

Nýsköpun & neytendur
Innovation & Consumers

Vinnsla, virðisaukning & eldi
Value Chain, Processing
& Aquaculture

Mælingar & miðlun
Analysis & Consulting

Líftækni & lífefni
Biotechnology & Biomolecules

Öryggi, umhverfi & erfðir
Food Safety, Environment
& Genetics



Áhrif fiskpróteinmeltu á proska þorsklirfa

Hólmfríður Sveinsdóttir
Jónína Jóhannsdóttir
Rannveig Björnsdóttir
Oddur Vilhelmsson
Hugrún Lía Heimisdóttir
Patricia Hamaguchi
Annabelle Vrac
Gunnlaugur Sighvatsson
Steinar Svavarsson
Arnljótur Bjarki Bergsson
Agnar Steinarsson

Líftækni og lífefni

Skýrsla Matís 18-12
Maí 2012

ISSN 1670-7192



Áhrif fiskpróteinmeltu á þroska þorsklirfa

Hólmfríður Sveinsdóttir, Jónína Jóhannsdóttir, Rannveig
Björnsdóttir, Oddur Vilhelmsson, Hugrún Lís Heimisdóttir, Patricia
Hamaguchi, Annabelle Vrac, Gunnlaugur Sighvatsson, Steinar
Svavarsson, Arnljótur Bjarki Bergsson, Agnar Steinarsson



HAFRANNSÓKNASTOFNUNIN



Háskólinn
á Akureyri



AVS rannsóknasjóður
í sjávarútvegi

<i>Titill / Title</i>	Áhrif fiskpróteinmeltu á þroska þorsklirfa / The effect of fish protein hydrolysate on the development of cod larvae		
<i>Höfundar / Authors</i>	Hólmfríður Sveinsdóttir, Jónína Jóhannsdóttir, Rannveig Björnsdóttir, Oddur Vilhelmsson, Hugrún Lía Heimisdóttir, Patricia Hamaguchi, Annabelle Vrac, Gunnlaugur Sighvatsson, Steinar Svavarsson, Arnljótur Bjarki Bergsson, Agnar Steinarsson		
<i>Skýrsla / Report no.</i>	18-12	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	Maí 2012
<i>Verknr. / project no.</i>	2009		
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	AVS		
<i>Ágríp á íslensku:</i>	<p>Eitt helsta vandamálið við eldi á þorski eru mikil afföll á fyrstu stigum þroskunar og gæði seiða. Markmið þessa verkefnis var að fá heilsteyptari mynd af áhrifum auðgunar fæðudýra með ufsapróteinmeltu á lífefaerla í snemþroska þorsk með því að beita myndgreiningaraðferðum og próteinmengjagreiðningu. Niðurstöður benda til töluverðrar andoxunarvirkni ufsapróteinmeltu auk nokkurrar áhrifa á bólguvirkni. Afkoma lirfa í eldistilraun var frekar lág þó svo að vaxtarhraði væri alveg viðunandi og lítið væri um alvarlega útlitsgalla. Meðhöndlun með ufsapróteinmeltu reyndist ekki hafa áhrif á afkomu eða galla lirfa en vísbendingar voru um örvun á framleiðslu IgM og lysozyme í meltingarvegi og á yfirborði lirfa. Próteinmengjagreiðningar sýndu að meðhöndlun hafði áhrif á tjáningu frumgrindapróteina, próteina sem taka þátt í streitu auk efnaskiptaensímans ATP-synthasa. Niðurstöður benda til að notkun ufsapróteinmeltu geti bætt og jafnað gæði seiða ef gæði eggja er ábótavant en þegar notuð eru egg af góðum þá hafi meðhöndlun ekki áhrif.</p>		
<i>Lýkilorð á íslensku:</i>	<i>Ufsapróteinmelta, próteinmengjagreiðning, ónæmisvefjafræði</i>		
<i>Summary in English:</i>	<p>High larval mortalities and anatomical deformities are among the major obstacles restricting the development of Atlantic cod aquaculture. The present project was aimed at studying the effects of a pollock hydrolysate supplementation during early developmental stages of cod on growth, development and survival. Furthermore, protein expression was evaluated as well as the distribution and intensities of selected parameters of the unspecific immune system. The hydrolysate was found to display antioxidant activity and can be regarded as a feed supplement to the live prey items. The survival from larvae to juvenile in the experiment was relatively poor, with satisfactory larval growth and low incidence of severe deformities. Offering hydrolysate enhanced live prey to larvae did not affect larval survival or development. Treatment resulted in stimulated IgM and lysozyme production. Proteome analysis showed that treatment with fish hydrolysates has an effect on the expression of structural, stress and metabolic proteins. Overall, the results indicate that fortification of the live prey with pollock hydrolysate can result in improved or more even larval quality following poor egg quality, however, with no effects if eggs are of better quality.</p>		
<i>English keywords:</i>	<i>Pollock protein hydrolysate, proteomics, immunohistochemistry</i>		

Efnisyfirlit

1	Inngangur	1
2.	Framkvæmd.....	3
2.1.	Framleiðsla á fiskpróteinmeltu.....	3
2.2.	Mælingar á næringarinnihaldi	3
2.3.	Tilraunir í þorskeldi	3
2.3.1.	Uppsetning tilrauna.....	3
2.4.	Próteinmengjagreining	4
2.4.1.	Útdráttur próteina úr meltingarvef.....	4
2.4.2.	Hleðsla próteinsýna á gelræmur	4
2.4.3.	Jafnhleðslustilling próteina í gelræmu (e. <i>Isoelectric focusing</i>)	5
2.4.4.	Afoxun og alkálýsering próteina í gelræmu (e. <i>Equilibration</i>)	5
2.4.5.	Tvívíður rafdráttur próteina (e. <i>Two dimensional electrophoresis, 2-DE</i>)	5
2.4.6.	Litun próteina í geli.....	6
2.4.7.	Myndgreining tvívíðra gela.....	6
2.4.8.	Klipping depla úr tvívíðum gelum	6
2.4.9.	Kennigreining próteindepla.....	6
2.5.	Ónæmisvefjalitun	8
3.	Niðurstöður og umræður	10
3.1.	Næringarinnihald ufsapróteinmeltu.....	10
3.2.	Lífvirkni ufsapróteinmeltu	10
3.2.1.	<i>In-vitro</i> lífvirknimælingar – kemísk próf í tilraunaglösum	10
3.2.2.	<i>In-vitro</i> lífvirknimælingar í frumumódeli.....	10
3.2.3.	Ónæmisstýrandi (andbólgu-) áhrif	13
3.2.4.	Bakteríuhamlandi áhrif.....	15
3.3.	Afkoma og þroski lirfa.....	15
3.4.	Örvun valinna ónæmispátta	16
3.4.1.	IgM.....	16
3.4.2.	Lysozyme	18
3.5.	Próteinmengjagreiningar.....	19
3.5.1.	Myndgreining gela.....	19
3.5.2.	Kennigreining depla með massagreiningu	20
4.	Ályktanir	22
5.	Þakkarorð	23

6. Heimildir	24
7. Viðaukar.....	26
7.1. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á WEFTA ráðstefnu í september 2011	27
7.2. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á líffræðiráðstefnu í nóvember 2011.....	29
7.3. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á þorskeldisráðstefnu í september 2011.....	30
7.4. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á Aquaculture Europe í október 2010	31
7.5. Drög að meistararitgerð við Háskólann á Akureyri	33
Abstract	34
Útdráttur	35
7.6. Bókarkafli	36

1 Inngangur

Eitt helsta vandamálið við eldi á þorski og fleiri sjávarfiskum eru mikil afföll á fyrstu stigum þroskunar en einungis 10% þorsklirfa lifa af fram að þeim tíma sem unnt er að bólusetja seiðin [1]. Það er því mikilvægt að leita leiða til þess að auka afkomu og stuðla að bættum gæðum lifra í eldi. Rannsóknir á sjávarfiskum hafa því beinst í auknum mæli að þessum fyrstu þroskastigum [2-4] en þrátt fyrir það eru ástæður mikilla affalla lítt þekktar. Afföll hafa m.a. verið tengd rangri fæðusamsetningu og óhagstæðum umhverfispáttum sem hafa leitt til sveltis, sýkinga og ýmiskonar vansköpunar [5]. Lirfur á þessu stigi hafa heldur ekki þroskað með sér sérhæfða ónæmissvörun og er ósérhæfða/meðfædda ónæmiskerfið því eina vörn lifra gegn bakteríum og öðru áreiti í umhverfinu á þessum tíma.

Nýlegar rannsóknir sýna að vöxtur lifra og seiða á fyrstu stigum eldisins skilar sér sem vaxtarforskot sem helst áfram út í megin vaxtarfasann [6]. Því er afar mikilvægt að finna út kjöreldisaðstæður á fyrstu þroskastigunum. Aukin þekking á mikilvægum lífefnaferlum í þroska er undirstaða þróunar á sérhæfðu fóðri sem og kjöreldisaðstæðum í lifrueldi sem skila mun heilbrigðari og lífvænlegri lirlfum en það er lykilatriði við uppbyggingu arðbærs þorskeldis.

Vansköpun, t.d. kjaftskekkja og ýmiskonar beinagrindargallar eru meðal vandmála sem fylgja framleiðslu þorskseiða og er almennt álitid að þessir gallar hamli eðlilegum vexti seiðanna, auki afrán og stuðli almennt að auknum afföllum í eldinu [5]. Sýnt hefur verið fram á að fæðuþættir á borð við próteinmeltu hafa jákvæð áhrif á þroskun ýmissa sjávarfisktegunda [7, 8]. Í þessu sambandi skiptir styrkur próteinmeltunnar miklu máli og gefur minni styrkur jafnan jákvæðari niðurstöður samanborið við háan styrk [7, 8]. Í verkefninu „Lífvirk efni við lifrueldi lúðu og þorsks“ kom í ljós að auðgun fæðudýra með ufsapróteinmeltu leiddi til færri gallaðra þorsklirfa. Þar fyrir utan sýndu vefjarannsóknir að meðhöndlaðar lirlfur voru með mun þéttari vöðvavef og líffæri lirlfanna voru að öllu leiti betur þroskuð samanborið við ómeðhöndlaðar lirlfur auk þess sem meðhöndlun leiddi til örvunar framleiðslu lykilþátta í ósérhæfðri ónæmissvörun lirlfanna (IgM og lysozyme) [9]. Markmið þessa verkefnis er að fá heilsteyptari mynd af áhrifum auðgunar fæðudýra með ufsapróteinmeltu á lífefnaferla í snemmproska þorsks með því að beita myndgreiningaraðferðum og próteinmengjagreiningu. Með vefjalitun og myndgreiningu er hægt að skoða breytingar í vef sem verða við breytingu

umhverfispáttá og aukinn þroska. Hægt er að skoða stærð og útlit fruma og vefja, beinagrindargalla, örvun ónæmissvörunar o.fl.

Próteinmengjagreiningar gera mönnum kleift að fá yfirlit yfir óskylda lífefnaferla og rannsaka áhrif umhverfispáttá þar á. Flestar próteinmengjarannsóknir fela í sér samtímis aðskilnað hundruða og jafnvel þúsunda próteina í tvívíðum rafdrætti á pólýakrylamíð geli. Til að kennigreina áhugaverð prótein eru deplar þeirra sneiddir út úr gelinu, meltir og peptíðin massagreind [10]. Peptíðmassarófið má síðan nota við leit kjarnsýruraða í gagnabönkum. Það er því ljóst að með því að beita próteinmengjaaðferðum samhliða myndgreiningu og mótefnalitun einstakra vefja má fá heilsteypta mynd af áhrifum ufsapróteinmeltu á lífefnaferla í þroska þorsklirfa sem stuðla mun að markvissari þróun á sérhæfðu fóðri og kjöreldisaðstæðum í þorsklirfueldi. Aukinn vöxtur sem og bætt lifun og gæði við framleiðslu þorskseiða leiðir til aukins stöðugleika í framleiðslunni og stuðlar þannig að eflingu atvinnugreinar sem á undir högg að sækja í matvælaframleiðslu heimsins. Með fínstillingu á framleiðsluaðferðum próteinmeltu og rannsóknum á samsetningu og lífvirkni mismunandi próteinhluta hennar má reikna með að hægt sé að auka lifun þorskseiða talsvert meir og hægt sé að setja á markað vöru með mjög eftirsóttu eiginleika fyrir fiskeldisíðnaðinn. Þetta yrði eðlilegt næsta skref í framleiðslu og markaðssetningu afurða frá Iceprótein ehf. til notkunar í fiskeldi.

