

Samspill mellom næringsstoff og betydning for laksens helse og kvalitet

«ERN-SAMSPILL FHF901656»

Faglig sluttrapport



Nofima er et ledende matforskningsinstitutt som driver med forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien. Vi leverer internasjonal anerkjent forskning og løsninger som gir næringslivet konkurransefortrinn langs hele verdikjeden.

«Bærekraftig mat til alle» er vår visjon.

Kontaktinformasjon

Telefon: 77 62 90 00

post@nofima.no

www.nofima.no

NO 989 278 835 MVA



Hovedkontor Tromsø

Muninbakken 9–13

Postboks 6122

NO-9291 Tromsø



Stavanger

Måltidets hus

Richard Johnsensgate 4

Postboks 8034

NO-4068 Stavanger



Sunndalsøra

Sjølsengvegen 22

NO-6600 Sunndalsøra



Ås

Osloveien 1

Postboks 210

NO-1433 ÅS



Bergen

Kjerreidviken 16

Postboks 1425 Oasen

NO-5844 Bergen

Rapport

Rapportnummer: 20/2025	ISBN: 978-82-8296-838-6	ISSN: 1890-579X
Dato: 01.05.2025	Antall sider + sider vedlegg: 177 + 3 vitenskapelige publikasjoner	Prosjektnummer: 13285 / FHF 901656
Tittel: Samspill mellom næringsstoff og betydning for laksens helse og kvalitet «ERN-SAMSPILL»		
Title: Nutrient Interactions and Their Significance for Salmon Health and Quality		
Forfatter(e): Bente Ruyter, Nini Sissener, Elisabeth Ytteborg, Marta Mira Bou, Lene Sveen, Esmail Lutfi, Aleksei, Krasnov, Øystein Sæle, Gerd Berge, Tone Kari Østby, Thomas Larsson, Trygve Sigholt, Ingunn Stubhaug, Øystein Evensen, Antony Philip, Haohang Fang, Grethe Rosenlund, Bjørg Kristine Hundal, Tore Seternes, Kristina Maria Solvang og Gerit Timmerhaus		
Avdeling: Ernæring og førteknologi		
Oppdragsgiver: FHF		
Eksternt prosjektnummer/Oppdragsgivers ref.: FHF prosjektnummer 901656		
Stikkord: Omega-3 fettsyrer, fettnivå, sink, samspill næringsstoff		
Sammendrag/anbefalinger: Forsøk med atlantisk laks avdekket viktige sammenhenger mellom førsammensetning og fiskehelse. Langtidsforsøk i sjømerder viste at lavt sinknivå i føret reduserte sinkkonsentrasjoner i fisken og påvirket mRNA-uttrykk knyttet til sinkopptak. Redusert fettinnhold økte sink- og selen-nivåer i ulike vev, mens høyere EPA og DHA-nivåer (11%) forbedret vekst, helse og filetkvalitet. To strategier for økt sinkretensjon ble identifisert: redusert fettinnhold og økt EPA og DHA i føret. Korttidsstudier avslørte at DHA fremmet sinkopptak i tarmceller, spesielt ved lavere temperaturer. Hos lakseparr akselererte kombinasjonen av høyt sink- og omega-3-nivå skjellutvikling, økte bentetthet og forbedret sårheling. Cellekulturforsøk bekreftet at sink og DHA sammen økte keratocyttenes migreringspotensiale. Disse funnene understreker viktigheten av en balansert førsammensetning for optimal fiskehelse og velferd. Forsøk med post smolt i kar på land viste at 10 % mettede fettsyrer i føret er utilstrekkelig for optimal vekst og filetkvalitet hos atlantisk laks. Vi har sammenlignet tilvekst og stressrespons hos atlantisk laks (100–440 g) i resirkuleringssystem (RAS) og gjennomstrømningsanlegg (FT). Fisk i RAS hadde lavere tilvekst, økt stress (høyere kortisol og eikosanoider) og endret fosfolipidmetabolisme sammenlignet med FT. EPA-tilskudd reduserte stressmarkører i begge systemer, men RAS-fisk viste svekket barrierefunksjon i tarm og skinn. Resultatene understreker behovet for optimalisering av både før og systembetingelser for å minimere negative effekter i RAS.		

English summary/recommendation:

Our research has uncovered critical links between feed composition and fish health in Atlantic salmon, highlighting the impact of specific nutrients on growth, mineral retention, and overall quality. Low zinc (Zn) levels in feed were found to reduce tissue Zn concentrations, while reduced fat content increased Zn and selenium levels. Higher EPA and DHA levels (11%) significantly enhanced growth performance and fillet quality, with two effective strategies for improving Zn retention identified: reducing fat content and increasing EPA+DHA. Short-term studies revealed that DHA and oleic acid promote Zn uptake in intestinal cells, while high Zn combined with omega-3 accelerated scale regeneration and wound healing in salmon parr. Additionally, low saturated fatty acid (SFA) content inhibited growth and compromised fillet quality. In recirculating aquaculture systems (RAS), fish exhibited lower growth and higher stress markers compared to flow-through systems, though EPA supplementation reduced stress indicators in both environments. These findings emphasize the importance of precisely balanced feed formulations to optimize fish health, resilience, and production efficiency in aquaculture systems.

Forord

Prosjektet er et resultat av en utlysning fra Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond, FHF, i 2020: På tross av tilgjengelig kunnskap om ernæringsbehov for de viktigste næringsstoffene isolert sett, har vi manglende forståelse av betydningen av samspillseffekter mellom ulike næringsstoff i fôret for laksens helse. Målet med FHF utlysningen og prosjektet var å tette dette kunnskapshullet slik at næringen kan forbedre fôrresepter for å styrke tilvekst, fiskehelse og muskelkvalitet. Problemstillingen er forankret i FHF's prioritering om å fremskaffe kunnskap om hvordan fett, fettsyrer, kolesterol og mineraler i fôret påvirker fiskens helse og robusthet.

Innhold

1	Sammendrag	1
1.1	AP 3. Sammendrag, langtidsforsøk merder i sjø	1
1.2	AP 1. Sammendrag, korttids fordøyelighetsforsøk med Zn og in vitro forsøk med tarmceller	1
1.3	AP 1. Sammendrag Samspill Zn og omega-3 fettsyrer i fôr til parr og <i>in vitro</i> sårhelingsmodell	1
1.4	AP 2 Sammendrag mettet fett	2
1.5	AP 1 sammendrag RAS og gjennomstrømming – effekt av system og ulike nivå EPA i fôr	2
2	Innledning	3
2.1	Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt	3
2.2	Prosjektets omfang	3
2.3	Prosjektorganisering (roller/ansvar: prosjektgruppe, referansegruppe)	4
2.3.1	Referansegruppe	4
2.3.2	Prosjektgruppe	4
2.3.3	Samarbeidspartners kompetanse og roller	4
3	Problemstilling og formål	6
4	Prosjektgjennomføring	7
4.1	Oversikt over arbeidspakker	7
4.1.1	AP 1. Samspill mellom omega-3 fettsyrer og Zn	7
4.1.2	AP 2. Mettet fett og samspill med kolesterol	7
4.1.3	AP 3. Laks i merder i sjø og samspill mellom fett, fettsyrer og Zn og effekter på helse, ytelse og kvalitet.	7
5	Forsøksbeskrivelse, resultater, diskusjon og hovedfunn	8
5.1	AP 1.3. Lakseparr som modell for studier av samspill Zn og omega-3 i ferskvann	8
5.1.1	Forsøksdesign	8
5.1.2	Metodikk	11
5.1.3	Resultat og diskusjon A1.3. Vekst, ytelse, kroppssammensetning, skinnhelse og barrierefunksjon	13
5.1.4	Resultat og diskusjon sårhelingsforsøk	29
5.1.5	Oppsummering av hovedfunn AP 1.3, samspill Zn og omega-3 fettsyrer	31
5.2	A1. 2 Resultat og diskusjon <i>in vitro</i> sårhelingsmodell	34
5.2.1	Hovedfunn skinnhelse og sårheling A1.3 og A1.2	37
5.3	AP A3.4 Korttidsforsøk for studier av opptaksmekanismer for Zn i tarmen (HI ansvarlig)	37
5.3.1	Forsøksdesign	38
5.3.2	Metodikk	38
5.3.3	Resultat og diskusjon A 3.4. Vekst, plasmanivåer av mineraler og lipider, gnuttrykk	41
5.3.4	Oppsummering av hovedfunn A 3.4, Zn opptak i tarm og metabolisme	50
5.4	A1.1. Effekter av fettsyrer på opptak av Zn i tarmepitelceller (RTgutGC) (Ansvarlig HI)	50
5.4.1	Forsøksdesign	50
5.4.2	Metodikk	51
5.4.3	Resultat og diskusjon A1.1.Celle-viabilitet og permeabilitet, Zn opptak i celler	54

5.4.4	Hovedfunn A1.1. Zn opptak i tarmceller og effekt av DHA	58
5.5	A1.4. Behov for EPA til post smolt i gjennomstrømningsanlegg (FT) sammenlignet resirkuleringsanlegg (RAS) (<i>Nofima ansvarlig, samarbeid med GU, HI</i>)	58
5.5.1	Forsøksdesign	59
5.5.2	Metodikk	62
5.5.3	Resultat og diskusjon A1.4, RAS/FT: Vekst, fettsyresammensetning, stress, barrierevev, helsemarkører	63
5.5.4	Oppsummering hovedfunn RAS/FT	84
5.5.5	Referanser A1	85
5.6	AP 2.1.-2.3. Mettet fett og samspill med kolesterol (HI ansvarlig i samarbeid med Skretting AI)	87
5.6.1	Forsøksdesign	88
5.6.2	Metodikk	88
5.6.3	Resultat og diskusjon A2 mettet fett og kolesterol: Vekst, fôrinntak, retensjon, fettsyresammensetning	95
5.6.4	Hovedfunn mettet fett og kolesterol A2.1-3	110
5.6.5	Referanser AP 2	110
5.7	AP3. Effekt av ulike diett nivåer av fett, fettsyrer og Zn på vekst, helse og filetkvalitet til A. laks i merder i sjø (Ansvarlig: Nofima i samarbeid med HI)	115
5.7.1	Forsøksdesign	116
5.7.2	Metodikk	123
5.7.3	Resultat og diskusjon AP 3: vekst, fôrutnyttelse, helse, mineral og fettsyresammensetning, filetkvalitet	128
5.7.4	Oppsummering hjertehelse	139
5.7.5	Oppsummering hovedfunn AP 3	164
5.7.6	Referanser AP 3:	165
6	Sentrale hovedfunn fra hele prosjektet	168
7	Leveranser	169
7.1	Resultatmål/leveranser	169
7.1.1	Presentasjoner	169
7.1.2	Muntlige presentasjoner konferanser	170
7.1.3	Vitenskapelige artikler publisert knyttet til PhD grad av Fang (vedlegg 1-3)	170
7.1.4	Artikkel submitted til Aquaculture, tilgjengelig som pre-print gjennom SSRN	170
7.1.5	Planlagte artikler etter prosjektavslutning	171
7.1.6	Medieoppslag	171

1 Sammendrag

1.1 AP 3. Sammendrag, langtidsforsøk merder i sjø

Sammensetningen av fôr til atlantisk laks i kommersiell akvakultur endrer seg kontinuerlig. Fettnivåene har økt, mens nivåene av omega-3-fettsyrer EPA og DHA har sunket. Forskning viser at både omega 3-fettsyrer og fettnivå kan påvirke mineralutnyttelsen. Dette eksperimentet undersøkte hvordan ulike nivåer av fett, omega-3-fettsyrer og sink i fôret påvirker vekst, helse, fettsyreretensjon i helkropp og muskelkvalitet hos atlantisk laks i sjømerder. Fisken vokste fra 1,5 kg til 4,5 kg. Prøvetaking ble utført ved ~2,5 kg og ved forsøkets slutt. Ved siste prøvetaking ga lavt Zn-nivå i fôret signifikant redusert sinknivå i helkropp og ulike vev, samt oppregulerte mRNA-uttrykk relatert til Zn-opptak i tarm. Lavere fettinnhold i fôret ga signifikant økte Zn-nivåer i plasma, lever og skinn, med tendens til økt Zn-innhold i helkropp og økt Zn-retensjon. Lavfett-dietter ga også signifikant økt selen (Se)-nivå i muskel og skinn. Økte EPA og DHA-nivåer i fôret viste en tendens til å øke Zn-innhold i helkropp og Zn-retensjon.

Laks fôret med 11 % EPA + DHA av totale fettsyrer hadde signifikant høyere sluttvekt enn de fôret med 6,5 %. Diettene påvirket muskelkvaliteten; 11 % EPA og DHA forbedret filetens rødfarge, mens lavt sinkinnhold resulterte i bløtere muskeltekstur. Høyere retensjon av totalfett og EPA i helkropp ble observert høsten 2021 sammenlignet med våren 2022. En signifikant interaksjon mellom periode og diett på EPA-retensjon i helkropp ($p=0,043$) ble påvist. Fettsyresammensetningen i vev gjenspeilet i stor grad fôrets sammensetning. Det laveste leverfettinnholdet ble observert i 11 % EPA+DHA-gruppen.

Disse resultatene understreker betydningen av EPA, DHA og sink for laksens helse og filetkvalitet, og demonstrerer to mulige strategier for å øke Zn-retensjon i laks i sjøvannsfasen: redusert fettinnhold og økt EPA og DHA-nivå i fôret.

1.2 AP 1. Sammendrag, korttids fordøyelighetsforsøk med Zn og in vitro forsøk med tarmceller

To kortvarige fôringsforsøk med atlantisk laks undersøkte interaksjonen mellom sink (Zn), fettinnhold og n-3 langkjedede flerumettede fettsyrer (n-3 LC-PUFA) i fôret, med fokus på postprandiale plasma-parametere og opptak og transport av Zn og fett i tarm. Etter 4 ukers fôring ble prøver tatt på ulike tidspunkter opp til 36/38 timer etter fôring. Resultatene viste at økte Zn-nivåer i fôret signifikant økte postprandiale plasmanivåer av Zn ved lavere temperatur (8–9 °C), men ikke ved høyere temperatur (10–12 °C). Markører for Zn- og fettopptak og -transport i tarm ble ikke påvirket av hverandres nivåer i fôret. I en komplementær in vitro-studie med regnbueørret tarmcellelinjen RTgutGC, ble det påvist at fettsyren DHA førte til økt opptak og transport av Zn sammenlignet med kontroll. Den enumettede fettsyren oljesyre viste også en positiv effekt på Zn-opptak og -transport i forhold til kontroll. Zn-transport i tarmen spiller en nøkkelrolle i reguleringen av kroppens Zn-lagring, mens fettransport påvirker lipidakkumulering i tarmen. EPA- og DHA-nivåer i fôret er vist å påvirke Zn-retensjonen i kroppen. Vår tidligere forskning har avdekket at reduksjon av fettinnholdet eller økning av n-3 LC-PUFA i dietten kan øke kroppens Zn-status og Zn-retensjon hos atlantisk laks. Disse funnene er særlig relevante i lys av endringer i fôrsammensetningen. Å forstå hvordan disse prosessene reagerer på ulike fôrkomponenter er avgjørende for å opprettholde fiskehelse og velferd, spesielt med tanke på miljøhensyn og regulatoriske begrensninger på Zn-nivåer i fôret.

1.3 AP 1. Sammendrag Samspill Zn og omega-3 fettsyrer i fôr til parr og in vitro sårhelingsmodell

Formålet med dette arbeidet var å undersøke interaksjoner mellom sink (Zn) og omega-3 i forbindelse med skinn- og benutvikling hos laks, ved å kombinere in vitro- og in vivo-teknikker. Lakseparr (5–15 g) ble fôret med seks ulike dietter som varierte i Zn- og omega-3-nivåer, og vi studerte både skinn- og

benkvalitet samt sårheling av mekanisk induserte sår (dypt kutt, overfladisk sår og skinn tett inntil sårkant). Resultatene viste at fisk føret med høy Zn og høy omega-3 hadde raskere skjellutvikling, økt bentetthet i ryggvirvlene og raskere regenerering av skjell etter skade. I cellekulturforsøk viste keratocytter høyere migreringspotensiale når vekstmediet inneholdt både Zn og DHA, med den sterkeste effekten ved kombinasjon av begge. Rask migrering av keratocytter for å dekke sår og regenerering av skjell for å opprettholde skinnstyrken er viktige faktorer i sårheling hos fisk, og våre funn viser at kombinasjonen av Zn og omega-3 spiller en sentral rolle i disse prosessene.

