

Norsk patentsøknad nr.

NORWAY

P17345NO00

Søker: INAKVA AS
Strondavegen 2203
5593 SKÅNEVIK

Fullmektig: ACAPO AS
Strandgaten 198
5004 Bergen

Oppfinner: Elisabeth Gunleiksrud
Strondavegen 2203
5593 Skånevik

Tittel: Sammensetning for hindring av parasitter på fisk

Oppfinnelsens område

- 5 Den foreliggende oppfinnelse vedrører en sammensetning for å hindre eller behandle angrep eller infeksjon av parasitter på fisk.

Oppfinnelsens bakgrunn

- 10 Oppdrettsnæringen i Norge har forankret seg som en av landets viktigste industrier og eksportvare. I over 40 år har Norge foredlet frem kvalitetsmessig god matfisk og er i dag verdens største lakseprodusent. Norsk laks er selve varemerket man forbinder med norske fjorder, rent vann og høy matkvalitet. Norge eksporterer laks til over 100 land i verden. Bransjen er allikevel under et stort press for å produsere mye fisk, samtidig som man er
- 15 sårbar for infeksjoner og parasittære angrep.

- En av de største utfordringene til oppdrettsbransjen er lakselus. Lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) er et lite parasittisk krepsdyr med evne til å penetrere slimlaget hos laksen. Den spiser hud, slim og blod hos laksen, og skaper sår i fisken. Dette utsetter laksen for andre
- 20 bakterielle og virale infeksjoner som kan gi sykdom og død.

- Mange ulike behandlingsmetoder er i bruk, eller er under utprøving for å begrense smittetrykket. Mange av de kjente metodene har uheldige miljømessige konsekvenser, og er også belastende for fiskevelferden. Flere av dagens behandlingsmetoder har økende
- 25 problemer med resistensutvikling hos lakselus. Flere av behandlingene retter seg også bare mot enkelte av lakselusens stadier. Det er dermed behov for nye behandlingsformer til å erstatte og komplementere nåværende behandlingsmetoder.

- Livssyklusen til lakselus har 10 ulike stadier hvor de bytter skall mellom hvert stadium. I den
- 30 tidlige fasen (naupli stadiet) lever lus fritt i vannmassene og kan spre seg over store områder. Lakselusen vokser så og kommer over i stadiet der den går fra å være frittlevende i vannmassene til å feste seg på en vert (copepoditt 1 og 2). Etter dette begynner lakselusen og ta næring fra fisken i de fire stadiene som kalles Chalimus 1-4. Lakselusen går deretter over til den «bevegelige fasen» hvor den lever fritt på fisken, dette kalles preadult stadiet.
- 35 Det siste stadiet er adult. En voksen kjønnsmoden hunn kan produsere opptil 11 par egg

strenger som hver inneholder hundrevis av egg etter befruktning. Den totale livssyklusen til lakselus kan gå så fort som 21 dager ved ca. 14 grader celsius.

Eksempler på kjente behandlingsmetoder mot lakselus er Thermolicer og Optilicer der det benyttes varmt vann, og Hydrolicer og Skamik som benytter spyling og trykk. Det er også kjent ulike badebehandlinger der det benyttes ferskvann, hydrogenperoksid, Salsoman vet (Azamethiphos), Alphamax (Deltametrin) og Betamax (Cypermeterin), og funksjonelle fôr som Slice vet (Emamectinbenzoat) og Releeze vet (Diflubenzuron).

Formål med foreliggende oppfinnelse.

10

Det er således et formål med oppfinnelsen å frembringe ny aktive midler for bekjempelse av parasitter på fisk, så som lakselus.

15

Det er videre et formål at slik nye aktive midler kan benyttes i behandlingsmetoder så som badebehandling der fisken oppholder seg i en væske med aktivt middel i en viss tid, tilstrekkelig til at parasittene inaktiveres eller drepes.

20

Det er også et formål at de aktive midler kan administreres til parasittene eller fisken på annen måte enn ved badebehandling, og det er derfor et formål med oppfinnelsen å frembringe fôrsammensetninger som inneholder aktive midler som hindrer at parasitter fester seg til og infiserer fisken.