Um er að ræða rannsóknatengt meistaraverkefni við Háskólann á Akureyri sem unnið er í samstarfi við Iceprótein ehf., Matís og Hafrannsóknastofnunina.

2. Framkvæmd

2.1. Framleiðsla á fiskpróteinmeltu

Ufsi (*Pollachius virens*) var fenginn frá Fisk Seafood hf. og færður yfir í Iceprótein ehf. þar sem framleiðsla á próteinmeltu fór fram. Prótein voru einangruð úr fiskflakinu með s.k. pH-shift aðferð og vatnsrofin með iðnaðarensímunum Alcalase® og Protamex® (Novozyme A/S, Bagsvaerd, Denmark). Ensímin voru notuð í hlutföllunum 1:1 og 4% af próteinblöndunni. Próteinmeltan var úðapurruð, pökkuð og geymd við - 80 °C fram að greiningu og notkun í fiskeldistilraunir.

2.2. Mælingar á næringarinnihaldi

Próteininnihald var ákvarðað út frá Kjeldahl-aðferð (ISO 2005) og margföldun á magni köfnunarefnis með 6.25. Vatnsmæling var gerð með því að þurrka sýni í ofni við 103°C ± 2°C í 4 klst. Hlutfall raka samsvarar þyngdartapinu (ISO 1999). Aska var mæld með því að hita sýni við 550°C í 3 klst og vigta leifarnar (ISO 2002).

Mæliskekkja reiknast sem 3% af mæligildi próteins og 10% af mæligildi ösku.

2.3. Tilraunir í þorskeldi

Í tengslum við verkefnið hefur verið framkvæmd ein tilrauna í eldi þorsklirfa (maí – apríl 2011) í því markmiði að kanna áhrif ufsapróteinmeltu á afkomu og þroska þorsklirfa auk áhrifa á próteintjáningu og ónæmissvörun. Tilraunin var framkvæmd á tilraunastöð Hafrannsóknastofunnar að Stað við Grindavík og fyrirkomulag tilrauna og sýnataka var skipulagt í samstarfi við sérfræðinga Hafró sem sáu alfarið um framkvæmd og sýnatökur á meðan tilraunir stóðu yfir, auk þess sem þeir lögðu mat á afkomu og gæði lirfa við lok tilraunar.

2.3.1. Uppsetning tilrauna

Við skipulagningu tilraunar var tekið mið af fyrri tilraunum með ufsapróteinmeltu sem framkvæmdar hafa verið af samstarfsaðilum og gefið hafa lofandi niðurstöður. Lirfur voru meðhöndlaðar með ufsapróteinmeltu í gegnum fóðurdýr (hjöldýr og *Artemia*) þar sem fóðurdýr voru meðhöndluð með þeim styrkleika sem gaf bestar niðurstöður í fyrri tilraunum

(100 ppm). Fóðurdýr voru þá auðguð með hefðbundnum hætti og síðan látin nærast á ufsapróteinmeltu (0.1 g L^{-1} bætt við rækt hjóldýra í þéttleika $1 \text{ milljón dýr L}^{-1}$ og 0.1 g L^{-1} bætt við rækt *Artemia* í þéttleikanum $500,000 \text{ dýr L}^{-1}$) í 30 mín áður en lirfur voru fóðraðar með dýrunum. Prótein-bæting fóðurdýra var framkvæmd á morgnana og helmingur gefið í fyrstu gjöf dagsins (kl. 9:00) en helmingur geymdur við 10°C fyrir seinni gjöf (kl. 16:00).

Tilraunin var framkvæmd í fjórum 3.200 L framleiðslukerum þar sem komið var fyrir 200.000 - 300.000 kviðpokalirfum í hvert ker. Lirfur í tveimur kerum voru af villtum uppruna en 3. kynslóðar eldislirfur í hinum tveimur. Fóðrað var með próteinmeltu-bættum fóðurdýrum í tveimur kerum sem innihéldu annarsvegar lirfur af villtum uppruna eða af eldisuppruna og lirfur af sama uppruna fóðraðar með hefðbundnum fóðurdýrum til samanburðar. Lirfur voru fóðraðar með próteinmeltu-bættum fóðurdýrum á mánudögum, miðvikudögum og föstudögum á tímabilinu 2-42 dögum eftir klak (dph). Önnur meðhöndlun við eldi lirfanna var samkvæmt hefðbundnum aðferðum Hafrannsóknastofnunar.

Við lok tilraunar (42 dph) voru lirfur vigtaðar og lengdarmældar auk þess sem lagt var mat á gæði lirfa (hnakkagallar og aðrir gallar) og afkoma reiknuð. Sýnum til rannsókna á próteintjáningu og til ónæmisrannsókna var einnig safnað við lok tilraunar. Nánari lýsing á framkvæmd tilraunar og vinnslu sýna er að finna í meistararitgerð nemanda (áætluð námslok júní 2012).

2.4. Próteinmengjagreining

2.4.1. Útdráttur próteina úr meltingarvef

Meltingarvegur var fjarlægður úr lirfunum og jafnaður út í frumurofsdúa (e. *lysis buffer*; 7 M urea , 2 M thiourea , $4\% \text{ w/v CHAPS}$, 40 mM DTT , $1\% \text{ w/v 4-7 IPG buffer frá GE Healthcare}$, $1\% \text{ v/v protease inhibitor cocktail frá Sigma}$) í hlutfallinu vefur:dúi, 1:9. Í framhaldinu var lausnin sett í skilvindun við 14000 rpm í 10 mín og flotið hirt (próteinlausn). Flotið var fryst við -80°C þar til próteinmengjagreiningar fóru fram.

2.4.2. Hleðsla próteinsýna á gelræmur

Próteinlausn ($16 \mu\text{L}$) var blandað saman við bólgnunardúa ($134 \mu\text{L}$) (e. *rehydration buffer*; 7 M urea , 2 M thiourea , $2\% \text{ w/v CHAPS}$, 40 mM DTT , $1\% \text{ v/v 4-7 IPG buffer frá GE Healthcare}$,

1% v/v protease inhibitor cocktail fráSigma, 5 µL bromophenol blue). Sýni í bólgnunardúa (140 µL) var hlaðið í raufar á sérstökum bökkum og gelræmum (ZOOM strip 4-7, cat# ZM0012 Invitrogen, Carlsbad, CA) lagðar ofan í raufina með gelhliðina niður og látið bíða þannig við herbergishita yfir nótt í lokuðu boxi (IPG box, GE Healthcare). Gæta þurfti að lausnin myndi dragast jafnt upp á gelræmurnar.

2.4.3. Jafnhleðslustilling próteina í gelræmu (e. *Isoelectric focusing*)

Jafnhleðslustillingin var framkvæmd í *Ettan IPG phor 3 frá GeHealthcare* í eftirfarandi þrepum með aflíðandi spennubreytingu milli þrepa. Spennubreyting jafnhleðslustillingarinnar var framkvæmd við 300 V og 200Vh, 1000 V og 300 Vh, 5000 V og 4500 Vh og 5000 V og 2000 Vh. Um það bil þrjá klukkutíma tók að jafnhleðslustilla gelræmurnar. Af því loknu voru gelræmur settar í 15 mL skilvinduglös og geymd við -20°C þar til afoxun og alkalýsering próteina fór fram.

2.4.4. Afoxun og alkalýsering próteina í gelræmu (e. *Equilibration*)

Gelræmurnar voru settar beint úr frysti í afoxunarlausn sem innihélt DTT (e. *Dithiothreitol*) sem afoxar súlfíðtengi próteinanna. Því næst voru próteinin alkalýsert í lausn með joðacetamíð sem endanlega kemur í veg fyrir að tvísúlfíðtengi myndist og binst einnig við umfram magn DTT.

2.4.5. Tvívíður rafdráttur próteina (e. *Two dimensional electrophoresis, 2-DE*)

Við tvívíðan rafdrátt voru notuð tilbúin gel (*NuPAGE®Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM®Gels*) (mynd 16) sem komið var fyrir í *XCell Sure Lock™ frá Invitrogen*. Tilgangurinn með tvívíðum rafdrætti er að aðgreina prótein á rafdráttargeli eftir mólmassa (e. *MW*). Keyrsludúi er gerður úr. Tvöhundruð mL af þessari lausn voru teknir frá og bætt í þá 500 µL af andoxunarefni frá *Invitrogen* og blandað vel. Þessi lausn fer á milli gelplatnanna í keyrslunni en afgangurinn af keyrsludúanum fer utan með gelplötunum.

Við framkvæmd seinni víddarinnar (rafdráttur) voru notuð tilbúin gel (*NuPAGE®Novex 4-12% Bis-Tris ZOOM®Gels*) sem komið var fyrir í *XCell Sure Lock™ frá Invitrogen*. Gelræmunum ásamt staðli með prótein af þekktum mólmassa (3,5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 110, 160 og 260 kDa) var komið fyrir efst á gelunum. Agarósi (0,5%) var settur ofan á gelræmurnar til

Þess að halda þeim betur á staðnum. Gelin ásamt keysludúa (40 mL af tilbúnum 25X MES dúa frá *Invitrogen* og 760 mL af eimuðu vatni) var komið fyrir í *XCell Sure Lock™*. Gelin voru keyrð við 200 V í u.þ.b. klukkutíma. Alls voru keyrð 12 gel, 3 fyrir hvern hóp.

2.4.6. Litun próteina í geli

Eftir rafdráttinn voru gelin skoluð með eimuðu vatni til að skola SDS af gelunum. Próteinin í gelunum voru lituð með *SimplyBlue™ SafeStain frá Invitrogen* samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðenda fyrir örbylgjuofna aðferð. Gelin voru geymd í eimuðu vatni yfir nótt til að losna við umfram lit. Til að losna enn frekar við umfram lit var pappírssnepill settur út í vatnið til að draga í sig litinn.

2.4.7. Myndgreining tvívíðra gela

Deplarnir á gelunum voru myndgreindir með myndgreiningarforritinu *Image Master™ 2D Platinum Software* frá *Amersham Biosciences*. Gelin voru skönnuð í *Epson perfection V750PRO* skanna og hlaðið inn í tölvu. Skannað var í 800 dpi upplausn sem tiff skrá. Notast var við innbyggða verkferla í forritinu við greiningu myndanna.

2.4.8. Klipping depla úr tvívíðum gelum

Þeir deplar sem valdir voru til þess að klippa út úr geli eftir myndgreiningu voru skilgreindir sem prótein sem sýndu breytingar í tjáningu eftir mismundandi meðhöndlun eða uppruna lírfanna.

Deplarnir voru skornir út úr geli sem sérstaklega voru gerð til að klippa depla út úr þeim. Deplarnir voru klipptir út með skurðhníf (e. *scalpel*) og settir í 0,5 ml eppendorf glas með 120 µl af MilliQ vatni. Geldeplarnir voru sendir á ís til próteinmengjagreiningardeildar háskólans í Aberdeen í Skotlandi til kennigreiningar.

2.4.9. Kennigreining próteindepla

Kennigreining fór fram við próteinmengjagreiningardeild háskólans í Aberdeen. Trypsín var notað til að brjóta próteindepla niður í peptíð sem síðan voru greind með LC-MS/MS massagreiningu. Sýnunum var fyrst breytt í jónir og þær skannaðar m.t.t. massa og hleðslu (m/z). Á þennan hátt er hægt að bera kennsl á peptíðin og þ.a.l. próteinin í sýninu [21].

Niðurstöður um hvaða aminosýrur væri að ræða fengust á mgf skráarformi. Niðurstöðurnar voru notaðar við leit í NCBI nr og SwissProt gagnaböndunum með hjálp Mascot leitarvélarinnar (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) þar sem valið var *MS/MS Ion Search*. Forsendurnar sem notaðar voru til þess að fá leitarniðurstöður voru:

Ensím: Trypsín, Ættbogi (*Taxonomy*): Geisluggi (e. *Actinopterygii*), Peptíð frávik (*Peptid tol*): +/- 1,2 Da, #¹³C: 0, MS/MS tol +/-: 0,6, Peptíð hleðsla (*Peptid charge*): 2⁺ og 3⁺, fastar breytingar (*Fixed modification*): Carbamidamethyl (C) og breytilegar breytingar (*Variable modification*): Oxidation (M).

Tafla 1. Yfirlit yfir stofna þekktra sýkingarvaldandi baktería í fiski sem notaðir voru sem prófstofnar við rannsókn bakteríuhamlandi áhrifa ufsapróteinmeltu.