1.4 AP 2 Sammendrag mettet fett

Redusert bruk av marine ingredienser i fôr til oppdrettslaks har ført til lavere nivåer av mettet fett (SFA) og kolesterol (CHOL). Konsekvensene av dette ble undersøkt i et fôringsforsøk med fem ulike nivåer av SFA (10-28 % av totale fettsyrer). I tillegg ble noen dietter tilsatt ekstra CHOL, noe som ga et faktorielt design med høy/lav SFA og høy/lav CHOL. Resultatene viste at lavt SFA-nivå reduserte vekst, økte fôrintak og fôrfaktor (FCR), sannsynligvis på grunn av energi brukt på endogen SFA-produksjon. Retensjonsberegninger viste betydelig egenproduksjon av mettet fett og kolesterol i gruppene som hadde fått lave nivåer i fôret. Lavt SFA-nivå påvirket også filet kvaliteten negativt, med økt væsketap etter frysing og tining, samt redusert muskelstyrke og dårligere farge på filet. Lav SFA i fôret ga også økt akkumulering av fett i lever, samt hadde en svak negativ effekt på retensjon av DHA og DHA-nivåer i ulike vev. Selv om verken SFA eller CHOL er essensielle næringsstoffer for laks, viser resultatene tydelig at for lave nivåer i fôret kan redusere fiskeytelsen og filet kvaliteten.

1.5 AP 1 sammendrag RAS og gjennomstrømming – effekt av system og ulike nivå EPA i fôr

I et forsøk med atlantisk laks (100–440 g) ble to fôrtyper – et kontrollfôr og et fôr med høyere EPA-nivå (EPA+) – testet i både resirkuleringssystem (RAS) og gjennomstrømningsanlegg (FT). Tilveksten var signifikant lavere i RAS enn i FT, og RAS-fisk viste økte nivåer av stressmarkører (kortisol, kortison, 5 β -THE i faeces) og høyere konsentrasjoner av eikosanoidene LTB₄ og LTB₅ i lever. Gjelleanalyser viste reduserte nivåer av EPA og arakidonsyre (ARA) i fosfolipidklassene fosfatidylkolin (PC) og fosfatidylinositol (PI) hos RAS-fisk, noe som kan indikere økt omdannelse av disse fettsyrene til eikosanoidproduksjon. En høyere PC/fosfatidyletanolamin (PE)-ratio i RAS-gjeller kan også påvirke membranfluiditeten, noe som tyder på tilpasning til systemspesifikke miljøforhold.

Serumverdier for ASAT, ALAT og osmolalitet var lavere i RAS, og EPA-tilskudd reduserte disse verdiene i begge systemer. Fettsyremønstre i vev ble primært styrt av fôret, men med samspill mellom system og fôrtype: EPA-tilskudd økte EPA- og ARA-nivåer i skinn hos FT-fisk, men ikke i RAS fisk. RAS-fisk hadde tykkere epidermis, men økt permeabilitet for mannose i EPA+-gruppen, samt redusert barrierefunksjon i tarmen – mot ioner i distale deler og mot mannose i proksimale deler. Proksimal tarm i EPA+-gruppene hadde signifikant høyere nivåer av n-6-fettsyrene ARA og 20:3n-6. Samlet viser resultatene at RAS-fisk, hadde lavere tilvekst, forhøyet stressrespons, endret fosfolipidmetabolisme og strukturelle endringer i skinn og tarm sammenlignet med fisk i FT. Funnene understreker RAS-miljøets komplekse påvirkning på fiskens fysiologi og helse, og behovet for optimalisering av både fôrsammensetning og systembetingelser for å redusere negative effekter.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Sammensetningen av fôret til laksen er dramatisk endret etter årtusenskiftet, ved at fiskeolje og fiskemel i stor grad har blitt erstattet med vegetabiliske oljer og planteprotein. Selv om fôrene optimaliseres etter kjente ernæringsbehov, har endringene medført redusert innhold av komponenter som kan påvirke laksens ytelse og helse. Nedgangen i fiskemel har blant annet ført til lavere nivåer av marine fosfolipider og kolesterol. Lavere nivå av fiskeolje i fôret har ført til redusert innhold av mettede fettsyrer og omega-3 fettsyrene EPA og DHA. I FHF prosjektene #901282 «Samspill fett i fôr, miljø og fiskehelse (OptiHealth)» og #901265 «Ernæringens betydning for skinn, tarm- og gjellehelse hos laks», viste resultater at ulike næringsstoff gjensidig påvirker hverandre. Økt nivå av fett og redusert nivå av EPA og DHA i dietten, resulterte f.eks. i redusert opptak og deponering av sink (Zn) i fiskekroppen. Man vet at Zn, fra dagens kilder, er relativt lite tilgjengelig for laksen og at ca. 70 % av Zn fra fôret tapes til omgivelsene. Zn akkumulerer dermed i slammet under merdene og forårsaker at slammet fra RAS-anlegg blir uegnet som gjødsel til landbruk. Store mengder Zn er også skadelig for økosystemet rundt merdene, noe som har medført at det nylig ble besluttet en øvre tillatt grense på 180 mg/kg Zn i fôret til laksen. På den ene siden ønsker man å dekke laksens behov for Zn, men på den annen side tilstrebes lavest mulig utslipp av Zn til omgivelsene. Det er ikke kjent hvilke Zn nivåer i fôret som vil sikre laksens behov og helse ved ulike diett nivåer av EPA og DHA i ulike produksjonssystem og videre er relativt lite kjent om betydningen av samspillet mellom disse næringsstoffene. Lave nivåer av fiskeolje og fiskemel i fôret har også ført til reduserte nivåer av mettede fettsyrer og kolesterol og økte nivåer av plantefettsyrer, og foreløpige resultater indikerer at samspillet mellom disse næringsstoffene kan påvirke både muskelkvalitet som fettavrenning fra fileten, energiomsetning og retensjon av fett og fettsyrer i laksen (FHF prosjekt #901282). På tross av tilgjengelig kunnskap om ernæringsbehov for de viktigste næringsstoffene isolert sett, hadde man ved oppstart av dette prosjektet manglende kunnskap om betydningen av samspillseffekter mellom ulike næringsstoff i fôret for laksens helse. Målet med prosjektutlysningen fra FHF var å tette dette kunnskapshullet slik at næringen kan forbedre fôrrecepter for å styrke tilvekst, fiskehelse og muskelkvalitet. Problemstillingen er forankret i FHF's prioritering om å fremskaffe kunnskap om hvordan fett, fettsyrer, kolesterol og mineraler i fôret påvirker fiskens helse og robusthet.

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektperiode: 2021-2025

Budsjett fra FHF: NOK 24 669 100,- + **Egenfinansiering partnere:** NOK 3 767 110,-

= Total budsjett: NOK 28 436 210,-

Opprinnelig bidrag fra FHF: NOK 24 000 000,-

Tilleggsbevilgning fra FHF 13.10 2022: NOK 669 100,-

Egenfinansiering partnere: NOK 3 767 110,-

Havforskningsinstituttet: NOK 1 370 000

Skretting: NOK 960 000,-

BioMar: NOK 617 000,-

INRA: NOK 500 000,-

Gøteborg Universitet: NOK 319 120,-

Tilleggsfinansiering: 3 årig stipendiat stilling, HaoHang Fang, tilknyttet prosjektet (finansiert av stipend fra kina).

Prosjektet har samarbeidet med Gifas og Universitetet i Tromsø med veileder Tore Seternes om å finansiere mastergrad til Kristina Maria Solvang.

2.3 Prosjektorganisering (roller/ansvar: prosjektgruppe, referansegruppe)

Nofima, som juridisk enhet, har koordinert prosjektet med prosjektleder Bente Ruyter som ansvarlig for prosjektadministrasjonen. Prosjektledelsen har bestått av en representant fra hver av samarbeidspartnerne; Nofima, HI, NMBU, BioMar, Skretting, Gøteborg Universitet (Sverige) og INRAE (Frankrike).

2.3.1 Referansegruppe

FHF oppnevnte følgende referansegruppe med representanter fra havbruksnæringen;

- **Arne Guttvik**, SalMar ASA - Fôr- og analysesjef
- **Ernst Morten Hevrøy**, MOWI ASA - Product Development Manager
- **Tor Eirik Homme**, Grieg Seafood ASA - Director Feed and Nutrition, CSO
- **Martin Huun-Røed (historisk tilknytning)**, MOWI Feed AS - Product Development Manager
- **Arne Høistad Schei**, Lerøy Seafood Group ASA - Avdelingsleder
- **Ingebjørg Sævareid (historisk tilknytning)**, Salmon Group AS - Fagsjef fiskehelse og ernæring

Referansegruppen har vært invitert til oppstartsmøte, sluttmøte og 1 årlig møte for å diskutere prosjektplaner og å gi innspill/diskutere forskningsstrategien.

2.3.2 Prosjektgruppe

- B. Ruyter, forsker Nofima, bente.ruyter@nofima.no
- G. Berge, forsker Nofima, gerd.berge@nofima.no
- E. Ytteborg, forsker Nofima, elisabeth.ytteborg@nofima.no
- T.K. Østbye, forsker Nofima, tone-kari.ostbye@nofima.no
- A. Krasnov, forsker Nofima, aleksei.krasnov@nofima.no
- M. Bou, forsker Nofima, marta.bou@nofima.no
- E. Lutfi, forsker Nofima, esmail.lutfi@nofima.no
- Thomas Larson, forsker Nofima, thomas.larson@nofima.no
- Nini Sissener, forsker HI, (Nofima fra feb-2025, nini.sissener@nofima.no)
- Øystein Sæle, forsker HI, oystein.saele@hi.no
- Anthony Philip, forsker HI, (Nofima fra sept-2023, antony.philip@nofima.no)
- Kristina Sundell, forsker GU, kristina.sundell@bioenv.gu.se
- Henrik Sundh, forsker GU, henrik.sundh@bioenv.gu.se
- Grethe Rosenlund, forsker Skretting AI, grethe.rosenlund@skretting.com
- Ingunn Stubhaug, forsker Skretting AI, ingunn.stubhaug@skretting.com
- Trygve Sigholt, forsker BioMar, trysi@biomar.com
- Øystein Evensen, forsker NMBU, oystein.evensen@nmbu.no
- S. Fontagné-Dicharry, forsker INRAE, stephanie.fontagne-dicharry@inrae.fr
- F. Beaumatin, forsker INRAE, florian.beaumatin@inrae.fr

2.3.3 Samarbeidspartnerens kompetanse og roller

Nofimas rolle i prosjektet har vært som prosjektleder og har videre bidratt med fiskefôrproduksjon (AP 1), fiskefôrforsøk (AP 1 og AP 3) og analyser. Nøkkelkompetanse til personer involvert: Professor Bente Ruyter: Prosjektleder; kompetanse innen fiskeernæring, lipidmetabolisme og essensielle fettsyrebehov. Dr. Gerd Marit Berge, fiskeernæring, fiskefôrforsøk. Dr. Tone Kari Østbye og Dr. Marta Bou, lipidmetabolisme, celle- og molekylærbiologi, Dr. Aleksei Krasnov, transkripsjonsanalyser, bioinformatikk. Dr. Grethe Bæverfjord som ansvarlig for røntgenanalyser og

mikroskopianalyser av ulike vev. Dr. Esmail Lutfi, lever helse, metabolomics. Dr. Thomas Larson, muskelkvalitet.

Havforskningsinstituttets rolle: HI har ledet AP 2, og har videre hatt en sentral rolle i AP3 og bidratt med analyser og kompetanse, samt in vitro forsøk i AP 1. Sentrale kompetansepersoner involvert; Dr. N.H. Sissener, som har bred erfaring innen fiskeernæring, spesielt i forhold til lipidmetabolisme i fisk. Dr. A. Prabhu som har vært tilknyttet studier av mineralbehov og -metabolisme i fisk, inkludert i in vitro modeller. Dr. Ø. Sæle har hatt hovedansvaret for in vitro forsøk og vært tilknyttet fôringsforsøkene med fokus på funksjon av mage/tarmkanalen.

Göteborg universitet (GU): Prof. Kristina Sundell har hovedekspertise innen helse og velferd i havbruk. Hun er videre en anerkjent ekspert i gastrointestinal fysiologi. Dr. Henrik Sundh har bred kompetanse innen nærings- og ione-transportmekanismer og barrierefunksjoner. I prosjektet har GU vært ansvarlig for studier av barrierefunksjon i tarm og skinn til laks ved bruk av Ussing kammer i AP1.

INRAE: Forskningsgruppen Nutrition Metabolism Aquaculture (NuMeA) tilhører det franske instituttet INRAE (National Research Institute for Agriculture, Food and Environment). Dr. S. Fontagné-Dicharry og Dr. F. Beaumatin har bidratt i prosjektet i AP1 med *in vitro* forsøk med tarmceller og fokus på molekylære signalveier, og hvordan Zn og fettsyrer påvirker disse.

Skretting Aquaculture Innovation (AI) utfører forskning innen fiske- og rekeernæring, helse og fôrproduksjon og har kvalitetssikrede fasiliteter til fiskeforsøk, fôrproduksjon og akkrediterte analyser. Skretting har hatt en nøkkelrolle i AP2 ved å være ansvarlig for fôrproduksjon og fôringsforsøk på mettett fett og kolesterol og har videre bidratt med bred kompetanse innen AP1 og 3. Involverte personer i Skretting har vært Dr. Grethe Rosenlund, Dr. Ingunn Stubhaug og Dr. Linda Beate Jensen.

BioMar er en global fiskefôrleverandør. Utviklingen av kommersielt BioMar-fôr drives av produktorientert FoU-arbeid. BioMar har i prosjektet bidratt med kompetanse innen fiskefôrteknologi, fiskeernæring og fiskehelseaspekter. BioMar har hatt en nøkkelrolle i AP3 med produksjon av fôr, samt til korttidsforsøk med samme fôrene i AP1. Personer involvert: Dr. Trygve Sigholt med bred kompetanse innen næringssammensetning, fôringrediensevaluering og fiskeernæring.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Veterinærhøgskolen Institutt for parakliniske fag, Faggruppe for akvamedisin: Dr. Øystein Evensen, er professor ved NMBU, hvor han leder en forskningsgruppe som har bred kompetanse innen studier på virale og bakterielle sykdommer hos oppdrettslaks. I prosjektet har Dr. Evensen bidratt med karakterisering av hjertehelse til laksen i AP 3.

3 Problemstilling og formål

Hovedmål:

Fremskaffe kunnskap om hvordan samspill mellom fett og fettsyrer, sink og kolesterol i fôret påvirker fiskens helse og robusthet i ulike deler av produksjonssyklusen.

Delmål:

- Ny kunnskap om hvordan ulike nivåer av Zn og omega-3 fettsyrer i dietten samspiller og påvirker membranlipidsammensetning og funksjon til tarm inkludert opptak og transport av næringsstoff, samt skinn og skjellutvikling og mineralisering av skjell og skjelett (AP1).
- Fôringforsøk i to produksjonssystemer, gjennomstrømming og resirkulering, gir kunnskap om betydningen av EPA og Zn for skinnhelse og tarmfunksjon (AP1).
- Fôringforsøk med laks i sjøvann gir økt kunnskap om hvordan mettede fettsyrer og kolesterol i fôret påvirker helse, ytelse og kvalitet (AP2).
- Ny kunnskap om hvordan mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer påvirker fettransport i tarmen og barrierefunksjonen til tarm og skinn. og (AP1 og AP2).
- Fôringforsøk med laks i merder i sjø (fra 1,5 kg til slaktestørrelse på 5 kg) gir økt kunnskap om hvordan fettnivå og Zn i fôret samspiller og påvirker helse, ytelse og kvalitet. (AP3).
- Korttidforsøk med tidsserieuttak etter fôring vil gi kunnskap om opptaksmekanismer for Zn i tarmen hos laks, og hvordan fettnivå i fôret påvirker dette. (AP3).
- Kunnskap om effekten av kommersielt nivå EPA+DHA i fôret (~2 % av fôret), sammenlignet med 3,5 % EPA+DHA på helse, ytelse og kvalitet (AP3).

