisme av astaxanthin. Astaxanthin er vist å ha funksjonell betydning i ulike vev, særlig var det stor effekt i muskel hvor mangel på astaxanthin i fôret førte til en mild betennelseslignende tilstand.

7.2 Produksjonsprotokoller og FoU konsesjoner

Det var effekter på pigmentering som følge av produksjonsprotokoll i RAS i stor-smolt forsøket. Fisk som ikke var smoltifisert med et vintersignal hadde en høyere idoxanthin-konsentrasjon sammenlignet med fisk som hadde fått et vintersignal, også ved slakt. Ved utsett i sjø hadde fisk satt ut ved 600 lavere Ax, høyere idoxanthin, og høyere fettinnhold enn de som ble satt ut ved 100 og 200 g. Men ved avslutning hadde ikke fisk satt ut ved 600 g lavere innhold av Ax i filet enn de øvrige utsett, til tross for lavere sluttvekt. Fisk satt ut ved 600 g deponerte dermed Ax mer effektivt i sjøfasen enn fisk satt ut ved 100 og 200 g. Lavere veksthastighet er ikke hele forklaringen, ettersom forskjellen i deponeringshastighet var størst i siste periode før slakt (september – november) da veksten for de ulike utsettene var like god. Ved slakt var det ingen forskjeller mellom behandlinger eller utsett i Ax innhold i NQC, snitt for alle grupper var Ax 5,8 og total karotenoid 6,0 mg/kg. Fisken hadde da fått 50 ppm i fôret fra pelletstørrelse 4 mm og hadde fått relativt lite håndteringstress (4 manuelle avlusinger) og hadde ikke hatt sykdomsutbrudd. Det var ingen økning i Ax i NQC fra fisken var ca 2,5-3 kg i september og fem til slakt i november. I FoU-konsesjonene hadde fisken større utfordringer med håndtering (11 mekaniske avlusinger) og PD utbrudd. Gruppen som fikk 50 ppm Ax i fôret endte opp med en Ax konsentrasjon i NQC på 4,8 mg/kg i snitt, altså 1 mg lavere enn fisken i storsmolt-forsøket på tilsvarende slaktevekt. Dette kan skyldes mer håndtering og PD utbrudd, men det ble også brukt kommersielle fôr fra ulike produsenter i de to forsøkene, så det kan ikke utelukkes at det også kan være effekter av fôr. Om det skyldes fôr eller håndtering, så er det i begge forsøkene et godt stykke opp til 7 mg/kg totalpigment som var målet i industrien for et drøyt tiår siden. Da ble det også brukt mindre enn 50 ppm i fôret frem til slakt, det var vanlig å bruke mellom 20-40 ppm i fôret fra fisken var ca 2 kg og frem til slakt.