Oppsummering av oppfinnelsen

25

Den foreliggende oppfinnelse vedrører i et første aspekt en sammensetning for anvendelse i hindring eller behandling av angrep eller infeksjon av parasitter på fisk, karakterisert ved at sammensetningen omfatter ett eller flere capsaicinoid, eller analoger eller salter derav.

30

I en utførelse er nevnte ett eller flere capsaicinoider valg blant gruppen som består av capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin, homodihydrocapsaicin og nonivamide.

35

I en utførelse er sammensetningen en vandig sammensetning, og at nevnte capsaicinoid er oppløst i en vandig væske.

I en utførelse omfatter den vandige sammensetningen en syre, og at pH av den vandige sammensetningen er under 5, mer foretrukket under 4,5, mer foretrukket under 4, mer foretrukket under 3,5 og mer foretrukket under 3, og mest foretrukket ca. 2,8.

5 I en utførelse er nevnte syre eddiksyre.

I en utførelse omfatter den vandige sammensetning eddiksyre og at pH er under 3, fortrinnsvis ca. 2,8.

10 I en utførelse er nevnte capsaicinoid et capsaicin.

I en utførelse fremstilles sammensetningen fra planteslekten *Capsicum*.

I en utførelse er nevnte *Capsicum* er en chilipepper, fortrinnsvis Cayenne.

15

I en utførelse omfatter sammensetningen et vannløselig middel som øker vannløseligheten av nevnte capsaicinoid.

20 I en utførelse har nevnte capsaicinoid har en konsentrasjon i nevnte sammensetning på 0,01 – 5 %, mer foretrukket 0,01- 1%, mer foretrukket 0,01 – 0,1 %.

I en utførelse inneholder nevnte sammensetning capsaicinoid fra 10-100 gram *Capsicum* per liter væske, mer foretrukket 30-70 gram *Capsicum* per liter væske, og mest foretrukket ca. 50 gram *Capsicum* per liter væske.

25

I en utførelse er nevnte parasitter ektoparasitter.

I en utførelse er nevnte parasitt en Caligidae.

30 I en utførelse er nevnte Caligidae valgt fra gruppen som består av Pseudocaligus, Caligus og Lepeophtheirus.

I en utførelse er nevnte Caligidae lakselusen Lepeophtheirus salmonis.

35 I en utførelse er nevnte fisk en laksefisk (Salmonidae).

I en utførelse er nevnte laksefiske valgt blant atlantisk laks, sølvlaks, ørret og røye.

5 I en utførelse anvendes sammensetningen i en badevæske for badebehandling av nevnte fisk.

10 I en utførelse kan fiskens oppholdstid i badevæsken reguleres, og at oppholdstiden fortrinnsvis er fra 1-3600 sekunder, mer foretrukket fra 5-1800 sekunder, mer foretrukket fra 5-180 sekunder, mer foretrukket fra 10-120 sekunder, mer foretrukket fra 10-60 sekunder, mer foretrukket fra 10-30 sekunder.

I en utførelse administreres sammensetningen til nevnte fisk oralt.

15 I en utførelse er sammensetningen et fiskefôr som omfatter konvensjonelle fôringredienser så som protein, fett, karbohydrater, vitaminer, og at det omfatter en mengde av ett eller flere capsaicinoid.

20 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**

Vi har funnet at capsaicinoid effektivt bekjemper lakselus og således kan benyttes for å inaktivere parasitter, og for å hindre at parasitter angriper og fester seg til fisk, så som laks.

25 Vi kjenner ikke de biologiske virkningsmekanismer, men det antas at reseptorer som interagerer med capsaicinoid-forbindelser spiller en rolle, og det forventes derfor at alle parasitter som har slike reseptorer vil bli påvirket.

30 Forsøkene som beskrives nedenfor er utført på lakselus som et eksempel på parasitt, men foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til lakselus idet metoden også vil være effektiv mot andre parasitter.

35 Videre vil de første forsøk på fisk bli utført på laks, men oppfinnelsen er ikke begrenset til laks, idet det forventes at alle fisk som angripes av parasitter som er sensitive for capsaicinoid vil oppleve en effekt av metoden.

Videre har de første aktive midler mot parasitter blitt testet ut ved å såkalt badebehandling, dvs. at parasittene og fisken oppholder seg en gitt tid i et vannmiljø der de aktive midler er tilsatt.