4 Prosjektgjennomføring

4.1 Oversikt over arbeidspakker

4.1.1 AP 1. Samspill mellom omega-3 fettsyrer og Zn

Fôringsforsøk

- **Task A1.3. Lakseparr som modell for studier av samspill Zn og omega-3 i ferskvann** (*Nofima ansvarlig, samarbeid med GU og HI*)
- **Task A1.4. Behov for EPA i RAS vs FT** (*Nofima ansvarlig, samarbeid med GU, HI*)

In vitro modellstudier

- **Task A1.1.** Samspillseffekter av fettsyrer og Zn i tarmepitelceller (RTgutGC) (*HI ansvarlig, samarbeid med INRAE*)
- **Task A1.2** In vitro modell for studier av samspillseffekter mellom omega-3 fettsyrer og Zn i skinncceller (*Nofima ansvarlig*)

4.1.2 AP 2. Mettet fett og samspill med kolesterol

- **Task 2.1** Fôringsforsøk med mettet fett og kolesterol (*Skretting ansvarlig, samarbeid HI*)
- **Task 2.2** Videreføring av to ekstremgrupper for evaluering av filetkvalitet (*HI ansvarlig, samarbeid Skretting*)
- **Task 2.3** Analyser AP2 (*HI ansvarlig, samarbeid Skretting, GU, Nofima*)
- **Task 2.4.** Hva skjer med mettet, enumettet og flerumettet fett i tarmcellene? (*HI ansvarlig*)

4.1.3 AP 3. Laks i merder i sjø og samspill mellom fett, fettsyrer og Zn og effekter på helse, ytelse og kvalitet.

- **Task 3.1.** Forsøk i merder i sjø (*Nofima ansvarlig, samarbeid HI, BioMar*)
- **Task 3.2** Analyser av prøver relatert til velferd og muskelkvalitet (*Nofima ansvarlig, samarbeid HI, BioMar, Skretting, NMBU*)
- **Task 3.2** Analyser av prøver fra sjøforsøket relatert til mineraler og samspill med fett og fettsyrer (*HI ansvarlig*)
- **Task 3.4.** Korttidsforsøk i kar opptaksmekanismer for Zn i tarmen hos laks, og hvordan fettnivå i fôret påvirker dette. (*HI ansvarlig*)

5 Forsøksbeskrivelse, resultater, diskusjon og hovedfunn

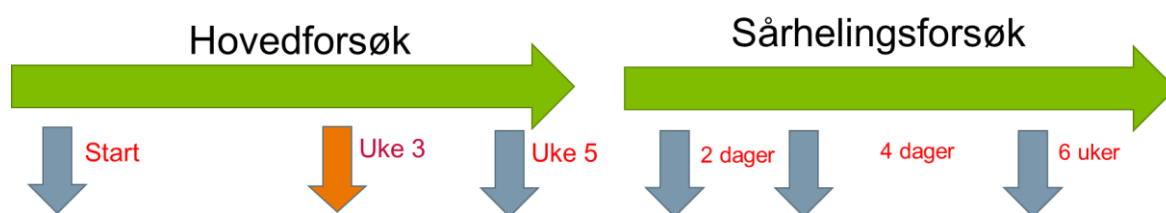
5.1 AP 1.3. Lakseparr som modell for studier av samspill Zn og omega-3 i ferskvann

Forfattere: Elisabeth Ytteborg, Gerd Marit Berge, Lene Sveen, Henrik Sundh, Esmail Lutfi, Aleksei Krasnov, Marta Bou, Tone-Kari Østbye, Gerrit Timmerhaus, Grete Bæverfjord, Bente Ruyter.

Mål: Etablere ny kunnskap om hvordan ulike nivåer av Zn og omega-3 fettsyrer i dietten samspiller og påvirker tilvekst, kroppssammensetning og funksjonen til skinn, tarm, lever, skjellutvikling, mineralisering av skjell og skjelett og sårheling hos laks.

5.1.1 Forsøksdesign

Forsøk med lakseparr (startvekt 5 g) ble utført i ferskvann i små karenheter (150 L) ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra. Det ble fordelt 2880 laks på 18 forsøkskar, 160 fisk per kar. Vanntemperaturen ble holdt stabil på 13 °C og med gjennomsnittlig O₂ nivå på 87 % og kontinuerlig lys. Forsøksfisken ble føret 6 ulike dietter, hver i triplikate kar og med pelletstørrelse på 1,5 mm. Hovedforsøket varte i 36 dager inntil laksen nådde en sluttvekt på 17,6 g. Ved avslutning av hovedforsøket ble 10 forsøksfisk per kar avlivet med en overdose av Finquel (1000 mg/g) og det ble tatt vevsprøver av lever, skinn, halefinne, ryggvirvel, tarm og NQC på flytende nitrogen (kjemiske analyser), RNA later (genuttryksanalyser), og fiksert på 10 % formalin (histologiske analyser). Per kar ble det frosset ned 10 fisk på -20 °C for analyse av fett og mineraler i helkropp, røntgen og CT analyse av ryggvirvel. All forsøksfisk ble bulkveid ved avslutning av hovedforsøket.



Figur 1 Oversikt over forsøksdesign av hovedforsøk og sårhelingsforsøk. Det ble tatt prøver av helkropp ved start, etter 3 ukers føring og etter 5 uker ved avslutning av hovedforsøket for å følge utviklingen av skinnen. Laksen ble føret med 6 ulike dietter fra start til avslutning av sårhelingsforsøket. Ved uke 5 av hovedforsøket ble det analysert tilvekst, mineral og fettsyresammensetning av helkropp, skinn, bein og lever, histologi av skinn og lever, analyse av skjelldannelse i skinn og CT-scanning for beintetthetsanalyse og røntgen analyse av helkropp. Sårhelingsforsøket ble startet opp 2 dager etter avslutning av hovedforsøket, og fisken ble overført til et samlekar per diettgruppe (totalt 6 kar). Etter 4 dager og 6 uker i sårhelingsforsøket ble det gjennomført analyse av kontraksjonsraten for sår, skjelldannelse og histologisk analyse av sårene.

Etter avslutning av hovedforsøket ble 36 forsøksfisk fra hver diettgruppe overført til et samlekar per diettgruppe (se Figur 1 for oversikt over forsøksdesign), og fisken fortsatte med de samme forsøksdiettene gjennom sårhelingsforsøket på 6 uker. Ved oppstart av sårhelingsforsøket, 2 dager etter overføring til samlekarene, ble 32 fisk per diettgruppe påført tre små standardiserte sår i skinnen. Først ble overfladiske sår påført bedøvet fisk (bedøvet i Finquel MS222, 60-70 mg/l) ved å legge på et templat med en diameteråpning på 4 mm. Skjellene ble fjernet i templat området og skinnen ble strøket fem ganger med en tannbørste i horisontal retning. En cm bak overflatesåret ble det deretter påført samme fisk et nytt sår, et såkalt vertikalt snitt påførte med et skalpellblad, 2 mm langt og ca. 2 mm dypt. Dette snittet trenger igjennom det øverste skinnlaget. Det ble tatt ut 16 fisk med sår og to kontrollfisk uten sår fra hver førgruppe for prøvetaking ved to ulike tidspunkt, henholdsvis ved 4 dager og 6 uker. Fra 8 sårfisk per gruppe ble det tatt vevsprøvemateriale fra sårområdet til genuttrykk og histologiske analyser.

Fôrsammensetning

De 6 forsøksfôrene, pellet-størrelse på 1,5 mm, ble produsert ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen. Fôrene var iso-energetiske og inneholdt 50 % protein, 23 % fett, 12,2 % aske og 6,5 % vann. Yttriumoksid (Y_2O_3 , 100 mg/kg) ble tilsatt diettene som en markør (Tabell 1). Det ble benyttet automatiske båndmatere med en fôringsfrekvens hvert 15. minutt. Mengden fôr gitt var i henhold til fôringstabeller og forventet veksthastighet og justert i henhold til observert appetitt. Fiskene ble fôret med 6 eksperimentelle dietter som inneholdt 2 nivåer av EPA og DHA: 1 % L (lav, 4,8 % av totale fettsyrer); og 3 % H (høy, 15,5 % av totale fettsyrer), og 3 økende nivåer av Zn (120, L; 180, M (medium); eller 220, H, mg/kg) i 5 uker. Tabell 2 viser fettsyresammensetningen av de ulike forsøksfôrene.

Tabell 1 Fôrsammensetning (%) av de 6 forsøksfôrene; 3 % omega-3 fettsyrer og 120 mg/Kg Zn (HΩ/LZn), 1 % omega-3 og 120 mg/Kg Zn (LΩ/LZn), 3 % omega-3 og 180 mg/Kg Zn (H Ω/M Zn), 1 % omega-3 og 180 mg/Kg Zn (LΩ/M Zn), 3 % omega-3 og 220 mg/Kg Zn (HΩ/HZn), 1 % omega-3 og 220 mg/Kg Zn (LΩ/HZn).

Ingrediens (%)	H Ω/L Zn	L Ω/L Zn	H Ω/M Zn	L Ω/M Zn	H Ω/H Zn	L Ω/H Zn
Fiskemel	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Hvete	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1
Hvetegluten	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
Soya SPC	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0
Rapslecitin	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
MOS (mannan-oligosakkarider)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Choline klorid	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Vitaminpremiiks	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Mono-calciumPhosphate (MCP)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Astaxanthin 10%	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
Mineralmix oleo sink	0,560	0,560	0,560	0,560	0,560	0,560
Yttriumoksyd	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Sink, ZnSO ₄	0,013	0,013	0,030	0,030	0,040	0,040
Vit E (50 %)	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060
Vit C (35 %)	0,215	0,215	0,215	0,215	0,215	0,215
Fiskeolje til grunnblanding	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41
Soyaolje til grunnblanding	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
Vann	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
Oljer til coating						
FO 10/21 (coating)	7,2	0,0	7,2	0,0	7,2	0,0
Rapsolje 6/21 (coating)	0,0	13,6	0,0	13,6	0,0	13,6
Soyaolje 1/21 (coating)	4,7	0,0	4,7	0,0	4,7	0,0
Veramarisolje P 21 (coating)	1,8	0,0	1,8	0,0	1,8	0,0
Sum	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Kjemisk sammensetning (% i fôr, beregnet)	H Ω/L Zn	L Ω/L Zn	H Ω/M Zn	L Ω/M Zn	H Ω/H Zn	L Ω/H Zn
Protein	50	50	50	50	50	50
Fett	21	21	21	21	21	21
Aske	12,4	12,4	12,4	12,4	12,4	12,4
Vann	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Fettsyrer i fôr						
Ratio EPA:DHA	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65	0,65
EPA + DHA, % av diet	3	1	3	1	3	1
EPA, % av diett	1,2	0,4	1,2	0,4	1,2	0,4
DHA, % av diett	1,8	0,6	1,8	0,6	1,8	0,6
N-6, % av diett	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Zn i fôret ppm	120	120	180	180	220	220

Tabell 2 Fettsyresammensetning av de 6 forsøksfôrene (% av totale fettsyrer), 3 % omega-3 og 120 mg/Kg Zn (H Ω/LZn), 1 % omega-3 og 120 mg/Kg Zn (L Ω/L Zn), 3 % omega-3 og 180 mg/Kg Zn (HΩ/MZn), 1 % omega-3 og 180 mg/Kg Zn (LΩ/MZn), 3 % omega-3 og 220 mg/Kg Zn (HΩ/HZn), 1 % omega-3 og 220 mg/Kg Zn (LΩ/HZn).

	H Ω/L Zn	L Ω/L Zn	H Ω/M Zn	L Ω/M Zn	H Ω/H Zn	L Ω/H Zn
Fett%	23,0	23,4	23,9	23,7	22,9	23,1
14:0	3,7	0,9	3,4	1,0	3,8	1,0
16:0	13,9	7,9	13,7	8,0	13,8	7,9
17:0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
18:0	2,4	1,9	2,4	1,9	2,3	1,9
20:0	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4
Sum SFA	20,7	11,6	20,2	11,8	20,7	11,5
16:1 n-7	2,8	1,3	2,8	1,3	2,8	1,3
18:1 n-11	0,3	0,1	0,4	0,1	0,4	0,1
18:1 n-9	15,2	45,6	15,3	45,4	15,2	45,5
18:1 n-7	1,9	3,0	1,9	3,0	1,9	3,0
20:1 n-9	6,3	3,1	6,4	3,1	6,3	3,1
22:1 n-11	10,1	3,2	10,2	3,2	10,1	3,1
22:1 n-9	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5
24:1 n-9	0,6	0,5	0,7	0,5	0,6	0,5
Sum MUFA	37,8	57,3	38,1	57,2	37,8	57,2
18:2 n-6	16,0	16,5	16,0	16,6	16,1	16,6
18:3 n-3	2,6	6,5	2,6	6,4	2,6	6,5
20:4 n-3	1,9	0,5	1,9	0,5	1,9	0,5
20:4 n-6	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2
20:3 n-3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3
20:5 n-3	6,0	1,9	6,0	1,9	6,0	1,9
22:5 n-3	0,7	0,2	0,7	0,2	0,7	0,2
22:6 n-3	9,5	2,9	9,5	2,9	9,4	2,9
Sum PUFA	37,3	29,0	37,5	29,0	37,4	29,0
SUM	95,5	97,6	95,5	97,7	95,5	97,6
Sum andre	3,9	2,2	4,0	2,1	3,9	2,3
Sum EPA+DHA	15,5	4,8	15,6	4,8	15,4	4,8
Sum N-3	20,9	12,3	21,0	12,3	20,8	12,3
Sum N-6	16,6	16,8	16,7	16,9	16,7	17,0
n3/n6	1,3	0,7	1,3	0,7	1,2	0,7

5.1.2 Metodikk

Fett, fettsyrer og lipidklasser

Totale lipider og fettsyresammensetning ble analysert i diettene, helkropp, muskel (NQC), lever, skinn, midttarm som tidligere beskrevet av Folch et al 1957, mens lipidklasser ble analysert som beskrevet av Bou et al., 2017 og Lutfi et al., 2022.

Kjemiske sammensetning

Tørrestoff ble bestemt ved gravimetrisk analyse etter tørking ved 105 °C i 16 timer. Askeinnhold ble målt basert på masseendring etter forbrenning i en muffelovn ved 550 °C i 16 timer. Måling av totalt N2-

innhold ble utført ved hjelp av en elementanalysator (Flash 2000 Thermo Fisher Scientific), og dataene ble brukt til å beregne proteininnholdet i prøven basert på $N \times 6,25$. Bruttoenergi ble bestemt ved isoperibolic bombkalorimetri i et Parr 6200 oksygenbombkalorimeter (Parr Instrument Company). Karbohydratinnhold ble beregnet ved differanse.

Mineralanalyser

Mineralanalyser ble utført av Biolab, Nofima, Bergen. Nivåene av P, Mg, Zn og Ca ble bestemt ved bruk av induktivt koblet plasmaoptisk emisjonsspektroskopi (ICP-OES) (Agilent 5110 VDV, Agilent Technologies, Mulgrave, Australia). ICP-OES-elementbestemmelsesbetingelsene var i samsvar med NS:EN 15621:2017-metoden tilpasset OES. Et eksternt laboratorium (Eurofins, Molde, Norge) undersøkte seleninnholdet i alle prøvene.

Genuttrykk

Vevsprøver på 5-10 mg ble tilsatt 400 μ L lysisbuffer fra Qiagen (Düsseldorf, Tyskland), proteinase K i en konsentrasjon på 50 mg/mL, og keramiske kuler. Ved hjelp av en FastPrep 96 homogenisator (MP Biomedicals, Eschwege, Tyskland) ble prøvene mekanisk brutt ned ved maksimal ristehastighet i 120 sekunder. Etter sentrifugering ble prøvene inkubert ved 37 °C i 30 minutter. RNA-ekstraksjon ble utført ved hjelp av en automatisert Biomek 4000-robot (Beckman Coulter, CA, USA) med Agencourt RNAdvance Tissue-kit. Konsentrasjonen av det ekstraherte RNA-et ble kvantifisert ved hjelp av et NanoDrop One spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), og kvaliteten ble evaluert med en Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Sekvensering ble utført på en Illumina NovaSeq 6000 S4 flow-celle, som genererte 1/4 av en NovaSeq S4-bane med 300-syklus paired-end sekvensering. Omtrent 20-50 millioner paired-end avlesninger ble generert per prøve, med en avlesningslengde på 2×150 basepar.

Histologi av skinn

Skinnp prøver fra alle uttakene ble sendt for prosessering til Veterinærinstituttet i Harstad og farget med AB/PAS, von Kossa eller Movat, avhengig av hva som var relevant å analysere. AB/PAS ble brukt for kvantifisering av de ulike sinnlagene, med Aiforia®, en algoritme utviklet for å evaluere skinnkvalitet hos laks Sveen et al., 2021, mens Von Kossa ble brukte for å evaluere mineralisering av skjellene, og MOVAT for å vurdere dannelse av granulasjonsvev.