Ufsapróteinmelta framleidd 2011	Ufsapróteinmelta framleidd 2009
Nafn bakteríustofna	Nafn bakteríustofna
<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>
<i>Yersinia ruckeri</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> O2 alpha
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Vibrio anguillarum</i> O2 beta
<i>Aeromonas bestarium</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>achromogenes</i>	
<i>Moritella viscosa</i>	
<i>Moritella viscosa</i>	
<i>Aliivibrio logei</i>	
<i>Aliivibrio wodanis</i>	
<i>Vibrio anguillarum</i> O2 alpha	
<i>Vibrio anguillarum</i> O2 beta	
<i>Vibrio splendidus</i>	
<i>Vibrio pelagius</i>	

Við rannsóknir á bakteríuhamlandi áhrifum var notast við hefðbundna dropaaðferð [19] og holu-agars aðferð sem þróuð var af nemanda í rannsóknatengdu BS námi í Líftækni við Háskólann á Akureyri í samstarfi við sérfræðinga Matís [20]. Bakteríur voru ræktaðar í fljótandi Tryptic Soy Broth (TSB) leyst í 70% sjóvatni (TSB/SW) og 10µl af þeirri rækt síðan sáð á Tryptic Soy Agar (TSA) leyst í 70% sjóvatni (TSA/SW) næringar-agar og ræktað við 15°C eftir

að ufsapróteinmeltu í mismunandi styrkleika (0,1g/100ml, 0,01g/100ml og 0,001g/100ml) hafði verið komið fyrir á yfirborði skálanna (10 µl) eða í holum á yfirborði agarskálanna (40µ/holu). Eftir 6 daga í rækt voru skálar rannsakaðar m.t.t. vaxtarhamlandi áhrifa efnisins sem komu fram sem eyða í bakteríuvexti umhverfis dropann eða holur.

2.5. Ónæmisvefjalitun

Ónæmisörvandi áhrif ufsapróteinmeltu voru rannsökuð í efnivið sem safnað var í þessu verkefni en einnig frá tilraun í öðru verkefni (sýni úr verkefninu „TOPCOD, OPTILAR / Lengi býr að fyrstu gerð. Kjöreldisferlar í lirfu- og seiðaeldi á þorski“ styrkt af Tækniþróunarsjóði og AVS sjónum 2009-2011) þar sem lirfur voru meðhöndlaðar á sama hátt auk þess sem niðurstöður voru mjög góðar varðandi áhrif próteinmeltu á þroska og afkomu lirfa.

Sýnataka af lirfum var framkvæmd á sama þroskastigi í báðum tilraunum (42 dögum eftir klak). Lirfur voru sneiddar í frystiskera og 9 µm þykkum sneiðum sem teknar voru frá augum aftur að sporði lirfa safnað á sýnagler og þau fryst við -80°C þar til mótefnalitun fór fram. Örvun ósérhæfðar ónæmissvörunar var rannsökuð með tilliti til tveggja mismunandi þátta, IgM og lysozyme, en þeir þættir eru mjög mikilvægir í ósérhæfðu ónæmissvari. Notuð var mótefnalitun þar sem notuð voru sérhæfð mótefni framleidd í kanínu og sem fengin voru að gjöf frá Dr. Merete Bjørgan Schrøder, Norwegian College of Fishery Science og Dr. Bergljótu Magnadóttur, meinafræðideild Háskóla Íslands að Keldum.

Smásjargler með vefjasneiðum voru tekin úr frysti, þeim leyft að ná herbergishita og síðan látin liggja í 3% H₂O₂ til þess að hindra innan-peroxídasa virkni í sýnunum. Sneiðar voru settar í hindrunarlausn (blocking solution) og síðan lausnum með fyrsta stigs mótefnum (gegn IgM eða lysozyme) sem þynnt voru í PBS með 0,2% geitasermi. Sýni voru því næst látin liggja í annars stigs mótefnalausn (Horse Raddish Peroxidase, HRP, merkt mótefni) sem þynnt voru í PBS með 0,2% geitasermi. Að lokum var merki framkallað með Na-acetat substrat dúa og AEC-laun og bakgrunnsliða með hematoxylin lit. Á milli hverra skrefa í litunarferlinu var skolað vel með 10xPBS/Tween20 (Phosphate Buffered Saline með 0,05% Tween 20) og ný laun notuð í hvert skipti. Glerjum var síðan leyft að þorna áður en þekjugler var fest yfir sneiðarnar með Clarion Mounting Medium (Sigma C0487) og leyft að þorna í 24 klst. fyrir

skoðun undir smásjá. Sem viðmiðun um sérhæfni mótefna voru ávallt notuð gler með sýnum þar sem fyrsta stigs mótefnum var sleppt við litun.

Mótefnasvörun var rannsökuð með því að skoða sýnin í Leica DMRA2 smásjá með 50-400x stækkun. Jákvæð svörun í mismunandi líffærum kemur fram sem rauður/rauðbrúnn litur en kjarni frumanna litast blár/fjólublár. Myndir af sneiðum voru teknar í gegnum smásjána með Leica DC300F stafrænni myndavél og vistað í gagnagrunni í tölvu og samanburður gerður á meðhöndluðum lirfum og sama stað í lirfum sem fengið höfðu hefðbundna meðhöndlun á eldistímanum.

Við skoðun mynda má greina viðveru IgM og lysozyme á mismunandi stöðum í lirfunum sem rauður/rauðbrúnn litur en hins vegar er ekki hægt með þessum aðferðum að magngreina framleiðslu þessara þátta og því er samanburður lirfa gerður einungis út frá sjónrænum samanburði.

3. Niðurstöður og umræður

3.1. Næringarinnihald ufsapróteinmeltu

Næringarinnihald úðapurrkaðrar ufsapróteinmeltu sem hlutfall af þurrefni var eftirfarnandi: hlutfall próteins var 76,1%, aska (steinefni) 12,3% og salt 6,7%. Þurrefnainnihald var 92,46%.

3.2. Lífvirkni ufsapróteinmeltu

3.2.1. *In-vitro* lífvirknimælingar – kemísk próf í tilraunaglösom

Niðurstöður lífvirknimælinga framkvæmdar í tilraunaglösom á próteinmeltunni má sjá í töflu 2. Öll gildin úr kemísku prófunum eru í hærri kantinum miðað við fyrri rannsóknir okkar á ufsapróteinmeltu [22]. Ástæðan gæti m.a. verið sú að sýnin voru framleidd hjá Iceprótein ehf. í Verinu þar sem rannsóknastofa Matís er einnig staðsett og því voru sýnin mjög fersk þegar lífvirknin var mæld.

Tafla 2. Niðurstöður lífvirknimælinga á ufsapróteinmeltu í tilraunaglösom.

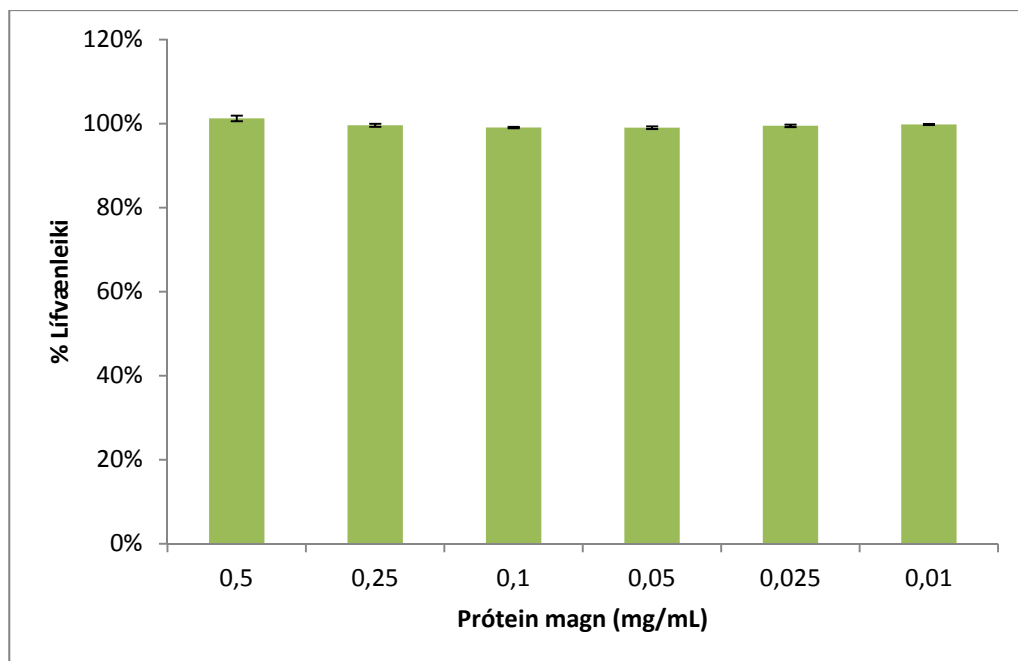
	ORAC ¹		Fe ²⁺ -járnbindi-	RP ²
	($\mu\text{mol TE/g}$)	DPPH (%)	hæfni (%)	(ASE mg/g)
Ufsapróteinmelta	1415,3 \pm 25,9	58,5 \pm 1,8	58,7 \pm 1,9	18,2 \pm 0,4

¹ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity ($\mu\text{mól Trolox jafngildi/g}$ útdráttur)

²RP: Afoxandi virkni (reducing power) (askorbinsýrujafngildi (ASE)/g útdráttur)

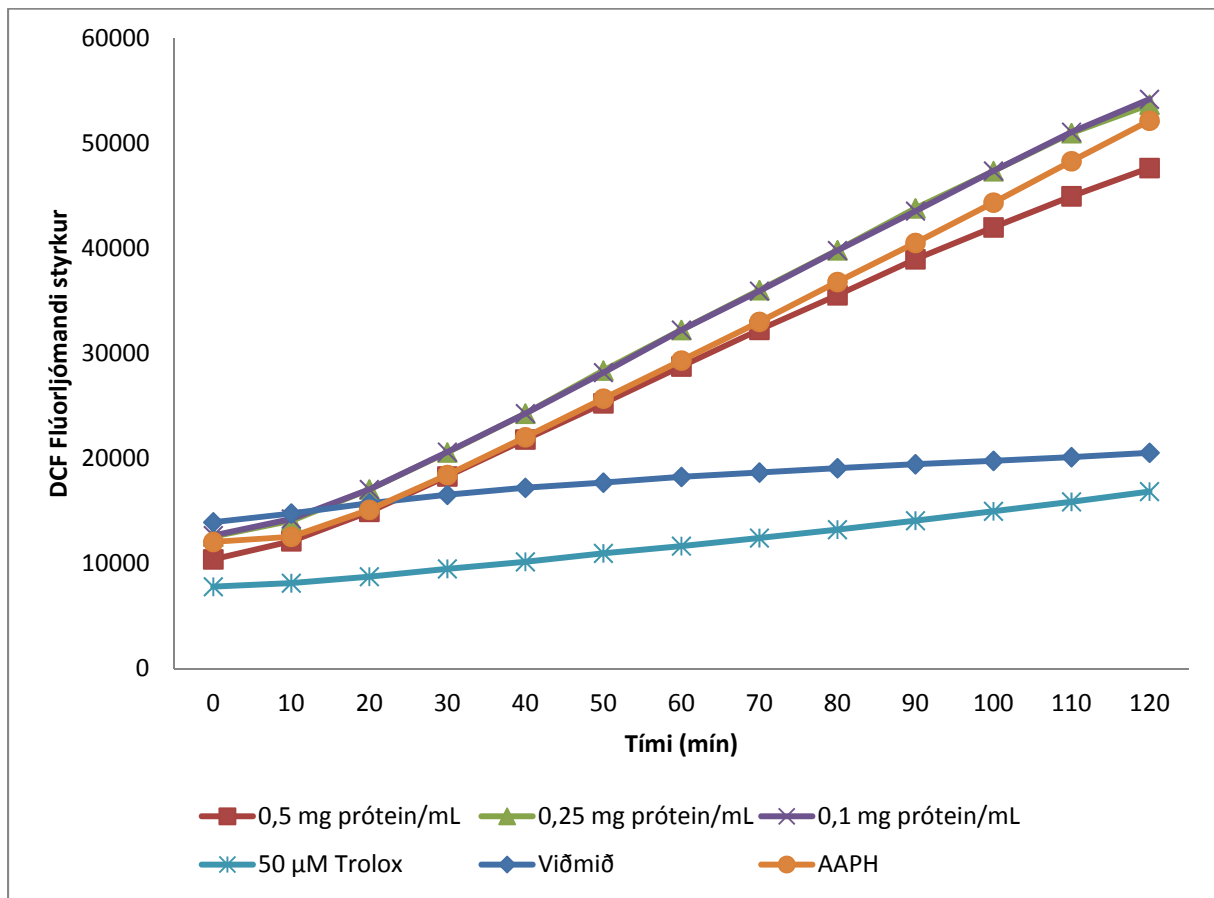
3.2.2. *In-vitro* lífvirknimælingar í frumumódeli

Áður en lífvirknimælingar í frumumódeli voru framkvæmdar voru áhrif mismunandi styrks á frumulifun metin þar sem mikilvægt var talið að styrkur próteinmeltu hefði ekki áhrif á lifun og heilbrigði frumnanna. Styrkur ufsapróteinmeltu á bilinu 0,5 – 0,01 mg/mL mg/mL hafði engin áhrif á frumulifun og var því talið óhætt að vinna með þessa styrkleika (Mynd 1).