5

Det forventes imidlertid at det aktive middel har en generell effekt på parasittene, og andre måter å administrere aktivt middel til parasittene er derfor mulig. Vi er kjent med at mange andre kjemiske aktive midler også indirekte kan administreres til parasittene, for eksempel ved at aktivt middel administreres til verten eksempelvis via føret eller ved injeksjon.

10

Effekten av det aktive middel ifølge oppfinnelsen vil nedenfor bli dokumentert ved en beskrivelse av de forsøk og resultater som er oppnådd.

Eksempel 1

15 Fremstilling av sammensetning inneholdende aktivt middel

De første innledende forsøk har blitt utført direkte på lakselus ved at væsken som lusene befinner seg i tilføres aktivt middel.

20 Det aktive middel er et capsaicinoid, og det fremstilles en væske inneholdende slike capsaicinoider. Capsaicinoider finnes i planter av slekten *Capsicum*, så som Cayenne.

500g chili av typen Cayenne (Scoville skala 30000-50000') vaskes i rent vann for å skylle vekk eventuelle bakterier eller forurensinger som kan følge fra chiliproduksjonen. Andre

25 typer chili med annet innhold av capsaicinoider så som capsaicin kan benyttes, men man må da korrigere for mengde capsaicinoid i løsning.

500 g Cayenne chili med stilk hakkes opp til en myk masse ved bruk av maskinelt utstyr.

1 liter rent vann tilsettes chilimassen. Blandingen varmes opp til kokepunkt, og fjernes så fra varmen. Prosedyren er nødvendig for å frigjøre mest mulig capsaicin, samt sikre
30 konservering ved å drepe bakterier som ikke ble fjernet i den første vaskeprosedyren.

Capsaicin er lite løselig i vann, og 1 liter eddiksyre 35% blandes i den varme chilimassen, og det røres godt. Andre konsentrasjoner av eddiksyre kan selvsagt benyttes. Tilslutt tilsetter

man ytterligere 8 liter vann. Total mengde væske er da 10 liter + massen av den organiske blandingen.

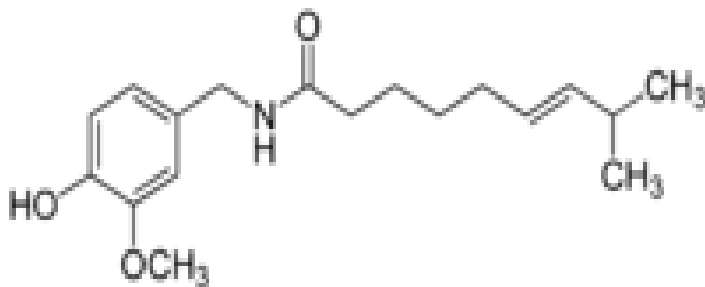
Blandingen skal så stå kjølig, på lufttette dunker, optimalt rundt 4 grader i 10-14 dager.

- 5 I løpet av de 14 dagene omrøres blandingen 4 ganger. Etter 14 dager filtreres den organiske chilimassen bort. Væsken tappes over til rene dunker. Resultatet er 10 liter væske som inneholder capsaicinoid i løsning, benevne «behandlingsvæske». pH i løsningen er 2,8, og løsningen har en mørk oransje farge og en stikkende lukt.

- 10 Holderbarhet til væske med capsaicin er svært god da både capsaicin og eddiksyre er naturlige konserveringsmiddel. Ved oppbevaring mellom 2-4 grader celsius antas denne å være flere år.

Det mest vanlige capsaicinoid er capsaicin som har følgende formel;

15



- 20 Ren capsaicin er et farge- og luktløst stoff med voksaktig til krystallinsk konsistens. Det er svært hydrofob, men løselig i etanol og andre hydrofobe løsemidler. Smeltepunktet er 57-66 grader celsius.

- 25 Capsaicin er molekylet som finnes i chili planter og som forårsaker den brennende varmen/smerten man opplever når man inntar chili eller får dette på hud, øyne eller slimhinner. Capsaicin binder til bestemte reseptorer, kalt TRPV1 reseptorene som er en type smertereseptor som registrerer varme. Hos mennesker vil capsaicin kunne utløse sterke, men ikke veldig alvorlige reaksjoner når man kommer i kontakt med en viss konsentrasjon. Man har lenge trodd at fisk ikke hadde disse reseptorene i det hele tatt, men nyere studier har vist at disse også finnes hos fisk, men man er usikker på hvilken betydning de har.