Ussing kammer-analyse

Permeabilitetsmålinger ble utført på fisk fra de 3 ulike diettgruppene med 3 ulike Zn nivåer i dietten og med 3 % omega-3 fettsyrer (EPA + DHA) i dietten (1 % omega-3 diettgruppene ble ikke inkludert i ussing kammer analysene). Fire fisk ble tilfeldig valgt fra hver eksperimentelt kar (3 kar for hver Zn diett; $n=12$) og avlivet med en overdose bedøvelse. En skinnp prøve på 2x2 cm ble tatt fra den venstre ventralsiden av fisken, over sidelinjen, renses for muskelvev og plassert i iskald Ringer-løsning for ferskvannstilpasset laksefisk (140 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 15 mM NaHCO₃, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM KH₂PO₄, 0,8 mM MgSO₄, 5 mM HEPES, 10 mM D-glukose, 0,5 mM L-lysin og 20 mM L-glutamin (pH 7,8)). Bukhulen ble åpnet lateralt, og tarmen, fra like bak de siste pylorusblindsekkene til endetarmen, ble forsiktig fjernet. Tarmen ble delt inn i en proksimal og en distal del, og plassert i en iskald, luftet Ringer-løsning. Tarm- og skinsegmentene ble montert i modifiserte Ussing-kamre (tarm: 0,08 cm² og skinn 0,75 cm²), fylt med passende lakse-Ringer-løsning, og temperaturen ble holdt på fiskens akklimeringstemperatur ved hjelp av en kjølekappe. Blanding og oksygenering ble opprettholdt av en gassluffer. Etter montering fikk vevssegmentene 60 minutter til å stabilisere de elektriske parameterne. For å vurdere permeabiliteten til tarmsegmentene ble den transepitelliale elektriske motstanden (TER) samt den tilsynelatende permeabiliteten (Papp) av det hydrofile markør-molekylet 14C-mannitol målt ved hjelp av et Ussing kammer-system som tidligere beskrevet (Sundell og Sundh, 2012). Sammen med TER ble kontinuerlig overvåking av den transepitelliale elektriske motstanden (TEP; mV) og kortslutningsstrømmen (SCC;

$\mu\text{A}/\text{cm}^2$) brukt til å overvåke preparatets levedyktighet og som indikatorer på henholdsvis netto ionefordeling og netto ionestrøm. Etter 60 minutters akklimeringsperiode ble eksperimentet startet ved å fornye Ringer-løsningen på den serosale siden og erstatte Ringer-løsningen på den mukosale siden med Ringer som inneholdt 40 kBq ml⁻¹ av det hydrofile markørmolekylet 14C-mannitol (0,1 mCi ml⁻¹ og 55,5 mCi mmol⁻¹; PerkinElmer, Boston, MA, USA). For skinnet, ble ferskvann som inneholdt samme konsentrasjon av 14C-mannitol brukt i det mukosale kammeret for å simulere in vivo-forhold. Radioaktivitet ble målt i en væskescintillasjonsteller (Wallac 1409, Turku, Finland) etter tilsetning av 5 ml Ultima Gold™ (PerkinElmer, Boston, USA). Tilsynelatende permeabilitetskoeffisient for mannitol (Papp; cm/s) ble beregnet ved hjelp av ligning (1) $P_{app} = dQ/dT \times 1/A$ der dQ/dT er tilsynekommestraten av molekylet i det serosale rommet i Ussing-kammeret, A er arealet (cm²) av vevoverflaten eksponert i kammeret, og C_o er den opprinnelige konsentrasjonen (mol ml⁻¹) på den mukosale siden.

Aminosyretransport ble beregnet ved hjelp av ligning

(2): $(dQ/dT)/A$ der dQ/dT er tilsynekommestraten av næringsstoffet i det serosale rommet i Ussing-kammeret (mol/min), og A er arealet (cm²) av tarmoverflaten som er eksponert. De elektriske parameterne TER, TEP og SCC rapporteres som gjennomsnittsverdien av de siste fem målingene mellom 130-150 minutter.

Statistikk

Kar ble brukt som eksperimentell enhet. En toveis variansanalyse (toveis ANOVA) ble brukt for å teste effekten av Zn og fettsyre (Zn vs omega3) på produksjonsparametere, mineraler, total fettsyresammensetning og fettinnhold, relative nivåer og forhold mellom PL-klasser, fettsyresammensetning av fosfolipidklasser og relativt genuttrykk. Forskjellen ble ansett som signifikant ved $P < 0,05$. P-verdier ble inkludert og tolket som trender når de faller mellom 0,05 og 0,10. Disse statistiske analysene ble utført ved hjelp av programvaren SAS (SAS institute Inc., Cary, NC, 1989-2007).

Formler

$$\text{Kondisjonsfaktor (K-faktor)} = \frac{\text{Kroppsvekt (g)}}{\text{Lengde (cm)}^3} \times 100$$

$$\text{Spesifikk vekstrate (SGR)} = \left[\left(\frac{W_2}{W_1} \right)^{\frac{1}{d}} - 1 \right] \times 100$$

$$\text{Vekstfaktor (termisk vekstkoeffisient, TGC)} = \left(\frac{\sqrt[3]{W_2} - \sqrt[3]{W_1}}{T \times d} \right) \times 1000$$

W_2 er vekten på fisken ved slutten av forsøket (g)

W_1 er vekten på fisken i begynnelsen av forsøket (g)

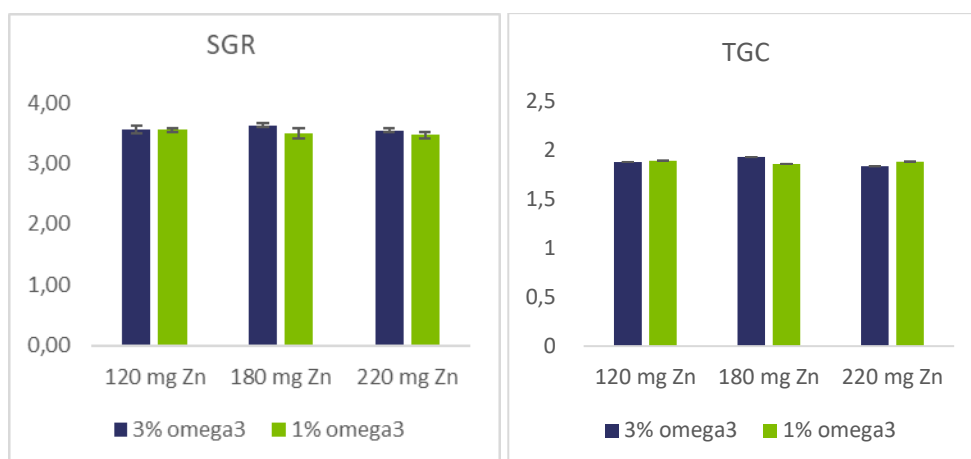
d er totalt antall dager

T er gjennomsnittstemperatur (°C)

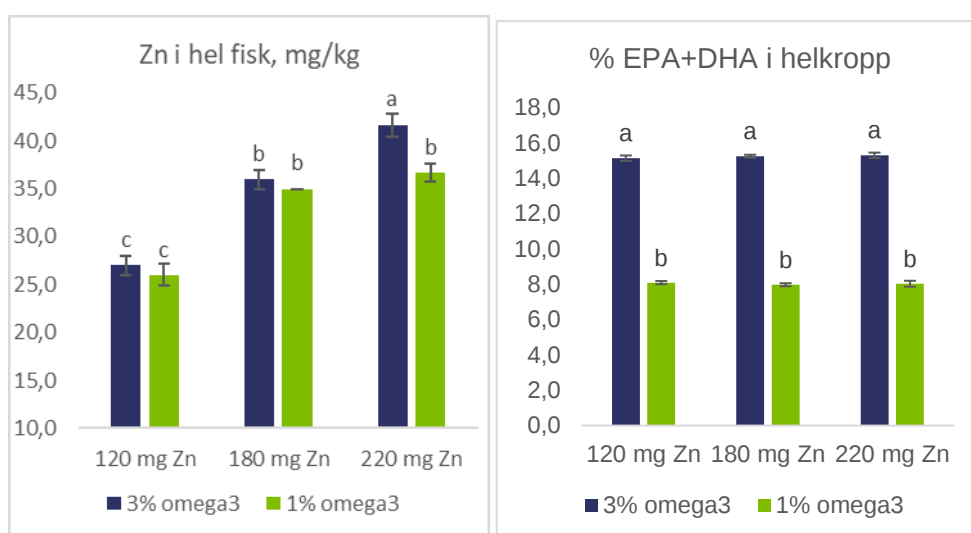
5.1.3 Resultat og diskusjon A1.3. Vekst, ytelse, kroppssammensetning, skinnhelse og barrierefunksjon

Tilvekst, Zn og fettsyresammensetning i helkropp og organer

De ulike diettene ga ingen statistisk signifikante forskjeller i SGR eller TGC (Figur 2). Sinkkonsentrasjoner i helkropp var som forventet direkte proporsjonale med sinknivåene i dietten (Figur 3). Tilsvarende gjenspeilet EPA- og DHA-nivåene i helkropp innholdet av disse fettsyrene i fôret (Figur 3). Fisk som ble fôret dietter med høyere EPA- og DHA-konsentrasjoner (3 %), viste følgelig høyere nivåer av disse fettsyrene i helkropp enn laks fôret 1 % EPA+DHA i fôret. Interessant nok ble det observert en synergistisk effekt mellom nivåene av EPA+DHA og sink i diettene på Zn nivået i helkropp. Dette ble særlig tydelig ved det høyeste EPA+DHA (3 %) og Zn 220 mg/kg i dietten. Samlet sett viser disse resultatene mulige interaksjonseffekter mellom nivåer av sink og omega-3-fettsyrer i dietten.

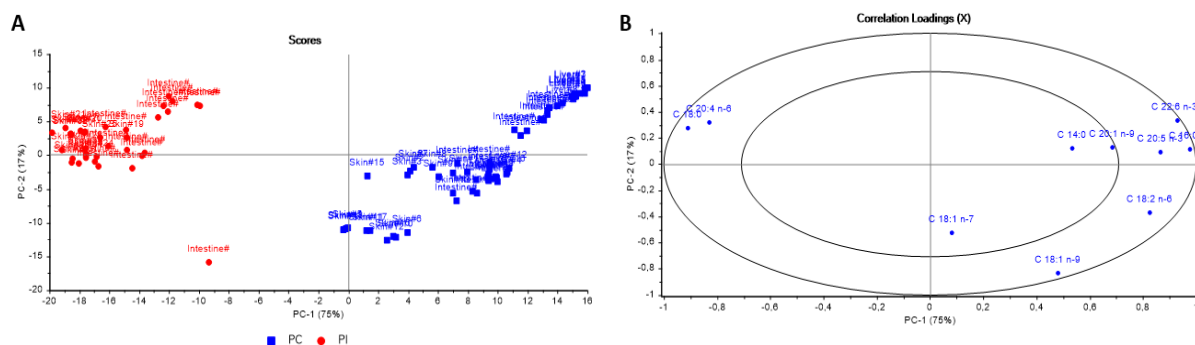


Figur 2 Effekter av sink (Zn) nivåer og omega-3 fettsyreinnhold i dietten på vekst (SGR) og (TGC). Data er vist som gjennomsnitt $\pm$ SEM (n=3). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom gjennomsnittsverdier bestemt ved bruk av enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test.



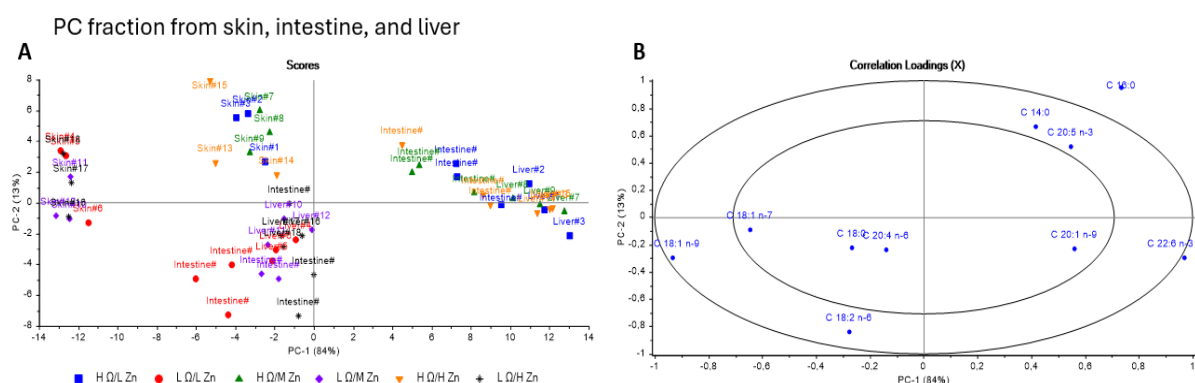
Figur 3 Effekter av sink (Zn) nivåer og omega-3 fettsyreinnhold i dietten på sinkkonsentrasjon i helkropp, og EPA+DHA sammensetning i helkropp. Data er vist som gjennomsnitt $\pm$ SEM (n=3). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom verdier bestemt ved bruk av enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test.

Figur 4 viser PCA analyse av forholdet mellom fettsyresammensetningen av fosfolipidfraksjonene phosphatidylcholine (PC) og phosphatidylinositol (PI) i vevene skinn, lever og tarm. Figuren viser at PI-fraksjonene fra alle tre vevene er sterkt korrelert med 18:0 og arakidonsyre (ARA), mens PC-fraksjonen av de analyserte vevene er sterkt korrelert med 18:1n-9, 18:2n-6, 16:0, EPA og DHA og dermed i stor grad påvirket av førsammensetningen.



Figur 4 «Scores» (B) Correlationsloadings» (A) som viser forholdene mellom fosfolipidfraksjoner (PC og PI) i vevene (skinn, lever og tarm) fra laks føret med de eksperimentelle diettene i 5 uker og fettsyresammensetningen. Disse plottene viser første hovedkomponent (PC1) mot andre hovedkomponent (PC2), som oppsummerer 92% av variasjonen mellom prøvene. Hver prøve stammer fra en sammenslått prøve av fem fisk. Fargene i scoreplottet representerer de forskjellige fosfolipidfraksjonene (fosfatidylkolin (PC) i blått, og fosfatidylinositol (PI) i rødt).

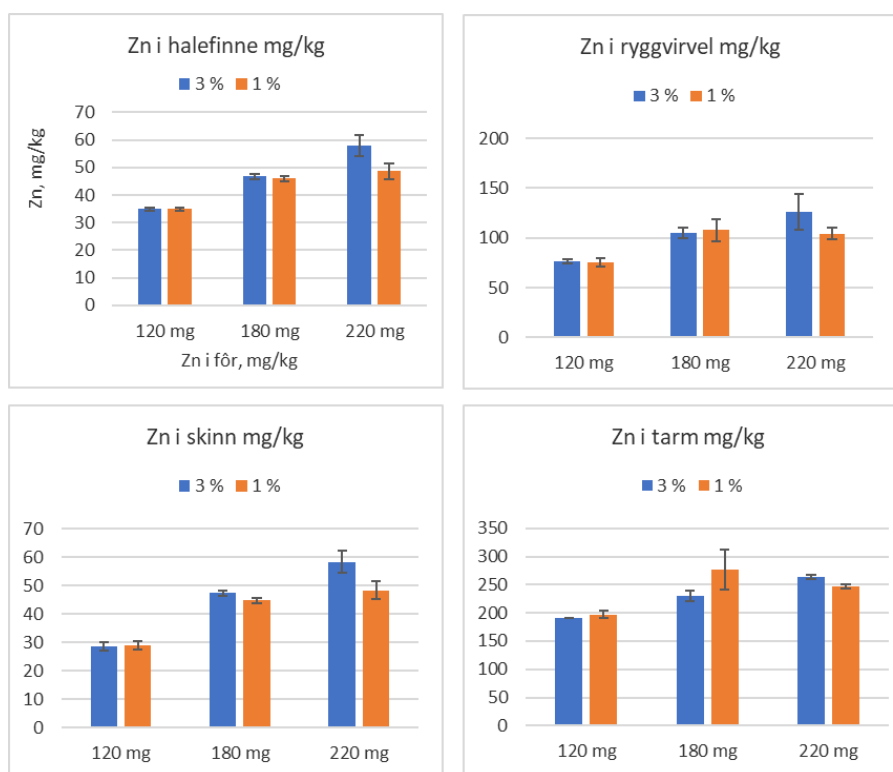
PCA analyse av PC fraksjonene fra lever, tarm og skinn, viser at fisk føret med dietter som inneholder høyt omega-3 er sterkt korrelert med 14:0, 16:0, EPA og DHA, spesielt i tarmen og leveren (Figur 5). Vev fra fisk føret med dietter med lavt omega-3 innhold er sterkt korrelert med 18:1n-9, spesielt i skinnet.