Mynd 1. Frumulifun HepG2 frumna eftir 48 klst meðhöndlun með mismunandi styrk (0,01-0,5 mg/mL prótein) ufsapróteinmeltu Myndin sýnir meðaltal \pm staðalfrávik, n=4.

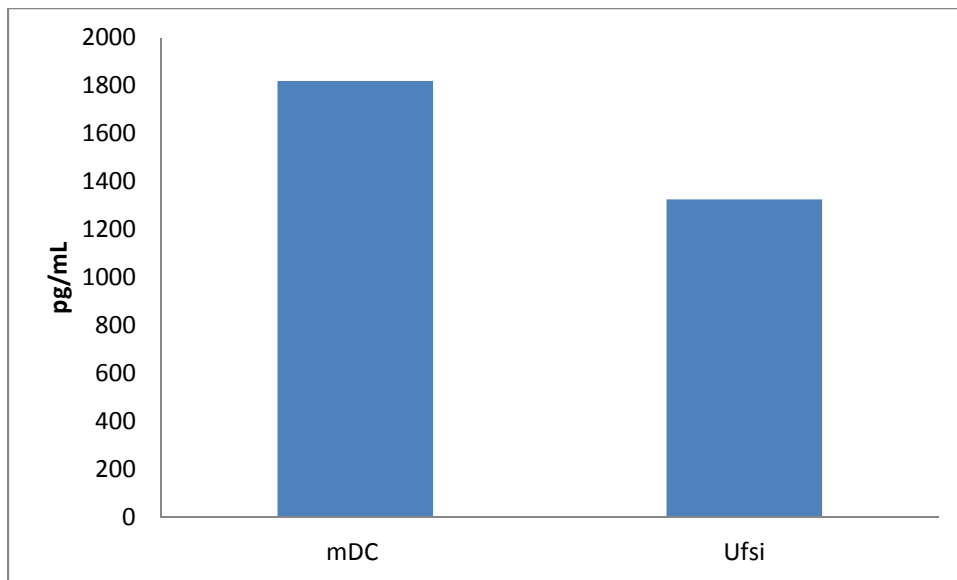
Niðurstöður úr andoxunarvirknimælingum í frumumódeli fyrir ufsapróteinmeltuna í þremur styrkleikum eru sýndar á Mynd 2. Eins og sjá má er andoxunarvirkni einungis mæld í sýni sem inniheldur 0,5 mg prótein/mL. Sýni sem innihéldu lægri styrk sýndu enga andoxunarvirkni. Þessi gildi eru nokkuð lægri en þau gildi sem við höfum verið að mæla í sama styrkleika af fiskpróteinmeltu [22].



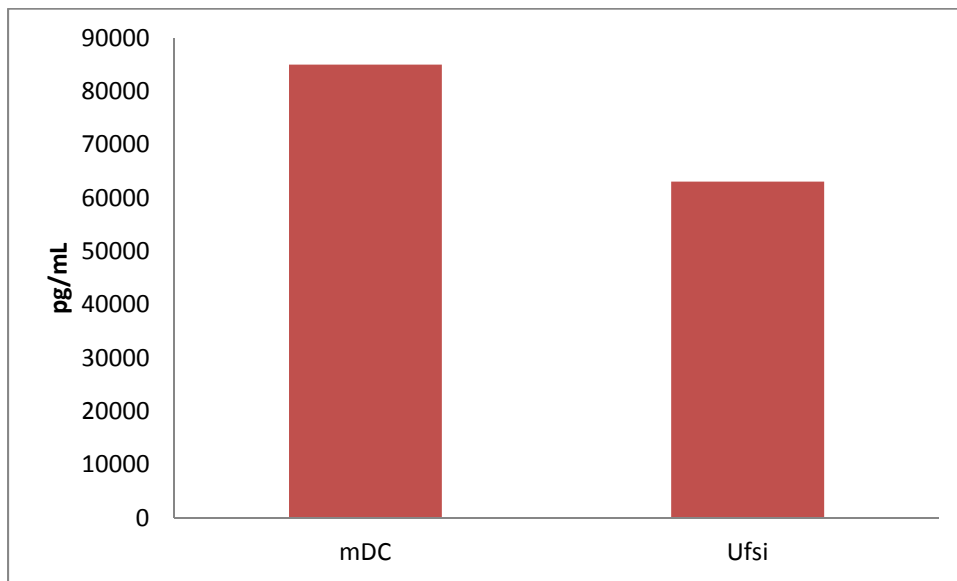
Mynd 2. DCF flúorljómandi styrkur í HepG2 frumum meðhöndluðum með mismunandi styrk (0,1-0,5 mg/mL prótein) af ufsapróteinmeltu. Myndin sýnir meðaltal, n=4.

3.2.3. Ónæmisstýrandi (andbólgu-) áhrif

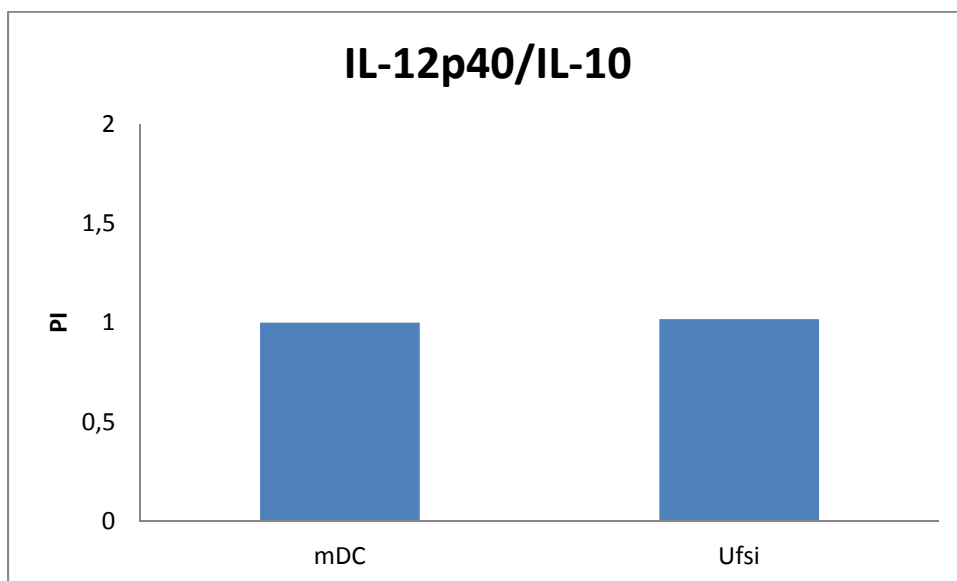
Bólguaukandi og bólguhemjandi áhrif efnanna voru metin með því að mæla seytun boðefnanna IL-12 og IL-10. Stundum eru heildaráhrifin metin með því reikna út hlutfall af seytun þessara tveggja boðefna. Angafrumur sem voru ræktaðar með ufsapróteinmeltu seyta mun minna magni af IL-10 en angafrumur ræktaðar án ufsapróteinmeltu (mynd 3a). Angafrumur ræktaðar með ufsapróteinmeltu seyta minna magni af IL-12p40 en angafrumur ræktaðar án ufsapróteinmeltu (mynd 3b) sem leiðir til þess að hlutfallsstuðullinn verður um einn (mynd 3c).



Mynd 3a. IL-10 boðefnaseytun angafrumna ræktaðra með og án ufsapróteinmeltu.



Mynd 3b. IL-12p40 boðfnaseytun angafrumna ræktaðra með og án ufsapróteinmeltu.



Mynd 3c. Boðfnaseytun angafrumna ræktaðra með og án ufsapróteinmeltu.

Niðurstöðurnar benda til þess að í ufsapróteinmeltu séu efni sem hafi áhrif á boðfnaseytun angafrumna þar sem IL-10 (bólguþöfn) sem og IL-12p40 (andbólguþöfn) seytun lækkaði. Hlutfallsseytunin var því einn sem þýðir að heilt á litið hafði próteinmeltan engin nettó andbólguáhrif.

3.2.4. Bakteríuhamlandi áhrif

Niðurstöður benda ekki til þess að ufsapróteinmelta búi yfir vaxtarhamlandi áhrifum á þær bakteríutebundur sem rannsakaðar voru. Eftir að bakteríur höfðu verið ræktaðar í viku þá voru skálar skoðaðar og var þá kominn góður vöxtur baktería sem þakti skálarnar og engin eyða sjáanleg kringum dropa eða holur þar sem ufsapróteinmeltu hafði verið komið fyrir í mismunandi styrkleika. Sömu niðurstöður fengust með báðum ufsapróteinmeltu afurðunum sem rannsakaðar voru og eru niðurstöður í samræmi við fyrri rannsóknir á bakteríuhamlandi eiginleikum annarra fiskpeptíðafurða (Matís skýrsla 38-08).

3.3. Afkoma og þroski lirfa

Tafla 3 sýnir yfirlit yfir niðurstöður eldistilraunar.

Tafla 3. Niðurstöður eldistilraunar. Afkoma er metin með talningu lirfa á tveimur tímapunktum, 50 og 100 dögum eftir klak (dph). Þyngd lirfa er metin á mismunandi tímapunktum og gefið upp sem þurrvigt (dw) eða blautvigt (ww). Gallar eru metnir 148 dögum eftir klak og gefnir upp sem hlutfall lirfa sem er hent vegna ýmissa alvarlegra byggingargalla.

Uppruni þorsklirfa	Villtur		Eldis	
	Auðguð fóðurdyr	Control	Auðguð fóðurdyr	Control
Afkoma (50dph) %	6,5%	7,5%	14%	24%
Afkoma (100dph) %	5,6%	6,3%	5,8%	8,1%
Þyngd (dw) 44 dph (mg)	10,4	9,7	8,9	7,7
Þyngd (ww) 75 dph (g)	0,61	0,59	0,54	0,52
Þyngd (ww) 148 dph (g)	11,8	12,3	10,7	11,8
Gallar % (148 dph)	1,6%	0,4%	7,0%	3,6%

Afkoma lirfa var frekar lág bæði meðal lirfa frá villtum þorski og eldisþorski. Vaxtarhraði lirfanna var alveg viðunandi en lægri hjá lirfum frá eldisþorski sem rekja má til minni stærð eggja. Afkoma lirfa frá eldisþorski var ágæt í byrjun en svo kom upp bakteríusýking sem olli töluverðum dauða rúmlega 50 dögum eftir klak og afkoma var einungis 5,8-8,1%. Ekki greindist mikið af alvarlegum útlitsgöllum í lirfum 148 dögum eftir klak, samanborið við það sem venjulega sést í seiðaeldi hjá Hafrannsóknastofnun. Hlutfall útlitsgalla var mun hærra hjá lirfum af eldisuppruna og er það talið geta orsakast af bakteríusýkingu sem upp kom og sem

olli miklum afföllum. Hlutfall útlitsgallaðra lirfa var heldur hærri í hópi lirfa sem fengið höfðu próteinbætt fóðurdýr samanborið við viðmiðunarhóp en hins vegar benda niðurstöður til þess að meðhöndlun með ufsapróteinmeltu hafi ekki áhrif á afkomu eða galla lirfa.