I chili bedømmes styrken på chili ut fra scoville skala som er direkte korrelert til mengden capsaicin i chilifrukten. Innholdet av capsaicin kan bestemmes med HPLC (High-performance liquid chromatography).

- 5 Cayenne (som vi har nyttet til utvikling av sammensetningen ifølge oppfinnelsen ligger mellom 30 000 – 50 000 på Scovilleskalaen. Rent Capsaicinpulver har 16 000 000, som er maksverdi)

- 10 Capsaicin er som nevnt sterkt hydrofobt, det vil si at det ikke løser seg lett i vann. Det er derfor avhengig av en oppløsningsvæske for å bli hydrofilt. Vi har som angitt over benyttet eddiksyre.

Capsaicin har en effekt på parasitter alene, og denne effekten forsterkes når man tilsetter eddiksyre til blandingen.

15

Eddiksyren kan ha flere funksjoner, som vi holder på å avklare med forsøk. Eddiksyre kan ha en konserverende effekt på behandlingsvæsken. Videre reduserer eddiksyren pH i løsningen, og den vandige sammensetning som er fremstilt over har en pH på 2,8. Eddiksyre er også en irritant som kan bidra til effekten på lakselus.

20

Eksempel 2

Badebehandling av parasitter med væske inneholdende capsaicinoid og eddiksyre

Det er utført en rekke forsøk på lakselus (*Lepeophtheirus salmonis*) i følgende

- 25 utviklingsstadier: små bevegelige, store bevegelige og kjønnsmodne lakselus.

Målet med forsøkene var å finne ut hvilken konsentrasjon med capsaicinoid som var hensiktsmessig for å få en rask effekt på lakselus sin evne til å suge fast på beholderveggen, samt tid før lakselusen døde.

- 30 Rene hvite beholdere ble fylt med sjøvann 0,5 liter (pH 8,9) og temperatur 16,6 grader celsius. I hver beholder ble det plassert 5-8 levende lakselus i ulike utviklingsstadier.

Før tilsetning av sammensetningen som angitt i eksempel 1 i ulike konsentrasjoner ble det gjort lett omrøring i vannet slik at væsken skulle blande seg raskt i beholderen.

35

Hvor mye væske med aktivt middel som tilsettes til sjøvannet er angitt i tabell 1 nedenfor.

Tabell 1. Resultat for ulike konsentrasjoner behandlingsmiddel og letalitet hos lakselus.

Konsentrasjon	pH *	Temperatur	Tid til reaksjon	Tid til død alle stadier	Kommentar
10 ml behandlingsvæske per liter sjøvann	4,48	16,7	Umiddelbart	Ca. 5 minutt	Store bevegelige død etter 3 min.
15 ml behandlingsvæske per liter sjøvann	4,12	16,6	Umiddelbart	Ca. 4 minutt	
20 ml behandlingsvæske per liter sjøvann	3,99	16,6	Umiddelbart	1 min og 20 sek	

5 *pH i behandlings bad (blandingen av væsken med aktiv ingrediens og sjøvann)

Eksempel 2

Reaksjonsmønster og letalitet hos lakselus

- 10 I dette forsøket tok vi hensyn til fiskevelferd. Det er gjort mange studier på laks og dens evne til å tåle pH forandring, men de fleste studier er knyttet til både lav pH og økt aluminiums nivå over tid. Det er kjent at pH ned til 4,0 er akseptabelt for laks over lengre tid, men at pH under 4,0 vil kunne øke stressnivået hos laks under behandling. Vi ønsket derfor å ha fokus på konsentrasjonsverdier av behandlingsvæske som er så effektiv som mulig uten å påvirke
- 15 fiskevelferden.