Figur 5 «Scores» (B) Correlationsloadings» (A) som viser forholdene mellom fosfatidylkolin (PC) fraksjonene i skinn, lever og tarm fra laks føret med de eksperimentelle diettene i 5 uker, og den totale fettsyresammensetningen i PC. Disse plottene viser første hovedkomponent (PC1) mot andre hovedkomponent (PC2), som oppsummerer 97% av variasjonen mellom prøvene. Hver prøve stammer fra en sammenslått prøve av fem fisk. Fargene i scoreplottet representerer de forskjellige diettene.

Effekt av føring på sinkinnhold i skinn, ryggfinne, ryggvirvel og tarm

Figur 6 viser at sinkkonsentrasjonene i halefinne, ryggvirvel, skinn og tarm gjenspeilet sinknivåene i dietten. I likhet med helkropp, ble det for vevene skinn og halefinne observert en interaksjonseffekt mellom diettnivåene av EPA+DHA og sink på sinknivået i vevene. Denne effekten var særlig fremtredende ved den høyeste kombinasjonen av EPA+DHA (3 %) og sink (220 mg/kg) i dietten (Tabell 3).



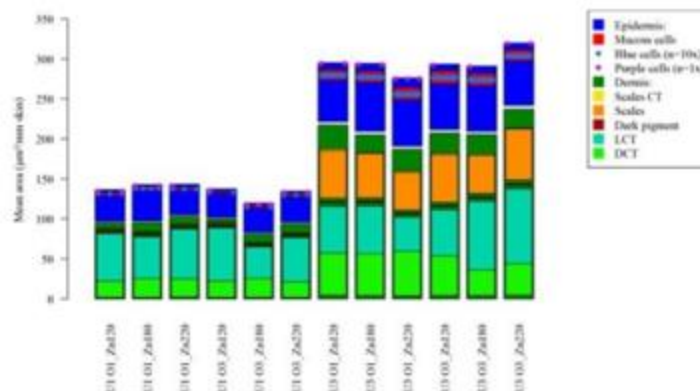
Figur 6 Effekter av sink (Zn) nivåer og omega-3 nivåer i dietten på sinkkonsentrasjoner i halefinne, ryggvirvel, skinn og tarm. Data er vist som gjennomsnitt $\pm$ SEM ($n=3$). Statistikk er vist i tabell 3 under.

Tabell 3 Statistisk analyse av av sink (Zn) nivåer og omega-3 ($\Omega 3$) fettsyrenivåer i dietten på sinkkonsentrasjoner i halefinne, ryggvirvel, skinn og tarm (viser til resultater i Figur 6 over). Statistikken (Anova) viser effekter av diett, omega-3 og Zn og samspill mellom disse.

	Enveis	Faktoriell 2x3				
	ANOVA					
	<i>p-verdi</i>	<i>p-verdi</i>	<i>p-verdi</i>	<i>p-verdi</i>	<i>p-verdi</i>	
		modell	Omega3	diettZn	samspill	
Halefinne	<,0001	<,0001	0,07	<,0001	0,08	Zn; 120<180<220
Ryggvirvel	0,02	0,02	0,43	0,003	0,39	Zn: 120<180=220
Skinn	<,0001	<,0001	0,04	<,0001	0,10	Omega3: 1<3, Zn: 120<180<220
Tarm	0,008	0,008	0,34	0,002	0,15	Zn:120<180=220

Modning av skinn fra start til avslutning av hovedforsøket

Det ble tatt ut 10 tilfeldig utvalgte prøvafisk per diettgruppe til histologisk analyse av skinn ved oppstart og ved avslutning av hovedforsøket ved 5 uker. Skinnhistologien ved 3 og 5 uker ble analysert i Aiforia®. Figur 7 viser en oversikt over alle resultater, men det var ingen signifikante forskjeller mellom diettgruppene. Det man kunne se var derimot at skinnen utviklet seg i løpet av forsøksperioden fra 3 til 5 uker, med økt tykkelse av bl.a epidermis (blå), dermis (grønn) og skjell ble dannet (oransje). Tabell 4 viser ingen signifikante forskjeller i innhold av mineralene Ca, P og Mg i skinnen til de ulike diettgruppene.



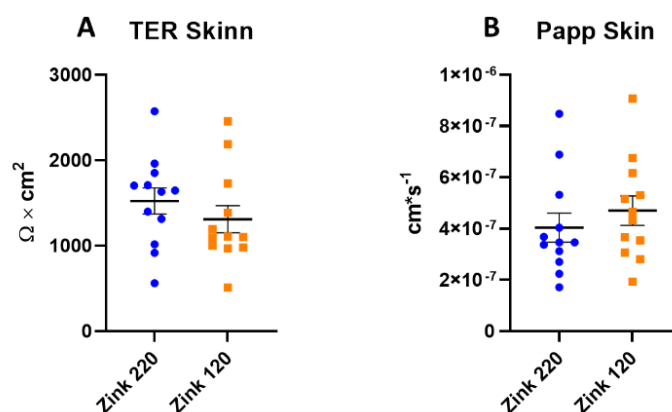
Figur 7 Morfologisk analyse av skinn fra fisk fra hovedforsøket, prøvene er analysert med Aiforia®. Prøvefiskene (10 skinnprøver per diettgruppe) ble benyttet til histologisk analyse av skinn ved oppstart av fôringsforsøket (5 g) og etter 5 ukers fôring (17 g, forsøksslutt). Figuren viser resultater fra de ulike diettgruppen ved start og slutt. Effekter av sink (Zn) nivåer og omega-3 (Ω3) fettsyreinnhold i dietten.

Tabell 4 Mineraler i skinn (P, Ca, Mg) til laks i de ulike diettgruppene ved avslutning av hovedforsøket. Dataene er oppgitt som gjennomsnitt per kar ± SEM. Statistikken (ANOVA) viser effekter av diett, omega-3 og Zn og samspill mellom disse.

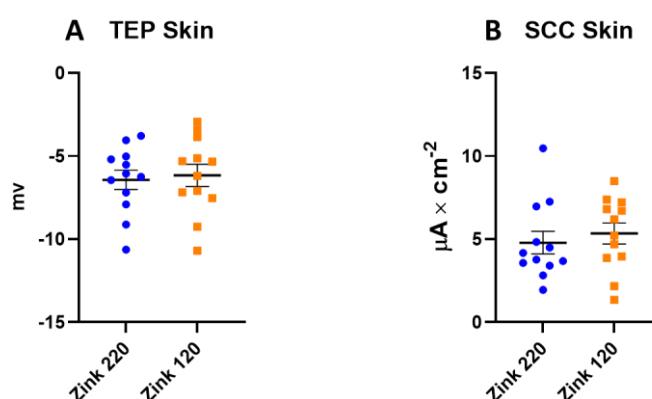
Skind												
Mg/Kg	H Ω/ L Zn	S.E.M	L Ω/ L Zn	S.E.M	H Ω/ M Zn	S.E.M	L Ω/ M Zn	S.E.M	H Ω/ H Zn	S.E.M	L Ω/ H Zn	S.E.M
P	7666,7	120,2	8033,3	405,5	8166,7	88,2	7733,3	185,6	7966,7	284,8	7400,0	57,7
Ca	11666,7	333,3	12666,7	881,9	13000,0	0,0	12000,0	0,0	12000,0	577,4	11333,3	333,3
Mg	353,3	3,3	363,3	8,8	363,3	3,3	353,3	6,7	360,0	15,3	340,0	10,0
STATISTIKK	p-verdi	p-verdi	p-verdi									
	omega3	diettZn	samspill									
P	0,27	0,51	0,12									
Ca	0,57	0,25	0,12									
Mg	0,38	0,57	0,27									

Skinnets barrierefunksjon analysert med Ussing kammer

Det var ingen signifikante forskjeller i skinnets barrierefunksjon målt som transepitel elektrisk motstand (TER) (Figur 8A) eller diffusjonshastighet for mannitol (Papp) (Figur 8B). Det var heller ingen forskjeller i ionetransport målt som TEP (Figur 9A) eller «short-circuit current», SCC (Figur 9B).



Figur 8 Skinnets barrierefunksjon målt som transepitelial elektrisk motstand (TER; A) og mannitol diffusjonshastighet (Papp; B) i diettgruppene med 3 % omega-3 /120Zn og 3 % omega-3 og 220 Zn.



Figur 9 Skinn transport funksjoner målt som “transepithelial potential difference” (TEP; A) og “short-circuit current” (SCC; B)

Tabell 5 viser signifikant samspillseffekt mellom omega-3-nivået og sink-nivået i dietten på prosentandelen av sphingomyelin (SM) i skinn hos laks. SM utgjør kun 1-2 % av de totale fosfolipidene i skinn, men forskning fra andre arter tyder på at SM har stor betydning for barrierefunksjonen. Forskning fra pattedyr antyder et komplekst forhold mellom omega-3-fettsyrer og sink i SM-metabolismen (Ueda et al., 2022, Berdyshev 2024). Omega-3-fettsyrer kan indirekte føre til nedbrytning av sphingomyelin og produksjonen av ceramid, mens sink er en essensiell kofaktor for enzymet som bryter ned SM til ceramid. Selv om mekanismene ikke er kartlagt i fisk, antyder humanstudiene nevnt over at sink og omega-3-fettsyrer samarbeider synergistisk for å opprettholde hudens barrierefunksjon gjennom deres innflytelse på SM syntese og sammensetning av SM i cellemembraner. Forskning viser at forstyrrelser i disse prosessene kan føre til en svekket hudbarriere, som manifesterer seg som økt transepidermalt vanntap, redusert lipidlagring i hudceller, og forhøyet risiko for hudlidelser som eksem og psoriasis i menneske. Disse funnene understreker betydningen av tilførsel av både sink og omega 3-fettsyrer for optimal hudhelse og -funksjon. I vårt forsøk med laks, observerte vi kun moderate forskjeller i SM-nivået i laksens skinn mellom de ulike diettgruppene. Sinkinnholdet i fôr hadde ingen signifikant effekt på barrierefunksjonen, slik illustrert i Figur 8–Figur 9. Analysen av hudbarrierefunksjonen ble begrenset til å vurdere sinkens effekt ved det høyeste omega-3-nivået. Basert på våre data kan vi ikke uttale oss om hvordan kombinasjonen av lavt sink- og lavt omega-3-nivå eventuelt ville påvirket barriereegenskapene.

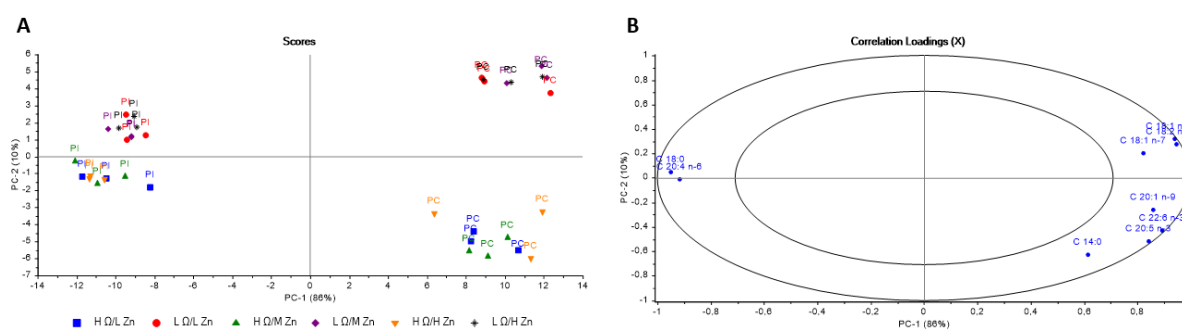
Tabell 5 viser økt prosentandel PI i gruppene fôret 3 % omega-3, noe som er i overensstemmelse med tidligere funn hvor EPA-tilskudd (eikosapentaensyre) i dietten er vist å føre til en økning i

fosfatidylinositol (PI) nivåer i cellemembraner, spesielt i hjernen til pattedyr (Chuck et al., 2022). Dette medførte også en signifikant dietteffekt på PC/PI ratioen.

Tabell 5 Prosentvis fordeling mellom de ulike fosfolipidklassene sphingomyelin (SM), fosfatidylcholine (PC), fosfatidylserine (PS), fosfatidylinositol (PI) fosfatidyletanolamine (PE) og ratioen mellom de ulike fosfolipidklassene i skinn i de ulike diettgruppene. Verdiene vises som gjennomsnittsverdier per diettgruppe (n=3) ± SEM med statistikk nederst i tabellen.

Prosentfordeling												
Skinn	H Ω/ L Zn	sem	L Ω/ L Zn	sem	H Ω/ M Zn	sem	L Ω/ M Zn	sem	H Ω/ H Zn	sem	L Ω/ H Zn	sem
SM	1,2	0,1	2,0	0,4	2,1	0,1	1,7	0,1	1,6	0,1	1,6	0,07
PC	62,0	1,6	59,7	3,0	58,6	1,0	61,3	1,9	59,8	0,3	59,0	0,44
PS	9,6	0,5	10,9	0,8	10,0	0,3	9,9	0,4	7,9	1,5	9,9	0,28
PI	3,1	0,3	2,4	0,1	3,2	0,4	2,6	0,1	3,3	0,4	2,5	0,29
PE	20,8	1,0	22,4	2,6	22,5	0,4	20,0	1,9	22,7	0,8	23,1	0,47
PA	3,2	0,6	3,5	0,5	3,6	0,2	4,6	0,9	4,8	1,9	4,0	0,20
PC_PE	3,0	0,2	2,8	0,4	2,6	0,1	3,1	0,4	2,6	0,1	2,6	0,07
PC_PS	6,5	0,5	5,6	0,6	5,9	0,3	6,2	0,4	8,3	2,0	5,9	0,19
PC_PI	20,2	1,6	26,8	1,2	19,0	2,5	24,1	1,9	19,0	2,5	24,3	2,96
PC_PA	21,1	4,8	17,8	3,2	16,3	0,9	14,3	2,3	16,3	4,7	15,0	0,82
PC_alle andre PL	1,6	0,1	1,5	0,2	1,4	0,1	1,6	0,1	1,5	0,0	1,4	0,03
STAT	p-verdi	p-verdi	p-verdi	p-verdi								
	modell	omega3	Diet Zn	samspill								
SM	0,06	0,6	0,22	0,02								
PC	0,67	0,93	0,68	0,33								
PS	0,22	0,12	0,21	0,42								
PI	0,26	0,02	0,89	0,97								
PE	0,62	0,87	0,51	0,37								
PA	0,8	0,83	0,55	0,63								
PC_PE	0,57	0,75	0,49	0,34								
PC_PS	0,35	0,21	0,4	0,34								
PC_PI	0,19	0,01	0,68	0,94								
PC_PA	0,72	0,42	0,38	0,95								
PC alle andre PL	0,61	0,99	0,56	0,32								

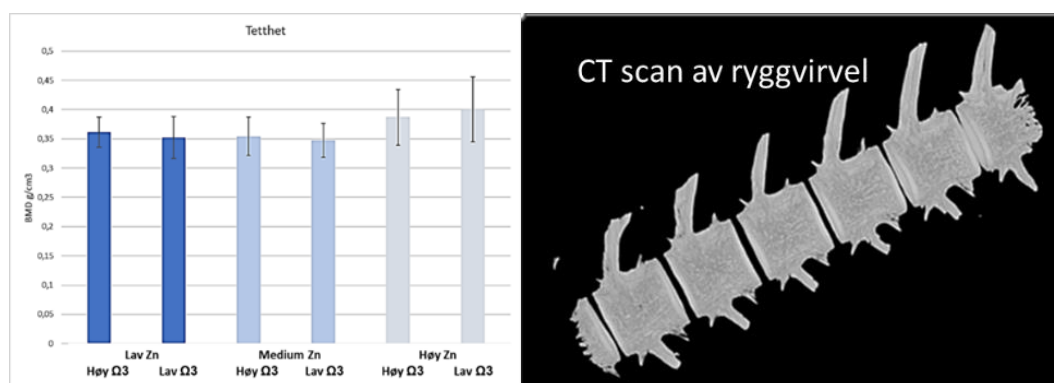
Figur 10 viser PCA analyse av hvordan førsammensetningen påvirker fettsyresammensetningen av fraksjonene PC og PI i skinn. SM fraksjonen fra skinn er ikke inkludert i figuren da vi ved vår GC analyse bare kunne påvise identiteten til ca. 60 % av fettsyrene i kromatogrammet, noe som antagelig skyldes at SM fraksjonen inneholder mange av de veldig lange fettsyrene, lenger enn 24 karbonatomer (fettsyrer som vi ikke har standarder for i GC analysen, og dette medfører at vi har 40-50 % ikke identifiserte fettsyrer i kromatogrammet). Figur 10 viser at PI-fraksjonen i skinn er korrelert med fettsyrene 18:0 og 20:4n-6, mens PC-fraksjonen er korrelert med høyere innhold av fettsyrene 18:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 14:0, 16:0, 20:1n-9, EPA og DHA. Prøver fra fisk føret med dietter som inneholder høyt omega-3 er sterkt korrelert med 14:0, 20:1n-9, EPA og DHA, spesielt i PC-fraksjonen. Prøver fra fisk føret med dietter med lavt n-3 innhold er sterkt korrelert med 18:1n-7, 18:2n-6 og 18:1n-9, spesielt i PC-fraksjonen.