8 Videre arbeid

Dette prosjektet har frembrakt ny kunnskap om faktorer som påvirker mengden astaxanthin tilgjengelig for muskelpigmentering i laks, men samtidig reiser det også nye spørsmål. Det er fortsatt uløste spørsmål knyttet til de grunnleggende mekanismer so, styrer opptak, transport og omsetning av astaxanthin i laks. Det er vist at fosfolipider (PL) i fôret er essensielt for normalt opptak av astaxanthin og lipid i tarmen. Dette kan skyldes at PL påvirker micelledannelse i tarmen, ettersom løselighet i miceller antas å være en forutsetning for opptak av karotenoider. Både PL av marint opphav og soya-lecithin hadde positiv effekt på fordøyelighet, det var en positiv korrelasjon mellom innhold av PL i dietten og fordøyelighet av astaxanthin. Soya-lecithin ga imidlertid høyest innhold av astaxanthin i muskel. Det er mulig at høyere doser av PL kunne gitt enda høyere fordøyelighet og bedre pigmentering. Dette forsøket var ikke designet som et dose-respons forsøk, og behovet for PL hos laks i sjøfasen er ikke kjent. Videre ble diettene med tilsatt PL testet bare på en temperatur (12°C), fordøyeligheten ved lav temperatur kan muligens påvirkes forskjellig av marine PL og soya-lecithin ettersom både fosfolipid og fettsyresammensetningen er forskjellig i de to produktene. Store deler av produksjonen av laks i Norge foregår ved temperaturer ned mot 6 °C og under, det er derfor viktig at dette tas i betraktning når effekter av ulike fôrkonsept på pigmentering skal evalueres ettersom problemer med fettakkumulering i tarm og lever er større ved lave temperaturer. Produktene som ble benyttet i dette prosjektet besto heller ikke av 100 % PL, det bør derfor testes effekten av renere produkter, og se på effekter av de enkelte PL-klassene. Samspill mellom ulike næringsstoff er viktig å ta i betraktning. I dette forsøket så vi også en negativ effekt av tilsatt av DHA når tarmen ikke fungerte normalt med økt fettakkumulering. I andre forsøk har vi derimot sett en positiv effekt av økt DHA på pigmentering. Hva som er optimal konsentrasjon i fôret av DHA med tanke på pigmentering og hvordan dette påvirkes av stress er ikke kjent. I dette prosjektet har vi sett indikasjoner på at stress påvirker omsetning av astaxanthin. I leverceller så vi en økt omsetning til retinol ved tilsatt av cortisol og i et *in vivo* forsøk så vi en endring i karotenoid/retinoid- spekteret etter stress, men uten at de ulike metabolittene ble kvantifisert. Med unntak av diettene som inneholdt fiskemel eller -olje var alle diettene lave i vitamin A, men over det som er antatt behov for å sikre normal vekst. Men hvilket nivå av vitamin A som sikrer optimal pigmentering er ikke kjent. I Nofimas FoU-konsesjoner hvor fisken ble utsatt for 11 lusebehandlinger i løpet av ett år var 50 ppm astaxanthin i fôret ikke tilstrekkelig til å nå 5 mg astaxanthin per kg i filet. Det er umulig å ha en ustresst kontrollgruppe i kommersielt oppdrett, men ved å utvikle stressmodeller under kontrollerte forsøksbetingelser kan man finne effekten av stress på muskelpigmentering i laks.

Videre arbeid bør fokusere på følgende tema:

- Grunnleggende mekanismer for opptak, transport og omsetning av astaxanthin i ulike organ.
- Betydning av samspill mellom ulike næringsstoff, som EPA/DHA, vitamin A, og andre antioksidanter i fôret for pigmentering i laks.
- Behov for fosfolipid hos laks i sjøfase for å sikre god helse og god pigmentering i muskel, også ved lave temperaturer.
- Utvikle stressmodeller som kan gi bedre svar på hvor mye pigmentering påvirkes av stress over tid og eventuelle interaksjoner med komponenter i fôret.