Tabell 2 Resultat av reaksjonsmønster og letalitet hos lakselus ved tilsetning av 20 ml behandlingsvæske per liter sjøvann

Forsøksnummer	pH	Tid til reaksjon	Slipptid*
1	4,14	Umiddelbar	30 sek
2	4,08	Umiddelbar	24 sek
3	4,0	Umiddelbar	14 sek
4	4,02	Umiddelbar	14 sek
5	3,98	Umiddelbar	12 sek
6	4,12	Umiddelbar	35 sek
7	4,01	Umiddelbar	14 sek
8	3,98	Umiddelbar	17 sek
9	4,02	Umiddelbar	14 sek
10	4,0	Umiddelbar	15 sek

*Tiden det tar fra tilsatt behandlingsvæske til lakselusene begynner å slippe seg løs fra beholderveggen.

5

I gjentatte forsøk med 20 ml behandlingsvæske per liter sjøvann ser vi at en gjennomsnittlig tid fra tilsatt behandlingsvæske til lakselusen reagerer på situasjonen er umiddelbar. Det observeres rykninger og kontraksjoner hos lakselusen. Etter en gjennomsnittstid på 18 sekunder forsøker lakselusen å flykte fra miljøet. Den slipper tak i beholderveggen og forsøker å svømme bort. Kort tid etter (sekunder) snur den seg over på ryggen og faller mot bunn av beholderen. Den kan ha gjentatte forsøk på å svømme bort. Alternativt løsner den bare fra beholderveggen og siger ned til bunn. Majoriteten av lakselus var døde etter 1 minutt og 20 sekund.

10

15

I forsøkene var det en trend at store kjønnsmodne lakselus døde først, etterfulgt av store bevegelige og tilslutt små bevegelige.

Capsaicin

20

Det er lite beskrevet i litteraturen om capsaicin i marint miljø. Det er tidligere beskrevet capsaicin brukt i bunnsnøremiddel til båter og andre nedsenkbare overflater. Capsaicin blir beskrevet som en naturlig, ikke giftig ingrediens. Det er et stabilt alkaloid, og organisk. Utfordringen er capsaicinets dårlige vannløselighet. Det påstås at å bruke capsaicin som aktiv ingrediens i bunnsnøring på skip medfører relativ liten fare for marint

miljø ¹²⁾. Capsaicin er biologisk nedbrytbart på land. Det brytes ned av bakterier, og halvparten vil være nedbrutt i løpet av to til åtte dager. Det er liten fare for lekkasje til grunnvann. Det fordamper ikke. Sterk lukt og smak vil gjøre at dyr holder seg unna.

- 5 Capsaicin absorberes ikke gjennom hud, men magesekk. Brytes ned i lever. Det finnes ikke informasjon om påvirkning ved graviditet eller overgang til morsmelk. Capsaicin kan påvirke motstanden i luftveiene. Derfor kan man anta at personer med obstruktive lungesykdommer kan være sensitive for capsaicin. Capsaicin kan være irriterende for hud og slimhinner.

10 Eddik syre

Forsuring av havet er et verdensomspennende problem. Utslipp av CO₂ bidrar til 30 % av forsuringen. I fjordene er miljøet dynamisk og forandrer seg etter vannets temperatur og strømninger. Eddiksyre i store konsentrasjoner vil være uheldig for det marine miljøet.

- 15 Behandlingsvæsken vil ha en konsentrasjon av eddiksyre på 3,5 % noe som er lavere enn vanlig husholdningseddik. Videre vil fisken etter behandling i badevæsken overføres til merd med sjøvann, og behandlingsvæsken trenger ikke gå til utslipp i sjø.

Analoger

20

Den biologiske virkningsmekanismen til de aktive forbindelser ifølge oppfinnelsen er ikke kjent, men det er som antydnet ovenfor mulig at de virker via en reseptorfamilie benevnt vanilloide reseptorer, subtype 1 (TRPV1). Alle capsaicinoid-forbindelser som virker via denne reseptorfamilie tenkes således også å være aktive for å inaktivere eller drepe

25 parasitter.

- I foretrukne utførelser av oppfinnelsen vil slike capsaicinoid-forbindelser være fremstilt fra planter som inneholder slike forbindelser, som Cayenne-pepper. I andre utførelser vil capsaicinoid-forbindelsene være fremstilt syntetisk, eller de kan være fremstilt med
- 30 bakteriologiske prosesser. Videre er også analoger av capsaicinoid-forbindelsene en del av oppfinnelsen. Slike analoger har samme grunnstruktur som capsaicinoid, men har ulike substituentter på ikke-essensielle steder i molekylet.