Figur 10 «Scores» (A) og «Correlationsloadings» (B) som viser forholdet mellom fosfatidylkolin (PC) og fosfatidylinositol (PI) fraksjonen i skinnet fra laks føret med de eksperimentelle diettene i 5 uker og fettsyresammensetningen. Disse plottene viser første hovedkomponent (PC1) mot andre hovedkomponent (PC2), som oppsummerer 96 % av variasjonen mellom prøvene. Hver prøve stammer fra en sammenslått prøve av fem fisk. Fargene i scoreplottet representerer de forskjellige diettene.

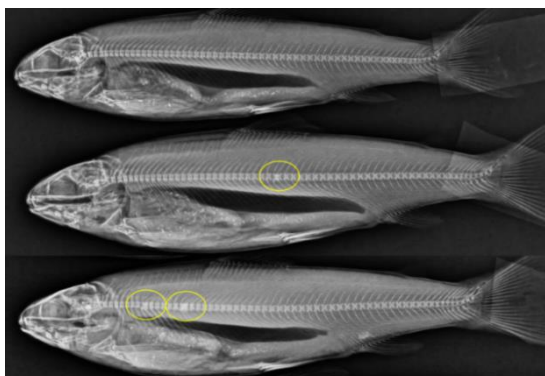
Bentetthet

I sluttuttaket fra hovedforsøket ble det utført en mikro-CT-scanning av ryggvirvler fra fisk i de ulike diettgruppene. Det var ingen signifikante forskjeller i bentetthet, men de to diettgruppene føret det høyeste Zn innholdet i dietten (220 mg/kg), HΩ/HZn og LΩ/HZn, hadde numerisk høyere benmineraltetthet enn diettgruppene føret 120 og 180 mg/kg Zn (Figur 11). Dette er i overensstemmelse med analysert høyere Zn nivåer i ryggvirvel til HZn gruppene (Figur 6).



Figur 11 Mikro-CT-skann av ryggvirvler fra fisk i hovedforsøket (10 ryggvirvler per diettgruppe). Figurene viser resultater for bentetthet i ryggvirvler hos de ulike diettgruppene. Effekter av sink (Zn)-nivåer og omega-3 (O3)-fettsyreinhold i dietten ved slutten av hovedforsøket er illustrert. Figuren til høyre viser et representativt eksempel bilde av CT-skann av en ryggvirvel.

Feil i rygggrad ble observert hos 6 % av fisken (Figur 12). De fleste feilene var små, men noen individer hadde mer omfattende feil (markert med gul sirkel). Dobbel så mange feil ble observert i diettgruppen føret ved 120 mg/kg sammenlignet med diettgruppene føret diett med 180 og 220 mg/kg Zn. Ingen forskjeller ble funnet i skjelettdeformiteter mellom 1 % og 3 % EPA+DHA diettgruppene.



Figur 12 Røntgen analyse ble utført på 360 fisk (60 fisk per diettgruppe) ved avslutning av fôringsforsøket

Tabell 6 viser at det var ingen signifikante forskjeller i P, Ca eller Mg i ryggraden til laks mellom de ulike diettgruppene, kun signifikant økt Zn som vist i Figur 7 over. Selv om det ikke var signifikant, så hadde diettgruppen fôret det høyeste nivået av både omega-3 fettsyrer og Zn (HΩ/HZn), numerisk de høyeste verdiene av både P og Ca.

Tabell 6 Mineraler i ryggrad (P, Ca, Mg (Zn er vist i separat figur)) til laks ved avslutning av hovedforsøket. Dataene er oppgitt som gjennomsnitt per kar $\pm$ SEM. Statistikken (ANOVA) viser effekter av diett, omega-3 og Zn og samspill mellom disse.

Ryggrad												
	H Ω/ L Zn	sem	L Ω/ L Zn	sem	H Ω/ M Zn	sem	L Ω/ M Zn	sem	H Ω/ H Zn	sem	L Ω/ H Zn	sem
P	13000,0	577,4	13000,0	0,0	13666,7	666,7	13000,0	577,4	14000,0	1732,1	13333,3	881,9
Ca	21666,7	881,9	22333,3	333,3	24000,0	1527,5	22333,3	1763,8	24000,0	4041,5	22666,7	1763,8
Mg	486,7	18,6	463,3	8,8	486,7	26,0	476,7	24,0	490,0	52,9	493,3	39,3
STAT	p-verdi	p-verdi	p-verdi									
	omega3	dietZn	sampill									
P	0,56	0,77	0,91									
Ca	0,65	0,79	0,83									
Mg	0,71	0,87	0,92									

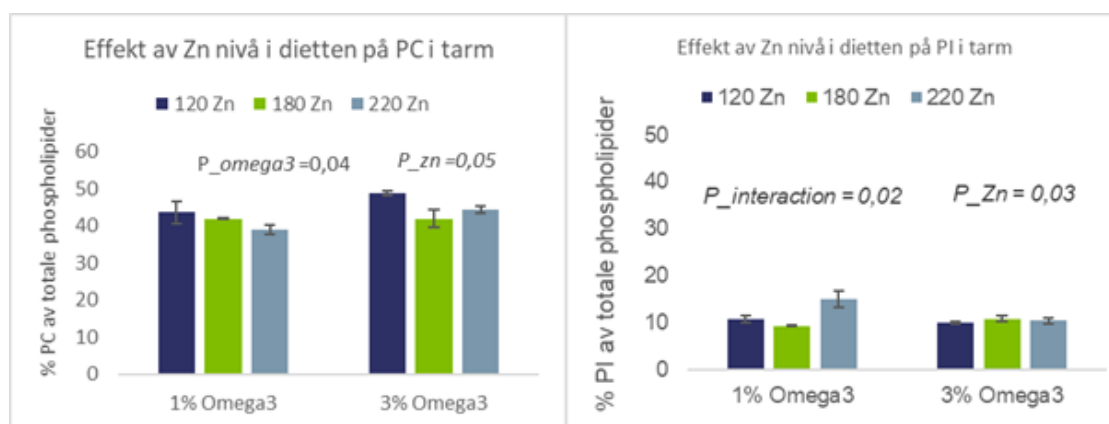
Lipider, mineraler og barrierefunksjon i tarm

Tabell 7 viser prosentvis fordeling av ulike fosfolipider i tarm. PC utgjør 40-50 % av totale fosfolipider, etterfulgt av PE på ca. 15 %. PI utgjør ca. 10 % av fosfolipidene. Tabellen viser at prosentandelen av PC var signifikant påvirket av både Zn nivået og av omega-3 fettsyrenivået i fôret.

Tabell 7 Prosentvis fordeling mellom de ulike fosfolipidklassene sphingomyelin (SM), fosfatidylcholine (PC), fosfatidylserine (PS), fosfatidylinositol (PI) fosfatidyletanolamine (PE) i tarm og ratioen mellom de ulike fosfolipidklassene i tarmen i de ulike diettgruppene. Verdiene vises som gjennomsnittsverdier per diettgruppe (n=3) $\pm$ SEM og statistikk i tabellen under.

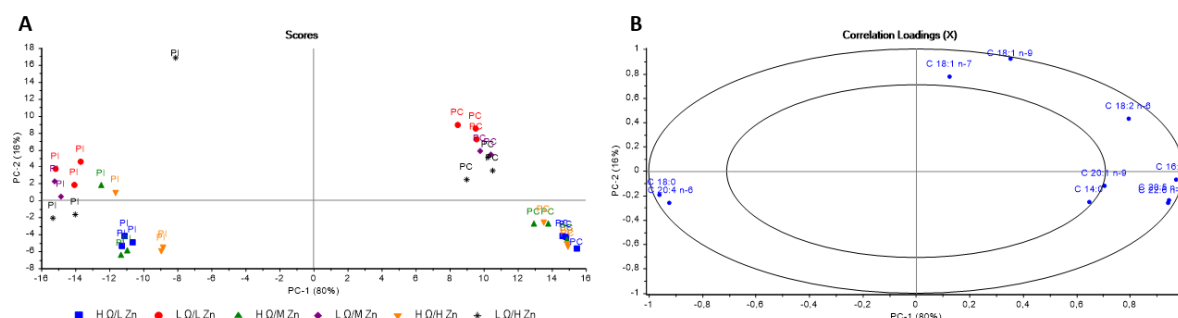
Tarm												
PL (%)	H Ω / L Zn	sem	L Ω / L Zn	sem	H Ω / M Zn	sem	L Ω / M Zn	sem	H Ω / H Zn	sem	L Ω / H Zn	sem
LPC+SM	7,2	0,3	8,2	0,8	9,2	0,3	8,4	0,0	8,5	0,3	9,7	1,2
PC	48,8	0,7	43,6	3,0	42,0	2,3	42,0	0,2	44,4	0,8	39,0	1,2
PS	8,9	0,1	10,0	0,8	10,4	0,2	10,9	2,3	9,8	0,3	10,7	0,0
PI	9,9	0,2	10,6	0,7	10,8	0,6	9,3	0,1	10,4	0,6	14,9	1,7
PE	13,2	0,1	14,7	0,3	14,7	0,8	15,6	1,6	14,1	0,7	15,7	1,4
PA	12,0	0,2	12,9	0,6	12,9	1,2	13,8	0,4	12,9	0,9	13,6	1,8
PC/PE	3,7	0,1	3,0	0,3	2,9	0,3	2,7	0,3	3,2	0,2	2,5	0,3
PC/PI	4,9	0,2	4,2	0,6	3,9	0,4	4,5	0,0	4,3	0,2	2,7	0,2
PC/PS	5,5	0,1	4,5	0,7	4,0	0,2	4,0	0,9	4,5	0,1	3,6	0,2
PC/alle andre PL	1,0	0,0	0,8	0,1	0,7	0,1	0,7	0,0	0,8	0,0	0,6	0,0
STATISTIKK	p-verdi	p-verdi	p-verdi	p-verdi								
	modell	omega3	Zn	samspill								
LPC+SM	0,23	0,45	0,13	0,36								
PC	0,04	0,04	0,05	0,32								
PS	0,5	0,2	0,29	0,93								
PI	0,01	0,12	0,03	0,02								
PE	0,43	0,1	0,4	0,94								
PA	0,88	0,37	0,67	0,99								
PC/PE	0,08	0,03	0,1	0,55								
PC/PI	0,01	0,06	0,03	0,04								
PC/PS	0,12	0,09	0,08	0,48								
PC/alle andre PL	0,03	0,03	0,04	0,33								

Figur 13 viser at prosentandelen av PC er høyere i diettgruppene fôret det laveste Zn nivået i dietten. Endringen er relativt moderat, men kan indikere at 120 mg/Zn i dietten er suboptimalt mhp å opprettholde tilstrekkelig PC syntese i tarmen. Vårt funn er i overensstemmelse med funn fra andre arter hvor sinkmangel er vist å kunne føre til en økning av PC i noen vev. Effektene av sinkmangel på PC-biosyntese varierer avhengig av organ. Det er antatt at sinkmangel påvirker PC-biosyntese gjennom flere mekanismer, inkludert endringer i enzymaktivitet i CDP-kolin og fospatidyletanolamin syntesen, induksjon av LPCAT1-uttrykk, og mulig hemming av fosfolipase A2-aktivitet. Studier fra andre arter har vist at disse endringene i PC-metabolisme på grunn av sinkmangel kan påvirke cellemembranens sammensetning og funksjon (Gomez et al. 2006).



Figur 13 Effekter av sink (Zn) nivåer og omega-3 nivåer i dietten på PC nivået i tarm til venstre og PI nivået til høyre. Data er vist som gjennomsnitt $\pm$ SEM ($n=3$). Statistikken (ANOVA) viser effekter av diett, omega-3 og Zn og samspill mellom disse.

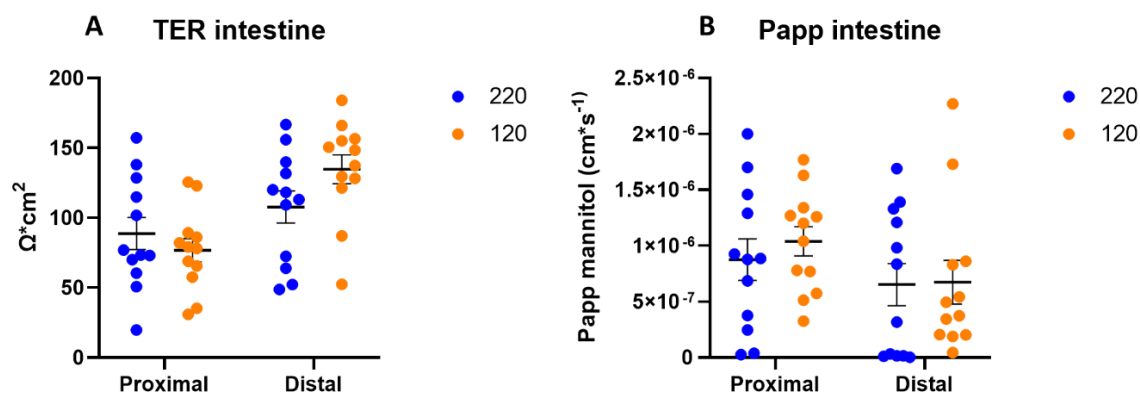
Figur 14 viser PCA analyse av fettsyresammensetningen av fosfolipidfraksjonene PC og PI i tarmen. Figuren viser at PI-fraksjonen er korrelert med fettsyrene 18:0 og 20:4n-6, mens PC-fraksjonen er korrelert med høyere innhold av 18:2n-6, 16:0, EPA og DHA. Prøver fra fisk som ble føret med dietter med høyt n-3 er sterkt korrelert med EPA og DHA, mens prøver fra fisk som ble føret med lavt n-3 dietter er sterkt korrelert med 18:1n-7 og 18:1n-9.



Figur 14 Score (A) og korrelasjonsloading (B) som viser forholdet mellom fosfatidylkolin (PC) og fosfatidylinositol (PI) fraksjonen i tarmen fra laks som ble føret med de eksperimentelle diettene i løpet av 5 uker, samt fettsyresammensetningen. Disse grafene viser første hovedkomponent (PC1) mot andre hovedkomponent (PC2), som oppsummerer 96 % av variasjonen mellom prøvene. Hver prøve stammer fra en samlet prøve av fem fisk. Fargene i poenggrafen representerer de forskjellige diettene.

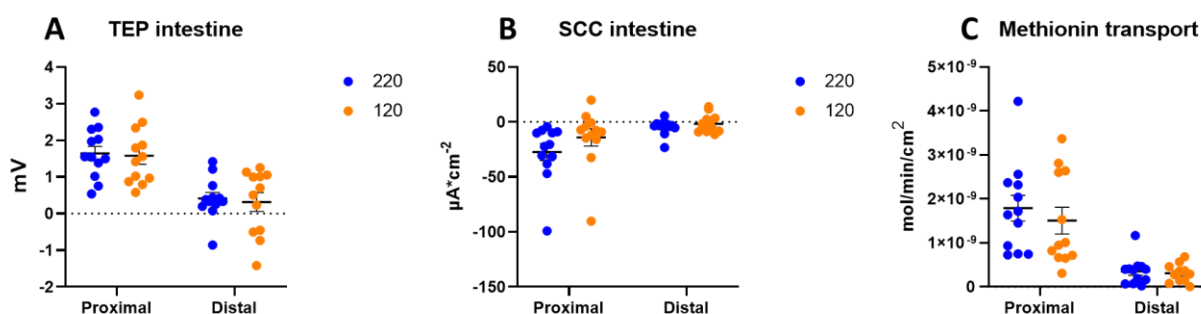
Effekt av Zn nivå i dietten på barrierefunksjonen i midttarm (proximal) og baktarm (distal), målt med Ussing kammer

Ingen signifikante effekter av sinknivåer ble observert på TER (Figur 15 A). Det var imidlertid en tendens til økt TER i den distale tarmen med lavere Zn nivåer i føret ($p < 0,1$). Ingen signifikante effekter ble observert for Papp for mannitol.