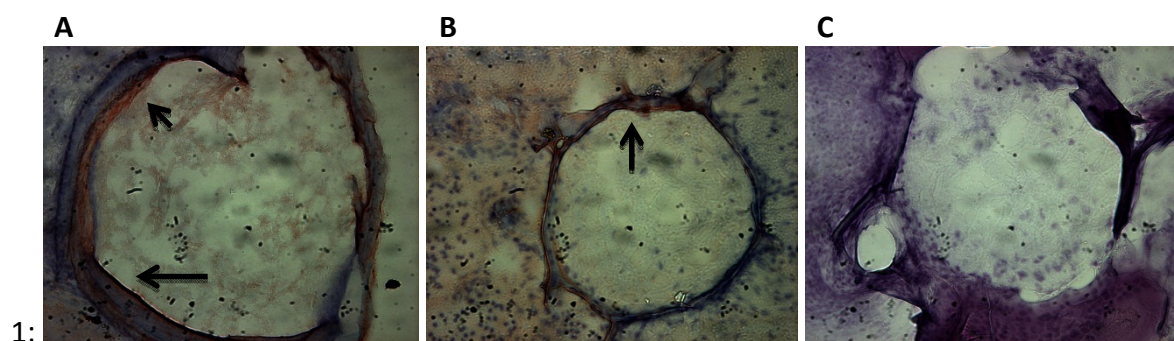
3.4. Örvun valinna ónæmisþátta

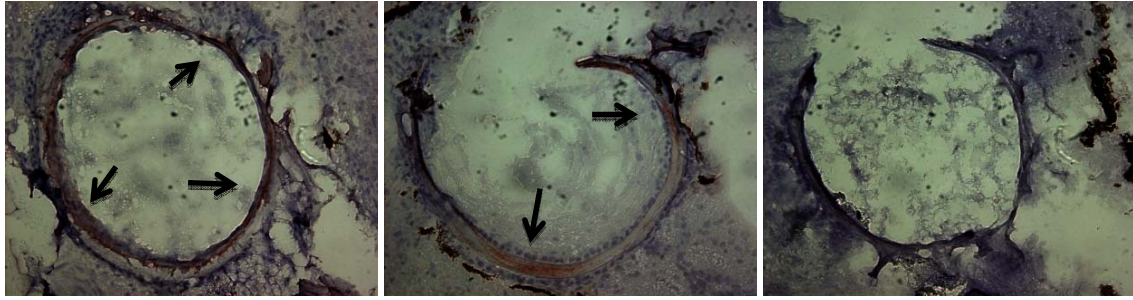
Ónæmisörvandi áhrif ufsapróteinmeltu voru rannsökuð í efnivið sem safnað var í þessu verkefni (tilraun 2) en einnig í TOPCOD, OPTILAR (tilraun 1). Framleiðsla og dreifing IgM og lysozyme var rannsakað með vefjalitun þar sem notuð voru sérhæfð mótEfni. Vefjasneiðum (þverskornar lirfur) var safnað frá augum að sporði lurfanna.

3.4.1. IgM

Niðurstöður sýna að IgM er til staðar í bæði meðhöndluðum og ómeðhöndluðum lurfum 42 dögum eftir klak. IgM var mest í meltingarvegi lirfa en einnig á yfirborði og við hryggstreng. IgM svörun var almennt mun sterkari í lurfum sem fengið höfðu ufsaprótein-bætt fóðurdýr. IgM svörun var auk þess mun jafnari í lurfum sem fengið höfðu ufsaprótein-bætt fóðurdýr samanborið við viðmiðunarhópinn þar sem mikill munur var í svörun á milli einstakra lirfa, lítil sem engin svörun í sumum á meðan mikil svörun var í öðrum

Niðurstöður sýna að vefur í hryggstreng meðhöndlaðra lirfa var mun þéttari og greinilegri en vefur ómeðhöndlaðra lirfa auk þess sem meiri IgM svörun kom fram innan í hryggstreng meðhöndlaðra samanborið við ómeðhöndlaðra lirfa (mynd 4).

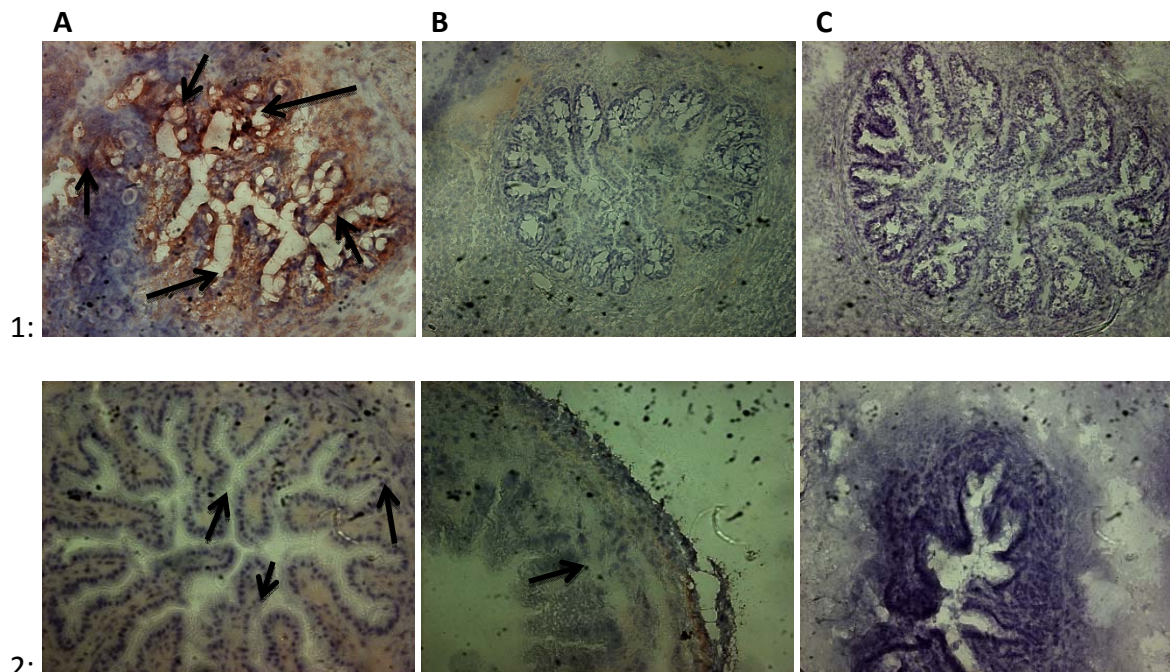




2:

Mynd 4: IgM mótefnalitun í meðhöndluðum (A) og ómeðhöndluðum (B) lirfum úr tilraun 1 og 2 (400x stækkun). Neikvætt viðmið þar sem fyrsta stigs mótefnum var sleppt er einnig sýnt í sömu stækkun (C). Örvar benda á jákvæða svörun í hryggstreng.

Ekki reyndist vera munur á IgM svörun á yfirborði lirfa í mismunandi meðhöndlunarhópum (niðurstöður ekki sýndar). Í meltingarvegi kom fram afar sterk og jöfn IgM svörun í meðhöndluðum lirfum, hins vegar sást mjög lítil eða jafnvel engin IgM svörun í ómeðhöndluðum lirfum í báðum tilraunum (Myndir 5).



1:

2:

Mynd 5: IgM mótefnalitun í meðhöndluðum (A) og ómeðhöndluðum (B) lirfum úr tilraun 1 og 2 (400x stækkun). Neikvætt viðmið þar sem fyrsta stigs mótefnum var sleppt er einnig sýnt í sömu stækkun (C). Örvar benda á jákvæða svörun í meltingarvegi. Sýndar eru myndar af lirfum af villtum uppruna úr tilraun 2.

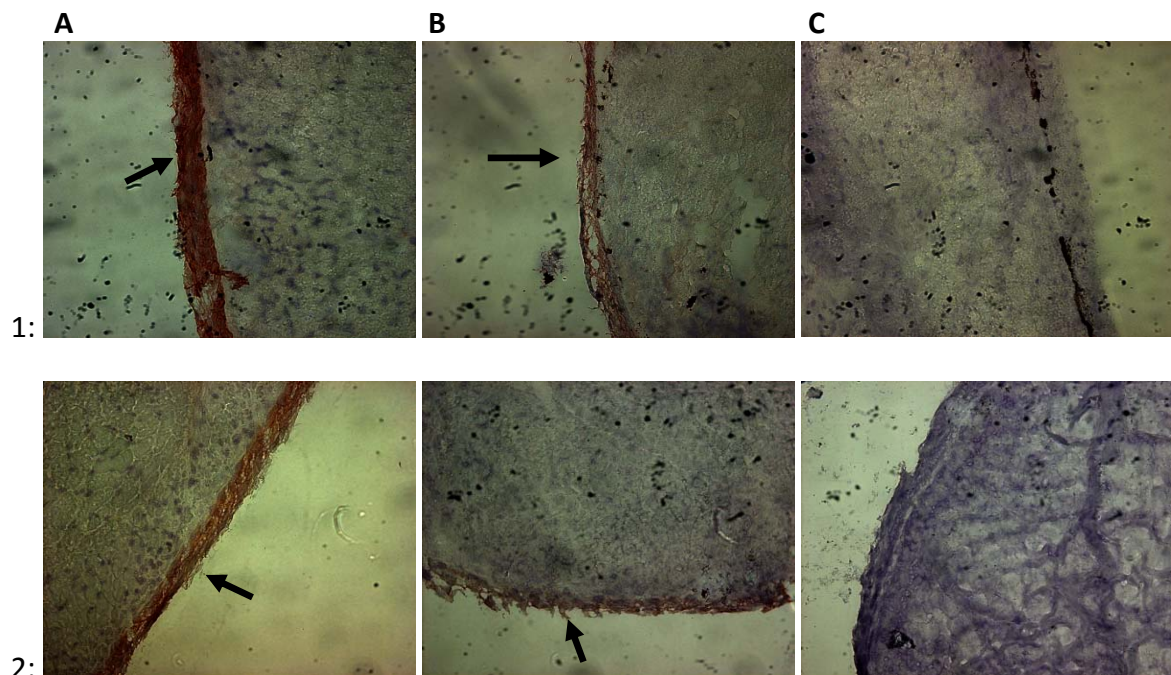
Við samanburð á milli villtra- og eldislirfa kom í ljós að IgM svörun í meltingarvegi er sterkari í eldislirfum samanborið við villtar lirfur (niðurstöður ekki sýndar).

3.4.2. Lysozyme

Niðurstöður sýna lysozyme svörun í lirfum 42 dögum eftir klak. Svörunin var mest í meltingarvegi lirfa en einnig á yfirborði og við hryggstreng.

Svörun gegn lysozyme var almennt mun sterkari í meðhöndluðum lirfum samanborið við í ómeðhöndluðum auk þess sem svörunin í meðhöndluðu lirfunum var mun jafnari í samanburði við ómeðhöndlaðar.

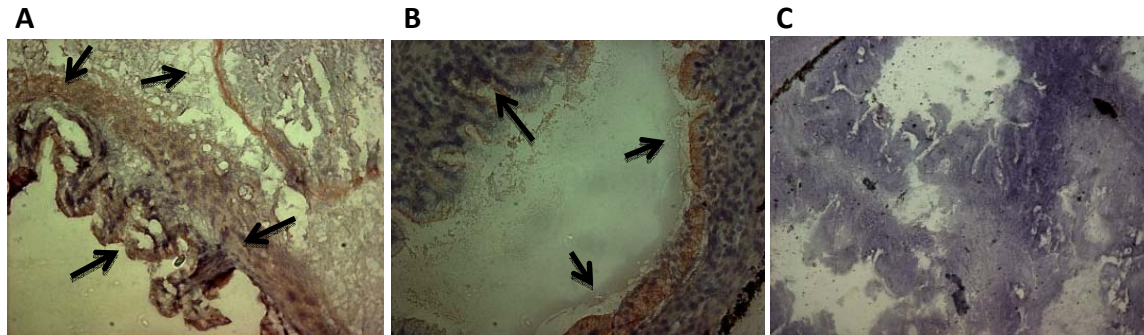
Ekki reyndist vera munur á svörun lysozyme við hryggstreng lirfa. Vefur á yfirborði meðhöndlaðra lirfa reyndist hinsvegar mun þéttari og greinilegri en vefur ómeðhöndlaðra lirfa auk þess sem svörun lysozyme var þar meiri hjá lirfum sem fengið höfðu fóðurdýr með ufsapróteinmeltu (Mynd 6).