9 Referanser

- Aas, G.H., Bjerkgeng, B., Hatlen, B., Storebakken, T., 1997. Idoxanthin, a major carotenoid in the muscle of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) fed diets containing astaxanthin. *Aquaculture* 150, 135-142
- Aas, G. H., Bjerkgeng, B., Storebakken, T., Ruyter, B. 1999. Blood appearance, metabolic transformation and plasma transport proteins of ¹⁴C-astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 21, 325-334.
- Abat, A., Castillo, R., Choubert, G. 2002. Canthaxanthin fixation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of dietary phospholipid content *Rev. Med. Vet.* 143, 665– 668.
- Austreng, E., 1978. Digestibility determination in fish using chromic oxide marking and analysis of contents from different segments of the gastrointestinal tract. *Aquaculture*, 13, 265-272.
- Bjerkgeng, B., Refstie, S., Fjalestad, K. T., Storebakken, T., Rødbotten, M., Roem, A.J., 1997. Quality parameters of the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*) as affected by dietary fat content and full-fat soybean meal as a partial substitute for fish meal in the diet. *Aquaculture* 157, 297-309.
- Bjerkgeng, B., Hatlen, B., Wathne, E. 1999. Deposition of astaxanthin in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with herring, capelin, sandeel or Peruvian high PUFA oils. *Aquaculture* 180, 307-319.
- Bonet, M.L., J. Ribot, and A. Palou. 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1821:177-189.
- Borel, P., Grolier, M., Armand, M., Partier, a., Lafont, H., Lairon, D., Azais-Bresco, V. 1996. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *J. Lipid Res.* 37, 250-261.
- Choubert, G., Mendes-Pinto, M. M., Morais, R. 2006. Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of dietary astaxanthin and lipid sources *Aquaculture* 257, 429– 436.
- Clark, R.M., Yao, L., She, L., Furr, H.C., 2000. A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions. *Lipids* 35, 803-806.
- Datta, P., Webb, L.M., Avdo, I., Pascall, J., Butcher, G.W. 2017. Survival of mature T cells in the periphery is intrinsically dependent on GIMAP1 in mice, *European journal of immunology* 47(1) 84-93.
- Desmarchelier, C., Borel, P. 2017. Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends in food Sci Techn.* 69B, 270-280.
- Folch, J., Lees, M., Sloane, G.H., Stanley, J. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497.
- Guillou, A., G. Choubert, T. Storebakken, J. Delanoue, and S. Kaushik. 1989. BIOCONVERSION PATHWAY OF ASTAXANTHIN INTO RETINOL-2 IN MATURE RAINBOW-TROUT (*SALMO-GAIRDNERI* RICH). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 94:481-485.
- Hardy, R.W., Scott, T.M., Harrell, L.W. 1987. Replacement of herring oil with menhaden oil, soybean oil, or tallow in the diets for Atlantic salmon raised in marine net-pens. *Aquaculture* 65, 267– 277.
- Helland, S.J., Grisdale-Helland, B., Nerland, S., 1996. A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture* 139, 157-163.
- Hoover, G.J., el-Mowafi, A., Simko, E., Kocal, T.E., Ferguson, H.W., Hayes, M.A. 1998. Plasma proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) isolated by binding to lipopolysaccharide from *Aeromonas salmonicida*, *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* 120(3), 559-569.

- Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Mueller, S. 2010. Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance, *Current drug targets* 11(12), 1541-1550.
- Jia, Y., J.-Y. Kim, H.-J. Jun, S.-J. Kim, J.-H. Lee, M.H. Hoang, K.-Y. Hwang, S.-J. Um, H.I. Chang, and S.-J. Lee. 2012. The natural carotenoid astaxanthin, a PPAR-alpha agonist and PPAR-gamma antagonist, reduces hepatic lipid accumulation by rewiring the transcriptome in lipid-loaded hepatocytes. *Molecular Nutrition & Food Research*. 56:878-888.
- Kim, Y.K., M.V. Zuccaro, B.K. Costabile, R. Rodas, and L. Quadro. 2015. Tissue- and sex-specific effects of beta-carotene 15,15' oxygenase (BCO1) on retinoid and lipid metabolism in adult and developing mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 572:11-18.
- Kjær, M. A., Ruyter, B., Berge, G.M., Sun, Y., Østbye, T-K.K. 2016. Regulation of the omega-3 fatty acid biosynthetic pathway in Atlantic salmon hepatocytes. *PloS one* 11.12, e0168230.
- Lobo, G.P., Amengual, J., Palczewski, G., Babino, D., von Lintig, J. 2012. Mammalian carotenoid oxygenases: Key players for carotenoid function and homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1821, 78-87.
- Moren, M., T. Naess, and K. Hamre. 2002. Conversion of beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin to vitamin A in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*. 27:71-80.
- Ng, T.B., Fai Cheung, R.C., Wing Ng, C.C., Fang, E.F., Wong, J.H. 2015. A review of fish lectins. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 16 (4), pp. 337-351.
- Olsen, R.E., Kiessling, A., Milley, J.E., Ross, N.W., Lall, S.P. 2005. Effect of lipid source and bile salts in diet of Atlantic salmon, *Salmo salar*, L., on astaxanthin blood levels. *Aquaculture* 250, 804-812.
- Origassa, C.S., Camara, N.O. 2013. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury, *World journal of hepatology* 5(10), 541-549.
- Parker, R.S., 1997. Bioavailability of carotenoids. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, suppl. 1, 86-90.
- Regost, C., Jakobsen, J.V., Rørå, A.M.B. 2004. Flesh quality of raw and smoked fillets of Atlantic salmon as influenced by dietary oil sources and frozen storage. *Food Res. Int.* 37, 259-271.
- Rørå, A.M.B., Birkeland, S., Hultmann, L., Rustad, T., Skåra, T., Bjerkgeng, B. 2005a. Quality characteristics of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets high in soybean or fish oil as affected by cold-smoking temperature. *Lebensmittelwiss. Technol.* 38, 201-211.
- Rørå, A.M.B., Ruyter, b., Skorve, J., Berge, R.K., Slinning, K-E. 2005b. Influence of high content of dietary soybean oil on quality of large, fresh, smoked and frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquacult. Int.* 13, 217-231.
- Sahin K., Orhan, C., Yazlak, H., Tuzcu, M., Sahin, N. 2014 a. Lycopene improves activation of antioxidant systems and Nrf2/HO-1 pathway of muscle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with different stocking densities. *Aquaculture* 430, 133-138.
- Sahin, K., Yazlak, H., Orhan, c., Tuzcu, M., Akdemir, F., Sahin, N. 2014 b. The effect of lycopene on antioxidant status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared under high stocking density. *Aquaculture* 418-419, 132-138.
- Salvador, A.M., Alonso-Damián, A., Choubert, G., Milicua, J.C.G. 2009. Impact of Different Dietary Phospholipid Levels on Cholesterol and Canthaxanthin Lipoprotein-Serum Transport and Muscle Deposition in Rainbow Trout. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2016-2021.
- Saw, C.L.L., A.Y. Yang, Y. Guo, and A.-N.T. Kong. 2013. Astaxanthin and omega-3 fatty acids individually and in combination protect against oxidative stress via the Nrf2-ARE pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 62:869-875.

- Schiedt, K., F.J. Leuenberger, M. Vecchi, and E. Glinz. 1985. ABSORPTION, RETENTION AND METABOLIC TRANSFORMATIONS OF CAROTENOIDS IN RAINBOW-TROUT, SALMON AND CHICKEN. *Pure and Applied Chemistry*. 57:685-692.
- Schiedt, K., Foss, P., Storebakken, T., Liaaen-Jensen, S., 1989. Metabolism of carotenoids in salmonids I. Idoxanthin, a metabolite of astaxanthin in the flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) under varying external conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 277-281.
- Shete, V. Quadro, L. 2013. Mammalian Metabolism of β -Carotene: Gaps in Knowledge. *Nutrients* 5, 4849-4868.
- Sila, A., Kamoun, Z., Ghilissi, Z., Makni, M., Nasri, M., Sahnoun, Z., Nejdar-Arroume, N., Bougatef, A. 2015. Ability of natural astaxanthin from shrimp by-products to attenuate liver oxidative stress in diabetic rats. *Pharmacological reports* 67, 310-316.
- Taylor, J.F., Martinez-Rubio, L., del Ponzo, J., Walton, J.M., Tinch, A.E., Migaud, H., Tocher, D.R. 2015. Influence of dietary phospholipid on early development and performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 448, 262-272.
- Todorčević, M., Kjær, M.A., Djakovic, N., Vegusdal, A., Torstensen, B., Ruyter, B. 2009. N-3 HUFAs affect fat deposition, susceptibility to oxidative stress, and apoptosis in Atlantic salmon visceral adipose tissue. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152, 135-143.
- Torrissen, O.J., Christiansen, R., Struksnæs, G., Estermann, R., 1995. Astaxanthin deposition in the flesh of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in relation to dietary astaxanthin concentration and feeding period. *Aquacult. Nutr.* 1, 77-84.
- Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O.J., Sandvin, A., Lie, Ø. 1993. Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chem.* 46, 361-366.
- Waagbø, R., Berntssen, M.H.G., Danielsen, T., Helberg, H., Kleppa, A.L., Berg Lea, T., Rosenlund, G., Tvenning, S., Susort, s., Vikeså, v., Breck, O. 2013. Feeding Atlantic salmon diets with plant ingredients during the seawater phase –a full-scale net production of marine protein with focus on biological performance, welfare, product quality and safety. *Aquacult. Nutr.* 19, 598-618.
- Webb, L.M., Datta, P., Bell, S.E., Kitamura, D., Turner, M., Butcher, G.W. 2016. GIMAP1 Is Essential for the Survival of Naive and Activated B Cells In Vivo, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 196(1), 207-216.
- Ytrestøyl, T., Bjerkeng, B. 2007. Dose response in uptake and deposition of intraperitoneally administered astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 263, 179-191.
- Ytrestøyl, T., Struksnæs, G., Koppe, W., Bjerkeng, B. 2005. Effects of temperature and feed intake on astaxanthin digestibility and metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Comp. Biochem. Physiol.* 142, 445-455.
- Ytrestøyl, T., Struksnæs, G., Rørvik, K-A., Bjerkeng, B. 2008. Utilisation of astaxanthin in Atlantic salmon from seawater transfer to slaughter. XII Int. Symp. Fish Nutr. & Feeding. June 1-5, Florianópolis, Brasil.
- Ytrestøyl, T., T.S. Aas, and T. Åsgård. 2015. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*. 448:365-374.