Figur 15 Tarmens barrierefunksjon målt som transepitelial elektrisk motstand (TER; A) og diffusjonshastighet for mannitol (Papp; B).

TEP var lavere i den distale tarmen sammenlignet med den proksimale tarmen ($p < 0,05$), men ingen effekter av sinknivåer ble observert (Figur 16 A). Ingen forskjeller i SCC ble observert i noen tarmregion (Figur 16 B). Transport av methionin var høyere i den proksimale tarmen, men det var ingen effekter av sinknivå på denne transporten (Figur 16 C).



Figur 16 Tarm transport i proximal og distal tarm målt som "transepithelial potential difference" (TEP; A), short-circuit current (SCC; B) og L-methionin transport (C).

Som oppsummering viser figurene over at det høyeste sinknivået i dietten hadde en tendens til å redusere permeabiliteten for ioner i den distale tarmen. Forklaringen på lavere i TER i Zn 220 gruppen enn i Zn 120 gruppen kan skyldes en redusert evne hos «tight junctions» (TJs) til å opprettholde forskjellen i ionekonsentrasjonen mellom tarmlumen og blodet.

Informasjonstekst

Tette celleforbindelser, kjent som "tight junctions" (TJ) på engelsk, er spesialiserte proteinkomplekser som finnes mellom epitelceller og endotelceller og har følgende funksjoner;

- Forsegle det paracellulære rommet, som er området mellom naboceller. Dette hindrer ukontrollert lekkasje av vannløselige stoffer.
- De danner en tilnærmet ugjennomtrengelig barriere for passasje av stoffer i spaltene mellom cellene. Dette er spesielt viktig i organer som tarm og blod-hjerne-barrieren.
- De muliggjør regulert passasje av spesifikke ioner og vann gjennom paracellulære kanaler. Dette bestemmes av ulike typer claudin-proteiner i strukturen.
- De bidrar til å opprettholde cellulær polaritet ved å forhindre at membranproteiner beveger seg fritt mellom den apikale og basolaterale delen av cellemembranen.
- De er med på å gi mekanisk styrke til vevet ved å knytte naboceller tett sammen.

Tette celleforbindelser er særlig viktige i epitelceller, som for eksempel i tarmene, nyrene og blod-hjerne-barrieren, hvor de spiller en avgjørende rolle i å kontrollere transporten av stoffer mellom ulike kroppsvæsker og vev.

Mekanismen bak endringen i TER kan innebære en endring i uttrykket av proteiner assosiert med TJ, hvor claudiner er hovedbestemmende for cellulær permeabilitet (Sundell og Sundh, 2012). Generelt anses redusert TER som negativt for tarmfunksjonene (Sundh og Sundell, 2015). Imidlertid ble det ikke observert andre endringer som følge av sinknivåene.

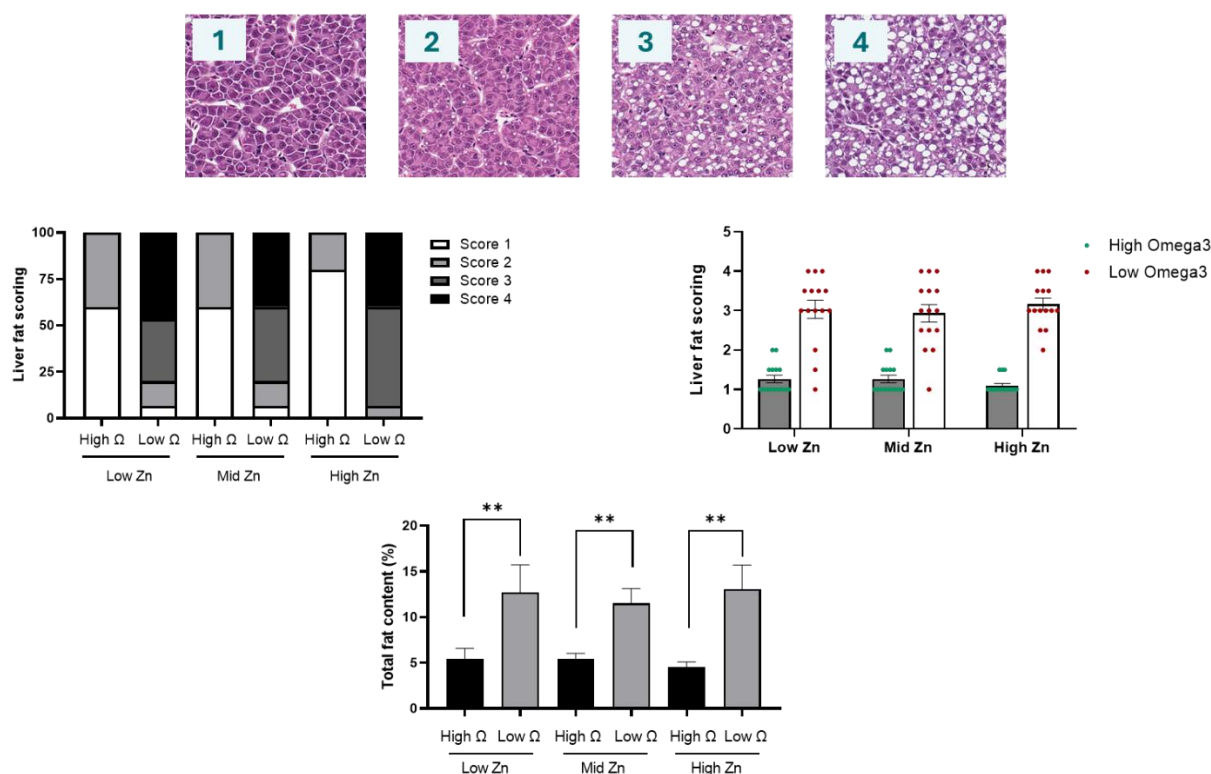
Vi analyserte kun fettsyresammensetningen av fosfolipider i midttarmen og ikke baktarmen, og det samme gjelder for sinkinnholdet. Tidligere studier indikerer at det er lavere innhold av flerumettede fettsyrer i baktarmen sammenlignet med midttarmen hos laks. Dette kan muligens forklare de manglende effektene på barrierefunksjonen i den proksimale tarmen, samt indikasjoner på effekter i den distale tarmen (Sundell et al., 2022).

Tidligere studier fra andre arter har vist at sinkmangel klart svekker tarmbarrieren (Wang et al., 2013), mens moderat økning av sinkinntak styrker TER og barrierefunksjon. Høye doser kan imidlertid indusere selektive endringer i TJ som påvirker permeabiliteten for molekyler, noe som viser behovet for balansert sinktilførsel for optimal barrierefunksjon i tarm (Ohashi et al., 2019).

Effekter av omega-3 fettsyrer og Zn i dietten på lipidsammensetning, genuttrykk og morfologi av lever

Histologisk evaluering av forekomst av lipiddråper (størrelse og antall) i leveren til fisk fra de ulike diettgruppene viste lavere score hos fisk føret med de høyeste nivåene av EPA og DHA (Figur 17). Denne effekten syntes å være mer uttalt hos fisk som fikk dietten med 220 mg/kg sink, selv om forskjellen ikke var statistisk signifikant. Kjemisk analyse av totalt fettinnhold i lever samsvarte med de histologiske observasjonene. Fisk føret med dietter med høyt EPA- og DHA-innhold viste betydelig lavere fettinnhold sammenlignet med fisk føret med dietter med lavt EPA- og DHA-innhold. Denne effekten var særlig tydelig hos fisk som fikk fôr med høyt sinkinnhold, hvor kontrasten mellom høy og lav omega-3-behandling viste en sterkere tendens. Våre funn samsvarer med tidligere observasjoner fra laks, hvor økende nivåer av fiskeolje i fôret og lavere nivåer av planteolje, fører til færre fettdråper og fettinnhold i lever (Ruyter et al., 2006, Sissener et al., 2017 og Sanden et al., 2016). En studie med

Yellow catfish, viste at sinktilførsel i dietten kan redusere fettavleiringer i leveren ved å fremme nedbrytning av fett, hemme nysyntesen av fettsyrer og øke forbrenningen av fett via aktivering av PPAR α (Jia-Lang Zheng et al., 2015). Ved sinkmangel ble det observert økt fettinnhold i lever og muskel, mens sinkoverskudd reduserte derimot fettinnholdet signifikant i både muskel og lever.



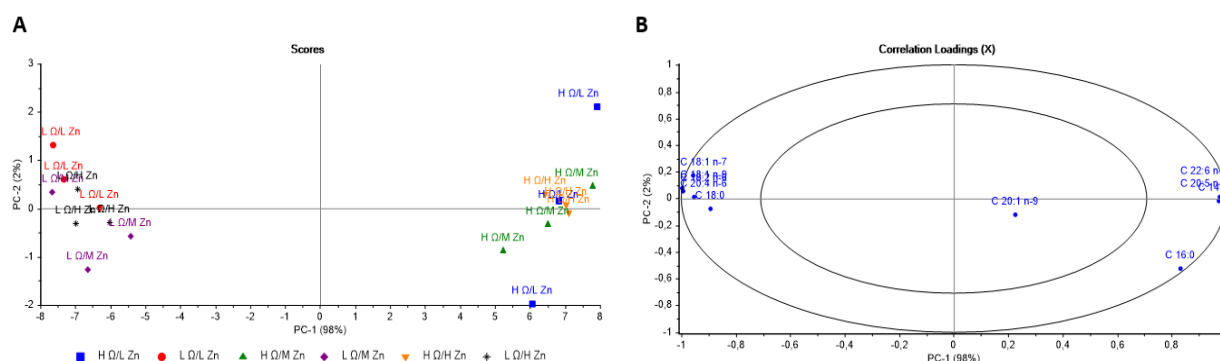
Figur 17 Histologisk analyse og scoring av fettinnhold i leverprøver. Panel 1–4 viser representative bilder som illustrerer økende fettinfiltrasjon og vakuolisering (1 lavere til 4 høyere antall lipidvakuoler). Histologisk scoring indikerer signifikante forskjeller mellom behandlingene, der høyere score gjenspeiler mer alvorlig fettavleiring. Søylediagrammene viser kvantitativt fettinnhold og gradering av scoringen fra histologiske snitt. Data er vist som gjennomsnitt $\pm$ SEM ($n=3$). Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom verdier bestemt ved hjelp av enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test.

Tabell 8 viser ingen signifikante effekter av føret på relativ fordeling av fosfolipider i lever. PC utgjør ca. 60 % av de totale PL, etterfulgt av PE med ca. 20 % og PS på ca. 10 %.

Tabell 8 Prosentvis fordeling mellom de ulike fosfolipidklassene sphingomyelin (SM), fosfatidylcholine (PC), fosfatidylserine (PS), fosfatidylinositol (PI) fosfatidyletanolamine (PE) og ratioen mellom de ulike fosfolipidklassene i lever i de ulike diettgruppene. Verdiene vises som gjennomsnittsverdier per diettgruppe (n=3) og standard error of mean (sem) og statistikk i tabellen under.

Lever												
PL%	H Ω/ L Zn	sem	L Ω/ L Zn	sem	H Ω/ MZn	sem	L Ω/ M Zn	sem	H Ω/ H Zn	sem	L Ω/ H Zn	sem
SM	1,2	0,1	2,0	0,4	2,1	0,1	1,7	0,1	1,6	0,1	1,6	0,1
PC	62,0	1,6	59,7	3,0	58,6	1,0	61,3	1,9	59,8	0,3	59,0	0,4
PS	9,6	0,5	10,9	0,8	10,0	0,3	9,9	0,4	7,9	1,5	9,9	0,3
PI	3,1	0,3	2,4	0,1	3,2	0,4	2,6	0,1	3,3	0,4	2,5	0,3
PE	20,8	1,0	22,4	2,6	22,5	0,4	20,0	1,9	22,7	0,8	23,1	0,5
PA	3,2	0,6	3,5	0,5	3,6	0,2	4,6	0,9	4,8	1,9	4,0	0,2
PC_PE	3,0	0,2	2,8	0,4	2,6	0,1	3,1	0,4	2,6	0,1	2,6	0,1
PC_PS	6,5	0,5	5,6	0,6	5,9	0,3	6,2	0,4	8,3	2,0	5,9	0,2
PC_PI	20,2	1,6	26,8	1,2	19,0	2,5	24,1	1,9	19,0	2,5	24,3	3,0
PC_PA	21,1	4,8	17,8	3,2	16,3	0,9	14,3	2,3	16,3	4,7	15,0	0,8
PC/alle andrePL	1,6	0,1	1,5	0,2	1,4	0,1	1,6	0,1	1,5	0,0	1,4	0,0
STAT	p-verdi modell	p-verdi omega3	p-verdi DiettZn	p-verdi samspill								
SM	0,06	0,6	0,22	0,02								
PC	0,67	0,93	0,68	0,33								
PS	0,22	0,12	0,21	0,42								
PI	0,26	0,02	0,89	0,97								
PE	0,62	0,87	0,51	0,37								
PA	0,8	0,83	0,55	0,63								
PC_PE	0,57	0,75	0,49	0,34								
PC_PS	0,35	0,21	0,4	0,34								
PC_PI	0,19	0,01	0,68	0,94								
PC_PA	0,72	0,42	0,38	0,95								
PC/alle andre PL	0,61	0,99	0,56	0,32								

PC-fraksjonen i leveren ble analysert ved hjelp av prinsipalkomponentanalyse (PCA) (Figur 18). Resultatet viser at fettsyresammensetningen til PC i leveren fra fisk føret med dietter med høyt innhold av omega-3-fettsyrer er sterkt korrelert med 14:0, 16:0, EPA og DHA. På den annen side er prøver fra fisk som ble føret med dietter med lavt omega-3-innhold sterkt korrelert med 18:1n-7, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:0 og 20:4n-6.



Figur 18 «Scores» (A) og «Correlationsloadings» (B) som viser forholdet mellom fosfatidylkolin (PC) fraksjonen i leveren fra laks som ble fôret med de eksperimentelle diettene i løpet av 5 uker, samt fettsyresammensetningen. Disse grafene viser første hovedkomponent (PC1) mot andre hovedkomponent (PC2), som oppsummerer 100 % av variasjonen mellom prøvene. Hver prøve stammer fra en samlet prøve av fem fisk. Fargene i poenggrafen representerer de forskjellige diettene.

Transkriptomanalyse lever

RNA-sekvensering av lever avslørte at EPA- og DHA-nivåene i fôret var de primære faktorene som påvirket forskjeller i antall differensielt uttrykte gener (DEG), mens sinkinnholdet i dietten modulerte effektene styrke. Den mest markante responsen ble observert ved lavt sinkinnhold, hvor sammenligningen mellom høyt og lavt omega-3-nivå resulterte i 465 DEG. Antallet DEG ble betydelig redusert ved middels og høyt sinkinnhold, og genprofilen endret seg fra overveiende nedregulert ved lavt sinkinnhold til en mer balansert profil ved høyt sinkinnhold. Dette tyder på at sinkstatus påvirker hvordan celler responderer på omega-3-fettsyrer, muligens som en kompensatorisk mekanisme under sinkmangel (uttrykk av flere gener relatert til fettsyremetabolisme var påvirket), og understreker sinkens rolle i å modulere cellulære prosesser knyttet til omega-3-metabolisme i lever.

Tabell 9 Transkriptomanalyse. RNA-sekvensering av levervev viser differensielt uttrykte gener (DEG) når man sammenligner lav omega-3-diettgrupper med tre sinknivåer, 120, 180 og 220 mg/kg (LQ3/LZn, LQ3/MZn, LQ3/HZn) mot diettgruppen med høy omega-3 og lav sink (HQ3/LZn). Tabellen oppsummerer antallet oppregulerte og nedregulerte gener for hver parvis sammenligning. Kolonnen til høyre viser det totale antallet differensielt uttrykte gener (DEG).