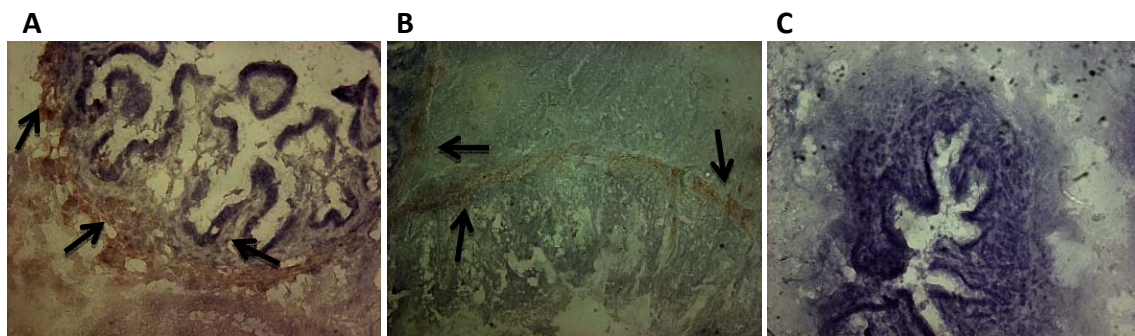
Mynd 6: Lýsósím mótefnalitun í meðhöndluðum (A) og ómeðhöndluðum (B) lirfum úr tilraun 1 og 2 (400x stækkun). Neikvætt viðmið þar sem fyrsta stigs mótefnum var sleppt er einnig sýnt í sömu stækkun (C). Örvar benda á jákvæða svörun á yfirborði lirfa.

Lysozyme svörun var mjög sterk í meltingarvegi lirfa sem fengið höfðu ufsabætt fóðurdýr (Myndir 7 og 8). Ekki var mikill munur á svörun á milli einstakra lirfa eða á milli eldis- og

villtra lirfa í meðhöndluðum hópi en í ómeðhöndluðum lirfum var lysozyme svörun mjög missterk.



Mynd 7: Lýsósím mótefnalitun í meðhöndluðum (A) og ómeðhöndluðum (B) eldis lirfum úr tilraun 2 (400x stækkun). Neikvætt viðmið þar sem fyrsta stigs mótefnum var sleppt er einnig sýnt (C,200x stækkun). Örvar benda á jákvæða svörun í meltingarvegi.



Mynd 8: Lýsósím mótefnalitun í meðhöndluðum (A) og ómeðhöndluðum (B) villtum lirfum úr tilraun 2 (400x stækkun). Neikvætt viðmið þar sem fyrsta stigs mótefnum var sleppt er einnig sýnt í sömu stækkun (C). Örvar benda á jákvæða svörun í meltingarvegi.

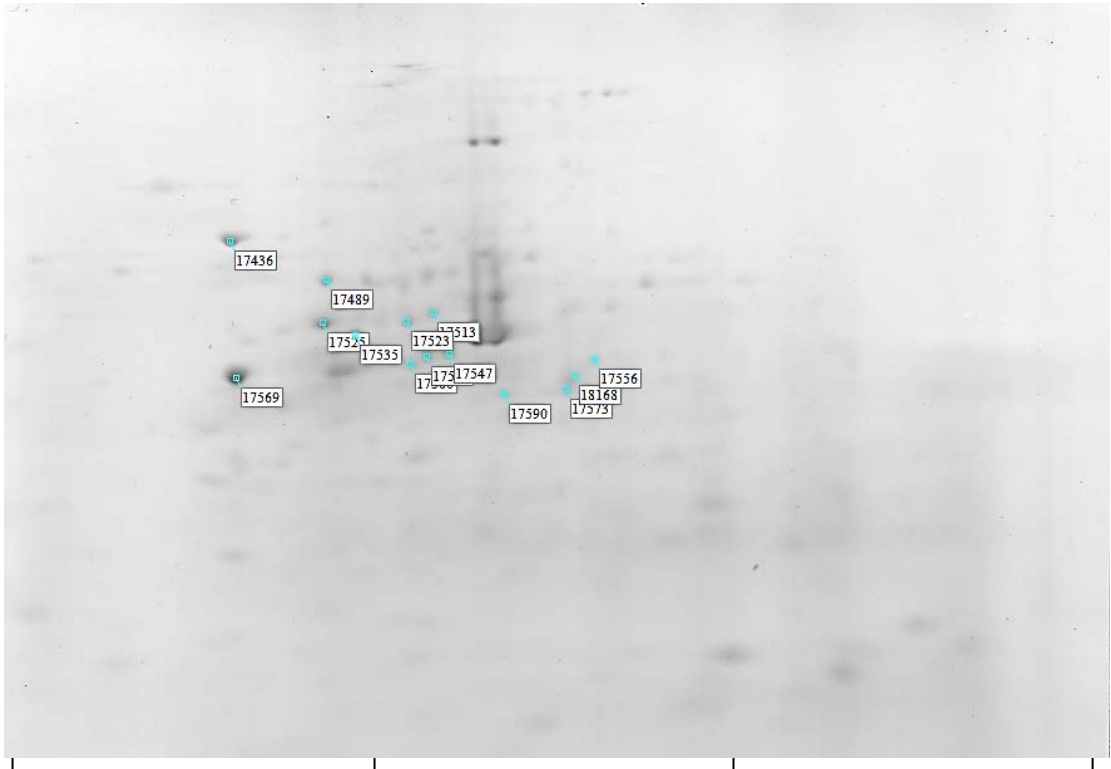
Almennt reyndist aukin lysozyme svörun í meltingarvegi og á yfirborði lirfa sem fengið höfðu fóðurdýr með ufsapróteinmeltu. Ekki reyndist vera munur á lysozyme svörun á milli eldislirfa eða lirfa af villtum uppruna þó svo vefur á yfirborði eldislirfa væri mun þéttari og greinilegri en vefur á yfirborði villtra lirfa.

3.5. Próteinmengjagreiningar

3.5.1. Myndgreining gela

Mynd 9 sýnir samanburðargel af meltingarvegspróteinum. Fjöldi depla á gelum var á bilinu 75 -218. Eftir nánari skoðun í myndgreiningarforriti fór fjöldinn niður í 73 – 171 á þeim 12

gelum sem greind voru. Þessir deplar voru með áætlaðan mólmassa á bilinu 35 - 80 kDa og áætlaðan pI á bilinu pH 4,6 - 5,6. Í töflu 4 má sjá þau prótein sem sýndu breytingar í tjáningu við meðhöndlun. Á gelinu á mynd 9 sjást númer deplanna sem klipptir voru út sem og staðsetning þeirra á gelinu.



Mynd 9: Samanburðargel af meltingarvegspróteinum sem dregin voru út úr lirfum 42 dögum eftir klak. Lirfurnar voru frá 3ju kynslóðar eldisþorski og fengu fæðudýr sem auðguð voru með ufsapróteinmeltu. Númer deplanna sem sýndu breytingar sjást á myndinni. Deplarnir sem voru kennigreindir eru eftirfarandi: 17560, 17556, 18168, 17573, 17525 and 17489.

3.5.2. Kennigreining depla með massagreiningu

Fjórtán deplar voru valdir til kennigreiningar þar sem próteinin að baki þeim sýndu breytingar í tjáningu eftir meðhöndlun með ufsapróteinmeltu (tafla 4). Fyrir sex af þeim 14 próteinum sem valin voru til kennigreiningar fannst samsvörun við þekkt prótein. Þrjú þessara próteina (deplar 17556, 18168 og 17573) voru kennigreind sem *beta-actin like protein* úr regnbogasilungi (*Oncorhynchus mykiss*) og *honeycomb grouper* (*Epinephelus merra*). Prótein depill 17560 var kennigreindur sem *fast myotomal muscle actin* úr

Atlantshafslaxi (*Salmo salar*). Prótein 17525 fann mesta samsvörun við *heat shock cognate* úr lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) og depill 17489 líktist mest ATP synthase H⁺ transporting mitochondrial F1 complex beta úr Atlantshafslaxi. Engin samsvörun fannst við próteindepla 17513, 17523, 17535, 17569, 17547, 17550, 17590 and 17436.

Tafla 4: 14 próteindeplar sem voru klipptir út til kennigreiningar.

Depill.	Prótein númer.	BLAST skor	Prótein	Tegund	Breyting í tjáningu eftir meðhöndlun	
					Eldi - Villt	pI kDa
17513	-	-	Engin greining	Engin greining	↑ - ↓	5.15 47
17523	-	-	Engin greining	Engin greining	↑ - ↑	5.10 45
17535	-	-	Engin greining	Engin greining	↑ - ↓	4.90 40
17569	-	-	Engin greining	Engin greining	↑ - ↑	4.60 37
17547	-	-	Engin greining	Engin greining	↑ - ↑	5.20 40
17550	-	-	Engin greining	Engin greining	↓ - ↑	5.15 40
17560	NP_001117011.1	789	fast myotomal muscle actin	<i>Salmo salar</i>	↑ - ↑	5.10 40
17556	NP_001117707.1	784	beta-actin	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↓ - ↑	5.60 40
18168	AAF80342.1	783	beta-actin	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	↑ - ↓	5.55 37
17573	ACD62375.1	543	beta-actin	<i>Epinephelus merra</i>	↑ - ↑	5.55 36
17590	-	-	Engin greining	Engin greining	↑ - ↑	5.30 35
17436	-	-	Engin greining	Engin greining	↑ - ↑	4.60 80
17525	ADV02377.1	540	heat shock cognate	<i>Coregonus clupeaformis</i>	↓ - ↑	4.80 47
17489	ACH85277.1	483	ATP synthase H ⁺ transporting mitochondrial F1 complex beta	<i>Salmo salar</i>	↓ - ↓	4.80 60

pI: Jafnhleðslupunktur, kDa: Mólmassi.

4. Ályktanir

Niðurstöður úr lífvirknimælingum á ufsapróteinmeltu benda til töluverðrar andoxunarvirkni. Andbólguvirkni var einnig staðfest en þar sem bólguvirkni var einnig til staðar reyndist nettó andbólguvirkni engin. Vaxtarhamlandi virkni gegn nokkrum þekktum bakteríustofnum var ekki til staðar í sýnunum.

Niðurstöður eldistilrauna benda til þess að þó svo meðhöndlun með ufsapróteinmeltu virðist hafa ónæmisörvandi áhrif á þá þætti sem hér voru rannsakaðir þá hafi meðhöndlun ekki áhrif á afkomu og gæði lirfa. Hópar sem meðhöndlaðir voru með ufsabættum fóðurdýrum voru að koma heldur verr út samanborið við viðmiðunarhópa en þar gætu verið um keraáhrif að ræða. Þetta er ekki í samræmi við fyrri niðurstöður sem gáfu til kynna bættu þroskun lirfa og minni tíðni alvarlegra útlitsgalla. Útlitsgæðin á seiðunum í þessari tilrauninni voru mjög góð sérstaklega hjá lirfum sem meðhöndluð voru með hefðbundnum hætti. Nánast engin tilfelli sáust af hryggvandamálum s.s. lordosis, kyphosis og scoliosis auk þess sem hausfetta (e. stargazers) var lítið áberandi, þó greina megji mjög væga hausfettu. Það má því telja að lítið svigrúm sé fyrir framfarir á þessu sviði með notkun þeirra auðgunar- og eldisaðferða sem nú eru notaðar. Hins vegar benda niðurstöður þessarar tilraunar og fyrri tilrauna að notkun ufsapróteinmeltu geti bætt og jafnað gæði seiða ef gæði eggja er ábótavant en þegar gæði eggja eru góð eins og hér þá hafi meðhöndlun ekki áhrif.

Niðurstöður vefjalitunar benda til þess að meðhöndlun með ufsapróteinmeltu gefi lirfur af jafnari gæðum auk þess sem meðhöndlun örvaði framleiðslu á IgM og lysozyme. Frekari umfjöllun um þessar niðurstöður eru birtar í skýrslu til Nýsköpunarsjóðs Námsmanna sumarið 2010 („Áhrif fiskpeptíða á próteinmengi þorsklirfa – með áherslu á ósérhæfða ónæmissvörun“) og sumarið 2011 („Próteinmengjagreining meltingarvegs þorsklirfa“) auk meistaraverkefnis nemanda (áætlun lok vor 2012).