Oppfinnelsen dekker også ulike saltformer av capsaicinoid-forbindelsene.

35

Patentkrav

1. Sammensetning for anvendelse i hindring eller behandling av angrep eller infeksjon av parasitter på fisk, karakterisert ved at sammensetningen omfatter ett eller flere capsaicinoid, eller analoger eller salter derav.
2. Sammensetning for anvendelse i samsvar med krav 1, karakterisert ved at ett eller flere capsaicinoider er valg blant gruppen som består av capsaicin, dihydrocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homocapsaicin, homodihydrocapsaicin og nonivamide.
3. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at sammensetningen er en vandig sammensetning, og at nevnte capsaicinoid er oppløst i en vandig væske.
4. Sammensetning i samsvar med krav 3, karakterisert ved at den vandige sammensetningen omfatter en syre, og at pH av den vandige sammensetningen er under 5, mer foretrukket under 4,5, mer foretrukket under 4, mer foretrukket under 3,5 og mer foretrukket under 3, og mest foretrukket ca. 2,8.
5. Sammensetning i samsvar med krav 4, karakterisert ved at nevnte syre er eddiksyre.
6. Sammensetning i samsvar med krav 5, karakterisert ved at den vandige sammensetning omfatter eddiksyre og at pH er under 3, fortrinnsvis ca. 2,8.
7. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at nevnte capsaicinoid er capsaicin.
8. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at nevnte capsaicinoid tilveiebringes fra planteslekten *Capsicum*.
9. Sammensetning i samsvar med krav 7, karakterisert ved at nevnte *Capsicum* er en chilipepper, fortrinnsvis Cayenne.
10. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at sammensetningen omfatter et vannløselig middel som øker vannløseligheten av nevnte capsaicinoid.
11. Sammensetning i samsvar med krav 3, karakterisert ved at nevnte capsaicinoid har en konsentrasjon i nevnte sammensetning på fra 0,01 – 5 %, mer foretrukket 0,01-1%, mer foretrukket 0,01 – 0,1 %.
12. Sammensetning i samsvar med krav 11, karakterisert ved at nevnte sammensetning inneholder capsaicinoid fra 10-100 gram *Capsicum* per liter væske, mer foretrukket 30-70 gram *Capsicum* per liter væske, og mest foretrukket ca. 50 gram *Capsicum* per liter væske.
13. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at nevnte parasitter er ektoparasitter.

14. Sammensetning i samsvar med krav 13, karakterisert ved at nevnte parasitt er en Caligidae.
15. Sammensetning i samsvar med krav 14, karakterisert ved at nevnte Caligidae er valgt fra gruppen som består av Pseudocaligus, Caligus og Lepeophtheirus.
- 5 16. Sammensetning i samsvar med krav 15, karakterisert ved at nevnte Caligidae er lakselusen Lepeophtheirus salmonis.
17. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at nevnte fisk er en laksefisk (Salmonidae).
- 10 18. Sammensetning i samsvar med krav 17, karakterisert ved at nevnte laksefiske er valgt blant atlantisk laks, sølv laks, ørret og røye.
19. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at sammensetningen anvendes i en badevæske for badebehandling av nevnte fisk.
- 15 20. Sammensetning i samsvar med krav 19, karakterisert ved at fiskens oppholdstid i badevæsken kan reguleres, og at oppholdstiden fortrinnsvis er fra 1-3600 sekunder, mer foretrukket fra 5-1800 sekunder, mer foretrukket fra 5-180 sekunder, mer foretrukket fra 10-120 sekunder, mer foretrukket fra 10-60 sekunder, mer foretrukket fra 10-30 sekunder.
21. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at sammensetningen administreres til nevnte fisk oralt.
- 20 22. Sammensetning i samsvar med krav 1, karakterisert ved at sammensetningen er et fiskefôr som omfatter konvensjonelle fôringredienser så som protein, fett, karbohydrater, vitaminer, og at det omfatter en mengde av ett eller flere capsaicinoid.

Sammendrag

Det beskrives ulike sammensetninger med aktivt middel for å inaktivere eller drepe parasitter som angriper fisk.