10 Leveranser

Presentasjoner på konferanser

Trine Ytrestøyl, Bente Ruyter, Bjarne Hatlen, Elena Shumilina, Alessandra Ciampa, Marta Bou, Aleksei Krasnov, Tone-Kari Østby, Alexander Dikiy. «Effect of diet composition on utilisation of astaxanthin in Atlantic salmon (*Salmo salar*)» 18th International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (ISFNF 2018) June 3rd -7th, 2018, Las Palmas de Gran Canaria, Spain (poster).

Trine Ytrestøyl, Bente Ruyter, Bjarne Hatlen, Tone Kari Østby, Alexander Dikiy, Elena Shumilina, Alessandra Ciampa, Aleksei Krasnov. «Betydning av førsammensetning for utnyttelse av astaxanthin i Atlantisk laks». Havbruk 2018. Oslo Plaza, 18-20 april. (poster).

Trine Ytrestøyl, Bente Ruyter, Bjarne Hatlen, Elena Shumilina, Alessandra Ciampa, Marta Bou , Aleksei Krasnov, Tone-Kari Østby, Alexander Dikiy. «HOW DIET COMPOSITION AND ENVIRONMENTAL FACTORS AFFECT THE UPTAKE AND METABOLISM OF ASTAXANTHIN IN ATLANTIC SALMON (*SALMO SALAR*)» Aquaculture Europe 2019, October 7-10, Berlin Germany (Innsendt abstract).

Foredrag for industri

«Effekt av fôr, stress og miljø på pigmentering i laks» FHF dialogmøte 29.11 2016

«Effekt av fôr, stress og miljø på pigmentering i laks» FHF dialogmøte 11.12 2017

«Effekt av fôr, stress og miljø på pigmentering i laks» FHF dialogmøte 17.12 2018

Populærvitenskaplige publikasjoner/Faktaark

Faktaark «Betydning av førsammensetning for utnyttelse av astaxanthin i Atlantisk laks».

«Rødfarge i laksefilet; Har fôret noe å si?» populærvitenskapelig artikkel (levert FHF, ikke publisert).

Manus til internasjonale journaler med referee

1. Trine Ytrestøyl, Sergey Afanasyev, Bente Ruyter, Bjarne Hatlen, Tone-Kari Østbye, Aleksei Krasnov «Transcriptome and physiological responses to astaxanthin in Atlantic salmon».(levert FHF, ikke publisert).