Próteinmengjagreiningar sýndu að ufsapróteinmeltan var að hafa áhrif á tjáningu frumgrindapróteina eins og aktíns. Einnig greindust prótein sem taka þátt í streitu sem og efnaskiptaensímið ATP-synþasi. Einungis náðist að kenngreina 6 prótein af 14 sem sýndu breytta tjáningu við meðhöndlun með ufsapróteinmeltu. Lágt kenngreiningarhlutfall kom líklega til vegna lítils próteinmagns á gelunum o.þ.a.l. í próteindeplunum. Þar sem IgM og lysozyme eru framleidd í mjög litlu magni er ólíklegt að ná að greina þau á gelunum. Af þeim

6 próteinum sem kennigreind voru fundu 4 prótein samsvörun við aktín. Hlutfall aktíns í heildar fjölda af kennigreindum próteinum kemur ekki á óvart þar sem aktín er mjög algengt og vel varðveitt prótein í frumum. Það sem kom á óvart var að engir próteindeplar fundu samsvörun við prótein skilgreind úr þorski.

5. Þakkarorð

Höfundar skýrslunnar þakka AVS sjóðnum fyrir veittan styrk til verkefnisins. Einnig þökkum við Dr. Merete Bjørgan Schrøder fyrir séhæfð mótefni.

6. Heimildir

1. Steinarsson, A. *Þorskframleiðsla hjá Hafrannsóknastofnuninni*. Stöðumat og stefnumótun fyrir þorskeldi 2007; Available from: <http://www.fiskeldi.is/pdf/radstefna2007/29/agnar.pdf>.
2. Hall, T.E., P. Smith, and I.A. Johnston, *Stages of embryonic development in the Atlantic cod Gadus morhua*. Journal of Morphology, 2004. **259**(3): p. 255-270.
3. Magnadóttir, B., et al., *Immunostimulation of larvae and juveniles of cod, Gadus morhua L.* Journal of Fish Diseases, 2006. **29**(3): p. 147-155.
4. Perez-Casanova, J.C., et al., *Development of the digestive capacity in larvae of haddock (Melanogrammus aeglefinus) and Atlantic cod (Gadus morhua)*. Aquaculture, 2006. **251**(2-4): p. 377-401.
5. Brown, J.A., G. Minkoff, and V. Puvanendran, *Larviculture of Atlantic cod (Gadus morhua): progress, protocols and problems*. Aquaculture, 2003. **227**(1-4): p. 357-372.
6. Imsland, A.K., et al., *Persistent growth effects of temperature and photoperiod in Atlantic cod Gadus morhua*. Journal of Fish Biology, 2007. **71**(5): p. 1371-1382.
7. Cahu, C.L., et al., *Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass Dicentrarchus labrax larvae*. Aquaculture, 1999. **171**(1-2): p. 109-119.
8. Zambonino Infante, J.L., C.L. Cahu, and A. Peres, *Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves dicentrarchus labrax larval development*. Journal of Nutrition, 1997. **127**(4): p. 608-614.
9. Hákonardóttir, K. and L. Hrólfsdóttir, *Áhrif meðhöndlunar með fiskipeptíðum á ósérhæfða ónæmissvörun í þrosklirfum*. B.Sc. thesis. University of Akureyri, Akureyri, Iceland., 2008.
10. Cash, P. and J.S. Kroll, *Protein Characterization by Two-Dimensional Gel Electrophoresis*, in *Haemophilus influenzae Protocols* 2003. p. 101-118.
11. Ehlenfeldt, M.K. and R.L. Prior, *Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. **49**(5): p. 2222-2227.
12. Cao, G.H., H.M. Alessio, and R.G. Cutler, *Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants*. Free Radical Biology and Medicine, 1993. **14**(3): p. 303-311.
13. Wu, H.C., H.M. Chen, and C.Y. Shiau, *Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus)*. Food Research International, 2003. **36**(9-10): p. 949-957.
14. Boyer, R.F. and C. J. McCleary, *Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferretin iron release*. Free Radical Biology and Medicine, 1987. **3**(6): p. 389-395.
15. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. Analytical Biochemistry, 1996. **239**(1): p. 70-76.
16. Samaranyaka, A.G.P., D.D. Kitts, and E.C.Y. Li-Chan, *Antioxidative and Angiotensin-1-Converting Enzyme Inhibitory Potential of a Pacific Hake (Merluccius productus) Fish Protein Hydrolysate Subjected to Simulated Gastrointestinal Digestion and Caco-2 Cell Permeation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(3): p. 1535-1542.
17. Page, B., M. Page, and C. Noel, *A NEW FLUOROMETRIC ASSAY FOR CYTOTOXICITY MEASUREMENTS IN-VITRO*. International Journal of Oncology, 1993. **3**(3): p. 473-476.

18. Omarsdottir, S., E.S. Olafsdottir, and J. Freysdottir, *Immunomodulating effects of lichen-derived polysaccharides on monocyte-derived dendritic cells*. *International Immunopharmacology*, 2006. **6**(11): p. 1642-1650.
19. Bjornsdottir, R., et al., *Selection of bacteria and the effects of bacterial treatment of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) eggs and larvae*. *Aquaculture*, 2010. **302** (3-4): p. 219-227.
20. Hermannsdottir, R., et al., *Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009. **27** (5): p. 595-602.
21. Liebler, D.C., *Introduction to proteomics* 2002, Totowa, New Jersey: Humana Press.
22. Halldórsdóttir, S.M., et al., *Properties of hydrolysed saithe protein isolates prepared via pH shift process with and without dewatering*. *LWT - Food Science and Technology*, 2011. **44**(10): p. 1999-2004.

7. Viðaukar

7.1. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á WEFTA ráðstefnu í september 2011

41st WEFTA Meeting, 27-30 September 2011, Gothenburg, Sweden.

Analysis on the bioactivity of fish protein hydrolysates used as feed enrichment for Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae

Hólmfríður Sveinsdóttir^{1,*}, Húgrún L. Heimisdóttir^{1,2}, Jónína, Jóhannsdóttir¹, Patricia Y. Hamaguchi¹, Arnljótur B. Bergsson¹, Hordur G. Kristinsson^{1,3} and Steinar Svavarsson⁴

¹Matís ohf. - Icelandic Food and Biotech R&D. Vínlandsleið 12, 113 Reykjavík, Iceland

²University of Akureyri, Nordurslod 2, 600 Akureyri, Iceland

³Department of Food Science and Human Nutrition. UF, Gainesville, FL, USA

⁴Iceprotein ehf. - Verid, Háeyri 1, 550 Saudárkrókur, Iceland

*Corresponding author: holmfridur.sveinsdottir@matis.is

In several marine fish species, the addition of protein hydrolysates has been reported to have a positive effect on larval performance. Bioactive compounds of protein hydrolysates have been found to be well suited to support larval growth. The provision of a more digestible diet to the newly hatched fish should improve both their growth and survival since amino acids from dietary proteins are absorbed mainly as peptides or amino acids.

The objective of this study was to analyze and deliver bioactive compounds found in pollock (*Pollachius virens*) protein hydrolysates to improve the survival rate and growth of Atlantic cod larvae.

Peptide samples were prepared by enzymatically hydrolyzing minced Pollock fillets with a commercial enzyme mixture: Alcalase and Protamex. Properties of the bioactive compounds were analyzed by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC), and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging capacity together with cell-based immunomodulating assays. Intracellular antioxidative activity of pollock protein hydrolysates

was determined by a novel cellular antioxidant assay using HepG2 cells. A pollock protein hydrolysate was used for enrichment of the live feed offered to cod larvae from the onset of exogenous feeding and the effects of treatment on larval growth and selected innate immune parameters studied.

Results showed that pollock protein hydrolysates possess good antioxidant properties supported by chemical as well as cell based antioxidative assays. The intracellular antioxidative activity increased with increased concentration of the protein hydrolysates. Cell viability was not affected when cells were incubated for 48 h with different concentrations of protein hydrolysates.

This study presents antioxidant properties of protein hydrolysates originating from pollock assessed by chemical as well as cellular based methods. This result is an important step in analyzing bioactive properties of fish protein hydrolysates for the use as feed enrichment in marine fish aquaculture.

7.2. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á líffræðiráðstefnu í nóvember 2011

Biology in Iceland 2011 Conference in Reykjavik, Iceland.

Áhrif ufsapróteinmeltu á valda þætti í ósérhæfðu ónæmissvari þorsklirfa

Hugrún L. Heimisdóttir^{1,2}, Jónína Jóhannsdóttir¹, Rannveig Björnsdóttir^{1,2}, Steinar Svavarsson³, Oddur Vilhelmsson² and Hólmfríður Sveinsdóttir¹

¹Matís Ohf, Vínlandsleið 12, Reykjavík, Ísland; ²Háskólinn á Akureyri, Borgir v/Nordurslóð, Akureyri, Ísland; ⁴Iceprotein ehf. Sauðárkrókur, Ísland

Markmið rannsóknarinnar var að skoða áhrif auðgunar lifandi fæðudýra fyrir þorsklirfur (*Gadus morhua* L.) með ufsapróteinmeltu (UPM) á mikilvæga lífefnafræðilega ferla. Þetta var gert með það að leiðarljósi að finna mikilvæga efnaskiptaferla í þroskanum sem tengja mætti við bættan vöxt, þroska og/eða afkomu þorsklirfanna. Rannsókuð var örvun IgM og lýsósíms en hvort tveggja eru lykilþættir í ósérhæfðu ónæmissvari. Við þessar rannsóknir var notuð ónæmisvefjafræði þar sem sértæk mótefni voru notuð til að kanna hvort meðhöndlun með UPM hefði jákvæð áhrif á framleiðslu og/eða dreifingu þessara þátta í frumum og vefjum lirfanna. Niðurstöður gefa sterkar vísbendingar um að fóðrun þorsklirfa með UPM-auðguðum fæðudýrum hafi jákvæð áhrif á þroska innri líffæra lirfa á fyrstu stigum eldisins og bæta þannig gæði lirfanna. IgM og lýsósím svörun greindist í öllum meðhöndluðum lirfum og var svörunin mun sterkari í meltingarvegi og á yfirborði meðhöndlaðra lirfa samanborið við ómeðhöndlaðar lirfur. Niðurstöður sýndu jafnframt jafnari dreifingu IgM og lýsósíms í meðhöndluðum lirfum samanborið við ómeðhöndlaðar lirfur þar sem svörunin var allt frá því að vera mikil í það að vera nánast engin. Það eru því sterkar vísbendingar um að auðgun fæðudýra lirfa með UPM leiði til örvunar ósérhæfðrar ónæmissvörunar lirfa og hafi þannig jákvæð áhrif á þroskun þeirra.

7.3. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á þorskeldisráðstefnu í september 2011

Cod Farming in the Nordic Countries, Reykjavík, Iceland, 2011

Live feed enrichment for improved quality and survival of intensively reared cod larvae,

Rannveig Björnsdóttir, Jónína Th. Jóhannsdóttir, Hugrún L. Heimisdóttir, Agnar Steinarsson, María Pétursdóttir, Hólmfríður Sveinsdóttir, Oddur Vilhelmsson and Albert K. Imsland

7.4. Ágrip fyrir veggspjaldakynningu á Aquaculture Europe í október 2010

IMMUNOSTIMULATION AND ENHANCED DEVELOPMENT OF ATLANTIC COD (*Gadus morhua*) LARVAE

HL Heimisdottir¹, J Johannsdottir², A Steinarsson³, EE Thorarinsdottir^{1,2} and R Bjornsdottir^{1,2*}

¹University of Akureyri – Business & Science, Borgir v/Nordurslod, IS-600 Akureyri, Iceland; ²Matis – Icelandic Food and Biotech RTD, Borgir v/Nordurslod, IS-600 Akureyri, Iceland; ³Icelandic Marine Institute, Stadur, IS-240 Grindavik, Iceland

Introduction

High mortalities are associated with the early larval stages in cod aquaculture (Rosenlund et al. 2007; Yúfera et al. 2007), with survival of only 10-20% from larvae to juvenile commonly observed (Steinarsson, 2004). The innate immune system represent the first line of defence and many of its components are well developed in fish (Gómez et al. 2008). Stimulation of innate immune parameters is therefore considered a promising approach for improved survival and larval quality (Bricknell et al. 2005). Cod serum contains relatively high levels of natural IgM which may compensate for the poor specific antibody response observed in cod (Magnadottir et al. 2009). Lysozyme is an enzyme playing a role in digestion and the early line of innate defence in fish (Saurabh et al. 2008). Feed supplementation using probiotics (Nayak, 2010) and other immunostimulants (Bricknell et al. 2005) has been associated with elevated levels of IgM and lysozyme in serum and mucus in fish. Fish peptides may furthermore provide immunostimulating effects in addition to nutritional benefits and improved resistance against pathogens observed in fish larvae (Johannsdottir et al. 2008; Pedersen et al. 2004).

The aim of the present study was to investigate the stimulating effects of a peptide hydrolysate isolated from pollock (*Pollachius virens*) on selected parameters of the unspecific immune system of cod larvae. The aim was furthermore to verify promising results of treatment during early larval stages (Johannsdottir et al. 2008), and investigate the long-term effects on larval development, growth and survival following transformation to juveniles.

Material and methods

The peptide hydrolysate (88% protein) was prepared through enzymatic hydrolysis of pollock fillets. Cod larvae were fed the hydrolysate through addition to the cultures of the live prey (200ppm) 30 minutes before offering to larvae in both daily feedings, three times a week from 2-45dph. The treatment was carried out in quadruple (10.000 larvae tank⁻¹), with four tanks containing larvae of a common origin serving as control. Samples of larvae and juveniles were collected at 3, 10, 17, 31, 46, 55, 80 and 160dph. The presence and distribution of IgM and lysozyme in cryosectioned larvae was studied through immunohistochemistry using specific antibodies and the binding visualized using horseradish peroxidase labeled secondary antibodies. The mean weight and length of pre-juveniles was evaluated at 48 dph and the remaining survivors from each protocol then pooled and transferred to a new incubator (~1.500 post-juveniles tank⁻¹). The long-term effects of peptide treatment were evaluated at ~160dph (September 2010).

Results

Feeding the peptide hydrolysate to cod larvae through encapsulation of the live prey resulted in significantly improved larval development at 28 and 42dph (first experiment: Johannsdottir et al. 2008) as well as at 46, 55 and 160dph (present experiment), with organs and tissues markedly more distinguishable and thicker gut walls in treated as compared to control larvae. Also, the lack of definite organ structures hampered the identification of internal organs and structures in untreated larvae at early developmental stages (< 28dph).

The main results furthermore include:

- ✓ detection of IgM in larvae already at 28dph (14-17mm), mainly in the foregut and the epithelial lining of the digestive tract as well as in the epidermal mucus of the skin. IgM and lysozyme were more widespread and detected in higher intensities in the gut wall of treated as compared to control larvae at this early stage of the development.

- ✓ detection of lysozyme (Fig. 1) and IgM in high intensities in the gut wall and skin mucus of treated larvae at 46dph, while high variability in the intensity and distribution of IgM and lysozyme was observed amongst individuals in the untreated group.

Treatment furthermore resulted in improved survival at 48dph. Further studies include analysis of the long-term effects of treatment on the distribution and intensities of IgM and lysozyme in the gut wall and skin mucus of cod juveniles at ~160dph. Survival, growth and spinal deformities in treated as compared to the control group will furthermore be evaluated at ~160dph.

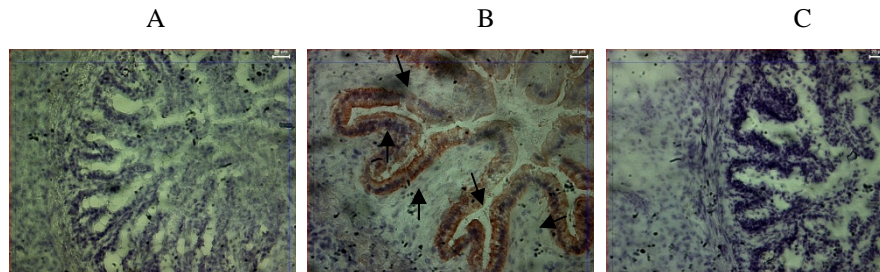


Figure 1: Immunostaining of cryosections of cod juveniles at 46dph using rabbit anti-lysozyme antibodies. The figures show sections of the foregut of control larvae (A) and larvae fed rotifers/Artemia enriched with a pollock peptide hydrolysate (200ppm) (B). Positive response is indicated by reddish colour (arrows). Also shown are negative controls of sections incubated in a solution of assay buffer substituted for the primary antibody solution (C).

References

- Bricknell, I. and R.A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 19(5): 457-472.
- Gómez, G.D. and J.L. Balcázar. 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 52(2): 145-154.
- Johannsdóttir, J., K. Hakonardóttir, L. Hrolfsdóttir, R. Hermannsdóttir, A. Steinarsson, and R. Björnsdóttir. 2008. Detection and stimulation of IgM production in first feeding cod (*Gadus morhua*) larvae. Abstract and poster presentation at Fish Diseases and Immunology, International Conference held in Reykjavik Iceland 6-9th September 2008.
- Magnadóttir, B., S. Gudmundsdóttir, B.K. Gudmundsdóttir, and S. Helgason. 2009. Natural antibodies of cod (*Gadus morhua* L.): Specificity, activity and affinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 154(3): 309-316.
- Nayak, S.K. 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): 2-14.
- Pedersen, G.M., A. Gilberg, and R.L. Olsen. 2004. Effects of including cationic proteins from cod milt in the feed to Atlantic cod (*Gadus morhua*) fry during a challenge trial with *Vibrio anguillarum*. *Aquaculture*, 233(1-4): 31-43.
- Rosenlund, G. and O. Halldorsson. 2007. Cod juvenile production: Research and commercial developments. *Aquaculture*, 268(1-4): 188-194.
- Saurabh, S. and P.K. Sahoo. 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, 39(3): 223-239.
- Steinarsson, A. 2004. Framleiðsla þorskseiða (The production of cod larvae). In: Þorskeldi á Íslandi (Cod farming in Iceland). Björnsson, B. and V.I. Gunnarsson (Eds.). Icelandic Marine Research Institute, Reykjavik. 182 p.
- Yúfera, M. and M.J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268(1-4): 53-63.

Effects of fish protein hydrolysate-enhanced live prey on cod (*Gadus morhua* L.) larval development

Protein expression and stimulation of selected innate immune parameters

Hugrún Lísa Heimisdóttir

Supervisors: Oddur Vilhelmsson, Ph.D., University of Akureyri; Hólmfríður Sveinsdóttir, Ph.D., Matís ohf; Jónína Þ. Jóhannsdóttir, M.Sc., Matís ohf.



University of Akureyri
School of Business and Science
Faculty of Natural Resource Sciences
May 2012

Abstract

Poor survival and quality during early developmental stages of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) is the main bottleneck in cod aquaculture and has been one of the main obstacles for further development within the industry. The immune system of Atlantic cod larvae is not fully developed at hatch and the larvae therefore have to rely on innate immune parameters during the first month following hatching.

Live prey enhancement using fish protein hydrolysates has been found to benefit normal development and growth and stimulate key parameters of the innate immune system of cod larvae. The overall aim of the study was to investigate an approach for the stimulation of the innate immune response of larvae of wild-caught as compared with cultured origin, through live prey enhancement using a pollock (*Pollachius virens*) protein hydrolysate. The aim was further to compare different analytical approaches, proteomics and immunohistochemistry, with the overall aim to develop reliable methodologies for analysing the effects of various treatments of cod larvae. The study also included the introduction of methods for proteome analysis at the University of Akureyri for analysis of protein expression in early cod larvae.

The results indicate that proteomics may be an expedient approach for analysing the effects of a pollock protein hydrolysate enhanced (PHE) live prey in cod larvae. The results indicate that PHE live prey may stimulate the expression of proteins involved in larval growth and development, with most of the differentially expressed proteins identified related to larval development and growth. There were indications that PHE live prey stimulated the production and distribution of selected parameters of the innate immune system of larvae in treated as compared with untreated larvae. Treated larvae displayed a more prominent and even response of both IgM and lysozyme and the immunohistochemical studies indicated improved development of the digestive tract in treated as compared with untreated larvae. Also, the results indicate a more uniform quality amongst larvae when using fish protein hydrolysate enhancement of the live prey.

Keywords: Atlantic cod larvae, protein hydrolysate, proteomics, immunohistochemistry, IgM, lysozyme

Útdráttur

Þorskeldi er vaxandi atvinnugrein á Íslandi en hefur þó ekki gengið sem skyldi, meðal annars vegna mikilla affalla og slakra gæða lirfa og seiða á fyrstu stigum eldisins. Ónæmiskerfi þorsklirfa er lítið þroskað við klak og þurfa lirlfur því að reiða sig eingöngu á ósérhæfða ónæmissvörun fyrstu mánuðina, eða þar til sérhæfða ónæmiskerfið hefur náð fullum þroska. Fyrri rannsóknir gefa vísbendingar um að auðgun fæðudýra með fiskpeptíðum hafi jákvæð áhrif á vöxt og þroska þorsklirfa ásamt því að örva lykilmætti í ósérhæfðu ónæmissvari þeirra. Megin markmið verkefnisins var því að leita leiða til að efla ósérhæft ónæmissvar lirfa sem og að þróa áreiðanlegar aðferðir til að meta hvort auka megi gæði lirfa við mismunandi fóðrun. Markmið verkefnisins var einnig það að greina hvort auðgun fæðudýra með fiskpeptíðum hefði mismunandi áhrif á lirlfur af villtum samanborið við eldisuppruna og þá í hverju sá munur mögulega fælist. Markmið verkefnisins var enn fremur að setja upp aðferðir próteinmengjagreiningar við Háskólann á Akureyri og aðlaga til greiningar á tjáningu próteina í meltingarvegi þorsklirfa á fyrstu þroskaferlum.

Niðurstöður verkefnisins benda til þess að aðferðir próteinmengjagreiningar geti verið hentug leið til að kanna áhrif meðhöndlunar á próteinframleiðslu í meltingarvegi þorsklirfa. Niðurstöður gefa jafnframt vísbendingar um að auðgun fæðudýra með fiskpeptíðum stuðli að sterkbyggðari vefjalögum og hafi þannig jákvæð áhrif á þroskun þorsklirfa. Niðurstöður próteinmengjagreiningar sýndu að flest þau prótein sem greind voru tengjast einmitt þroska og vexti lirlfanna og gefur það til kynna hraðari þroska og vöxt meðhöndlaðra samanborið við ómeðhöndlaðra lirfa. Niðurstöður ónæmisvefjalitunar benda til þess að auðgun fæðudýra með ufsapeptíðum leiði til hraðari þroska og bættra gæða lirfa og geti þannig haft jákvæð áhrif á fyrstu stigum eldisins. IgM og lýsósím greindust í öllum meðhöndluðum lirlfum og var svörunin mun sterkari og jafnari í meltingarvegi og á yfirborði meðhöndlaðra samanborið við ómeðhöndlaðra lirfa. Niðurstöður benda einnig til þess að einstaklingsmun megi hugsanlega jafna út við auðgun fæðudýra með fiskpeptíðum.

Lykilorð: Þorsklirlfur, fiskpeptíð, próteinmengjagreining, ónæmisvefjalitun, IgM, lýsósím

7.6. Bókarkafli

Sveinsdóttir, H., Vilhelmsson, O., Novel methodologies to assess metabolic changes of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae in response to environmental factors. Í Jenkins (ritstj.), Advances in Zoology Research, Vol. 2 Nova Science Publishers, 2012, 227-243 (ISBN: 978-1-62100-641-1).

Novel methodologies to assess metabolic changes of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae in response to environmental factors.

Hólmfríður Sveinsdóttir¹, Oddur T. Vilhelmsson²

¹Division of Biotechnology and Biomolecules, Mátís ohf, Icelandic Food and Biotech R&D, Saudárkrókur, Iceland

²Department of Natural Resource Sciences, University of Akureyri, Iceland

*Corresponding author:

Hólmfríður Sveinsdóttir

Division of Biotechnology and Biomolecules

Mátís ohf, Icelandic Food and Biotech R&D

Saudárkrókur

IS-550

Iceland

Tel. +354 422 5064

Email: holmfridur.sveinsdottir@matis.is

Abstract

High mortality and low growth rate during the early larval stages is still a major obstacle in intensive production of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. Numerous genetic and environmental factors affect the health and survival of marine fish larvae. Protein hydrolysates, probiotic bacteria and various other environmental factors have been shown to improve the health and survival of fish larvae. As an example, stimulation of genes and increased distribution of key parameters of the unspecific immune system have been observed as a result of live feed enrichment. However, the beneficial effects of treatments on fish larvae are poorly understood at the molecular level. Proteomics is defined as “the study of the entire proteome or a subset thereof” where the proteome is the expressed protein complement of the genome. Unlike the genome, the proteome varies among tissues, as well as with time, reflecting the organism’s environment and its adaptation thereto. Therefore, proteome analysis may be used to identify a wide range of molecules and biochemical pathways involved in the responses of fish to environmental factors including food. This chapter reviews novel methodologies to assess metabolic changes of cod larvae in response to environmental and some examples of their present use, as well as potential future applications in the study of cod larvae.