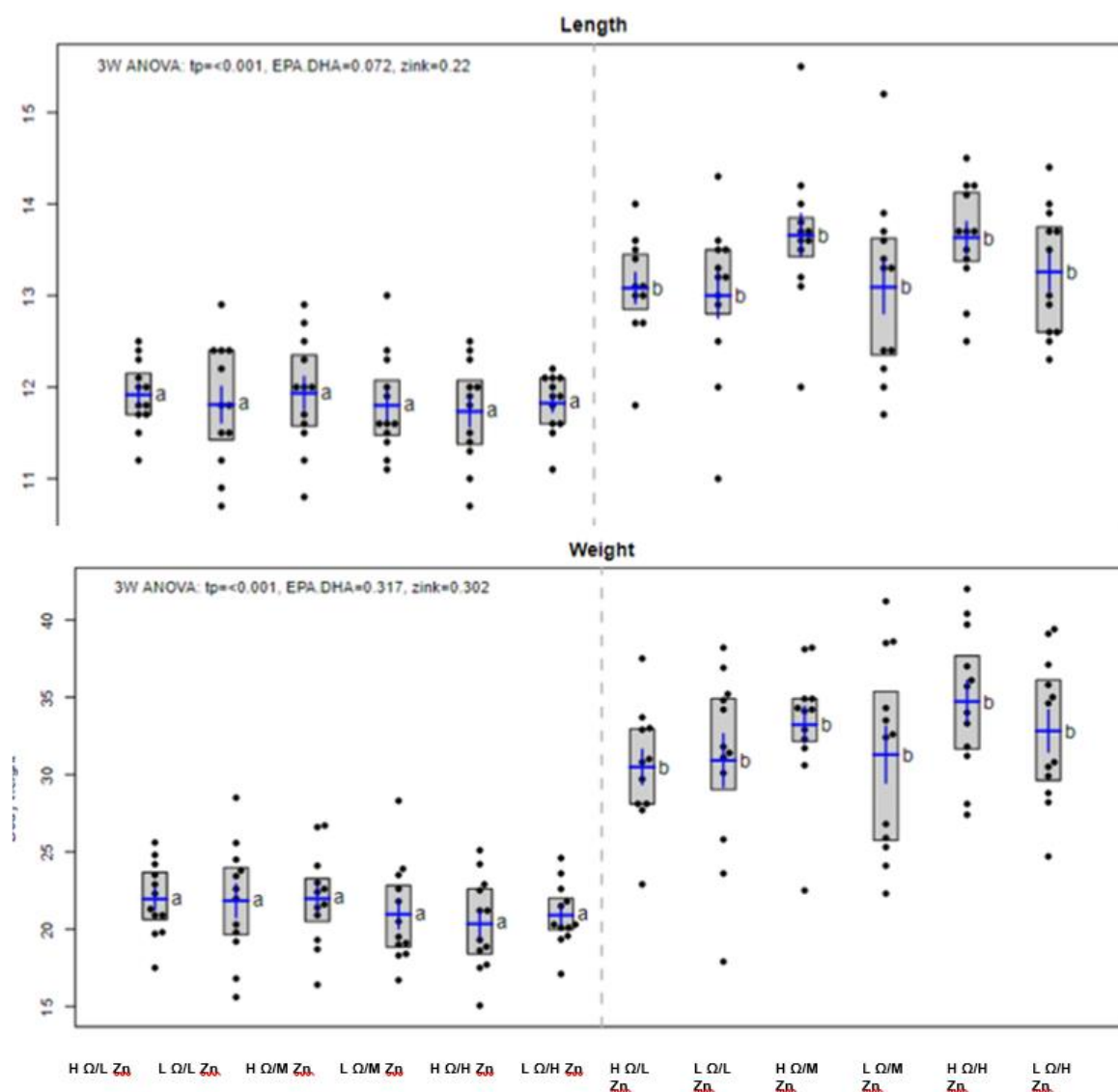
Diettgruppe		Diettgruppe	Nedregulert	Oppregulert	Totale
LQ3/LZn	vs	HQ3/LZn	327	138	465
LQ3/MZn	vs	HQ3/LZn	48	73	121
LQ3/HZn	vs	HQ3/LZn	27	41	68

Oppsummerende diskusjon lever: Samlet sett viser dataene at det høyeste nivået av EPA og DHA i dietten, spesielt i kombinasjon med høyt sinkinnhold, reduserte fettinnholdet i leveren til fisk. Dette samsvarer med tidligere studier som viser at fiskeolje i fôret kan føre til færre fettdråper og lavere fettinnhold i leveren (Ruyter et al., 2006, Sissener et al., 2017 og Sanden et al., 2016). Dataene tyder videre på at sink spiller en viktig rolle i å modulere cellulære prosesser knyttet til fettdeponering og omega-3-metabolisme i leveren til laks, som tidligere observert i Yellow catfish (Jia-Lang Zheng et al., 2015).

5.1.4 Resultat og diskusjon sårhelingsforsøk

Vekt og skinnkvalitet til laks i sårhelingsforsøk

Fiskestørrelse og vekst har vist seg å påvirke modningen av skinn og skjell (Torrissen et al., 2023). Figur 19 viser at det ikke var signifikante forskjeller i fiskestørrelse mellom prøvefisk i de ulike diettgruppene, verken ved oppstart av forsøket (2 uker etter avslutning av hovedforsøket, ca. 22 g) eller ved avslutning av sårhelingsforsøket (6 uker, ca. 33 g).



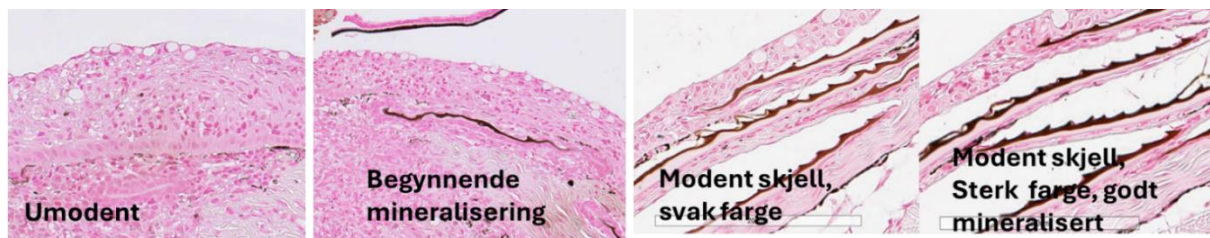
Figur 19 Vekt og lengde til prøvefisk (12 per diettgruppe) benyttet til sårhelingsforsøk ved start og ved 6 uker. Data er vist som gjennomsnitt for de ulike diettgruppene. Ulike bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom verdier bestemt ved bruk av enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys post hoc-test.

Ved oppstart av sårforsøket ble histologiske snitt av lakseskinn farget med Von Kossa-metoden for visualisering av kalsiumavleiringer. Mineraliserte områder ble kvantifisert ved hjelp av en nyutviklet algoritme i Aiforia®-plattformen, spesialdesignet for automatisk analyse av histologiske mønstre (Figur 20). I tillegg ble et manuelt scoringssystem basert på morfologiske parametere (form, størrelse og fargeintensitet) brukt for å vurdere skjellenes modningsgrad (Figur 21).

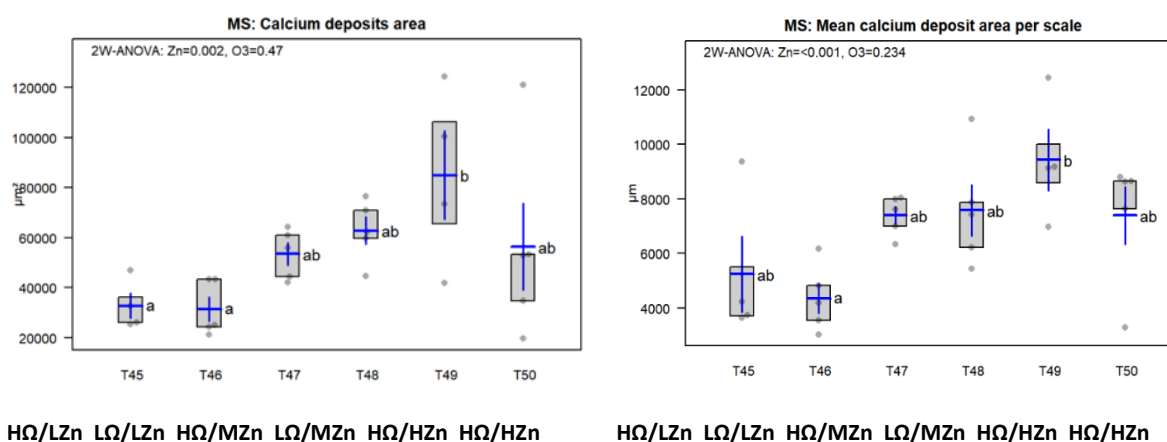
Aiforia®-analysene demonstrerte en signifikant høyere mineraliseringsgrad ($p < 0,05$) i skjell fra diettgruppen med høy omega-3/høy sink (HΩ/HZn) sammenlignet med gruppen lav omega-3/lav sink

(L Ω /LZn) (Figurene 20-21). Dette korrelerte med tidligere ICP-MS-analyser av sinknivåer i skinn (Figur 6), noe som underbygger metodens validitet. Den manuelle scoringen bekreftet også at H Ω /HZn-gruppen hadde mer modne skjellstrukturer med større uniformitet i både form og fargeintensitet (Figur 22).

Kombinasjonen av avansert bildeanalyse med Aiforia®s AI-teknologi og manuelle morfologiske vurderinger og ICP-MS-analyser av sinknivåer i skinn, viser at diettsammensetningen har en direkte effekt på skjellmineralisering og modningsprosesser i skinnen hos laks.

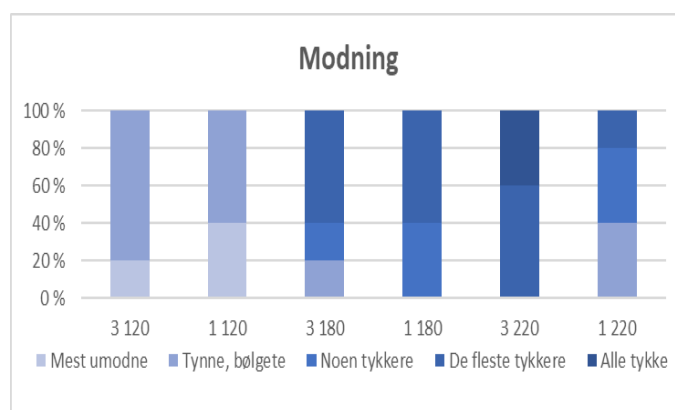


Figur 20 Mikroskopibilder av histologiske snitt fra lakseskinn farget med Von Kossa-metoden, som visualiserer mineraliserte områder gjennom brunfarging av anioner (typisk fosfat eller karbonat) assosiert med kalsiumavleiringer. Tidlig stadium (umodent skjell): Små lineære strukturer med svak fargeintensitet. Mellomfase (begynnende mineralisering): Forlengede bølgede mineraliseringsmønstre. Modent skjell: Komplekse, organisert strukturer med intens brunfarging, jo sterkere brunfarge, jo mer mineralisert.



Figur 21 Resultatene fra en automatisert bildeanalyse av histologiske snitt fra lakseskjell, utført ved hjelp av en spesialutviklet algoritme i Aiforia®-plattformen. Analysen ble gjennomført ved oppstart av sårhelingsforsøket (uke 2) for de ulike diettgruppene. To hovedparametere ble kvantifisert; totalt areal av kalsiumavleiringer per skjellsnitt og gjennomsnittlig størrelse på kalsiumavleiringer per skjell.

De manuelle scoringer for modning av skjell er vist i Figur 22. Prøvene fra fisk i de to diettgruppene med lavest sink, H Ω /LZn og L Ω /LZn, kom dårligst ut, med minst modne skjell. Gruppen føret høy omega-3 og høy sink, H Ω /HZn, kom best ut med mest modne skjell, i overensstemmelse med resultat fra AI-algoritmen.



Figur 22 Modning av skjell, scoret på von kossa fargete snitt., 3 120= H Ω/L Zn, 1 120= L Ω/L Zn, 3 180= H Ω/M Zn, 1 180= L Ω/M, 3 220= H Ω/H Zn og 1 220= L Ω/H Zn.

5.1.5 Oppsummering av hovedfunn AP 1.3, samspill Zn og omega-3 fettsyrer

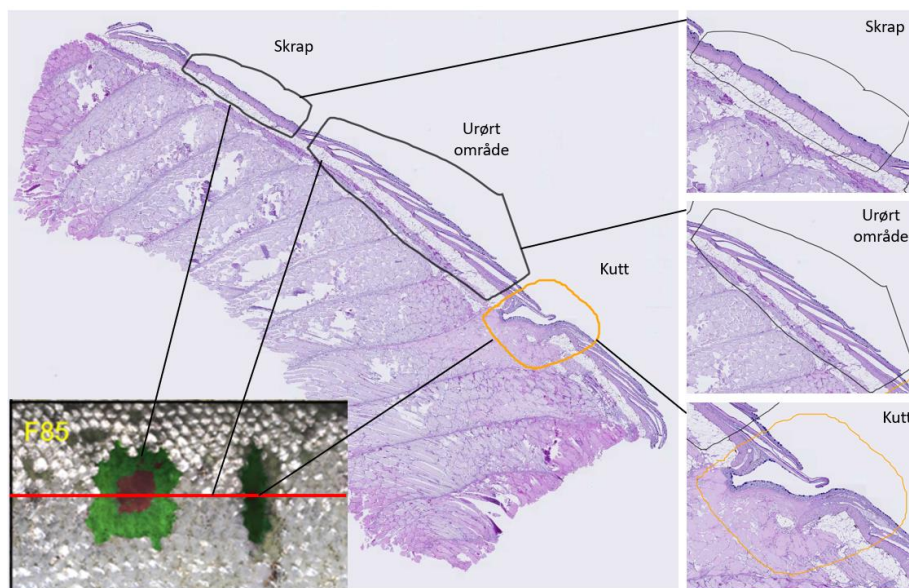
- Ulike nivåer av omega-3 fettsyrer og sink i diettene ga ingen statistisk signifikante forskjeller i SGR eller TGC.
- Sinkkonsentrasjoner i helkropp, halefinne, ryggvirvel, skinn og tarm var i relativ stor grad proporsjonale med sinknivåene i dietten.
- En interaksjonseffekt mellom nivåene av EPA+DHA og sink i diettene på Zn-nivåene i vev ble observert, spesielt ved det høyeste EPA+DHA (3 %) og Zn (220 mg/kg). Fisk føret de høyeste nivåene av EPA og DHA og Zn, viste også best bentetthet.
- EPA- og DHA-nivåene i helkropp, skinn og tarm gjenspeilet innholdet av disse fettsyrene i føret. Fisk føret med dietter med høyt omega-3 innhold viste sterk korrelasjon med 14:0, 16:0, EPA og DHA, spesielt i tarmen og leveren. Vev fra fisk føret med dietter med lavt omega-3 innhold var sterkt korrelert med 18:1n-9, spesielt i skinnen.
- PCA-analyse av fettsyresammensetningen av fosfolipidfraksjonene phosphatidylcholine (PC) og phosphatidylinositol (PI) i skinn, lever og tarm viste at PI-fraksjonene fra alle tre vevene var sterkt korrelert med 18:0 og arakidonsyre (ARA). PC-fraksjonene var sterkt korrelert med 18:1n-9, 18:2n-6, 16:0, EPA og DHA.
- Analyse av modningsgrad av skjell i skinnen, viste at fisk i de to diettgruppene føret lavest sink (HΩ/LZn og LΩ/LZn) hadde lavest grad av modne skjell, mens gruppen føret med høy omega-3 og høy sink (HΩ/HZn) hadde mest modne skjell ved avslutning av hovedforsøket.
- Leveranalyser viste at det høyeste nivået av EPA og DHA i dietten, spesielt i kombinasjon med høyt sinkinnhold, reduserte fettinnholdet i leveren til fisk.
- Analyse av barrierefunksjonen til hud og tarm viste ingen signifikante dietteffekter på huden. I den distale tarmen hadde det høyeste sinknivået i dietten en tendens til å redusere permeabiliteten for ioner, og lavere trans-epitelial resistens (TER) ble observert i Zn 220-gruppen sammenlignet med Zn 120-gruppen.
- Generelt anses redusert TER som negativt for tarmfunksjonene. Imidlertid ble det ikke observert andre endringer som følge av sinknivåene.

Sårhelingsforsøk

To ulike sårtyper ble eksperimentelt påført skinnen hos forsøksfisk fra alle 6 diettgruppene to dager etter avslutning av hovedforsøket (Figur 23). Disse inkluderte et dypt sår utført med skalpell gjennom full tykkelse av dermis, samt et overfladisk sår skapt ved mekanisk skraping med børste for å fjerne skjellene. Tre anatomiske regioner ble analysert: sårsonen etter skalpellinngrep, intakt hud mellom sårene (kontrollområde), og skrapet hudregion med skjellfjernelse.

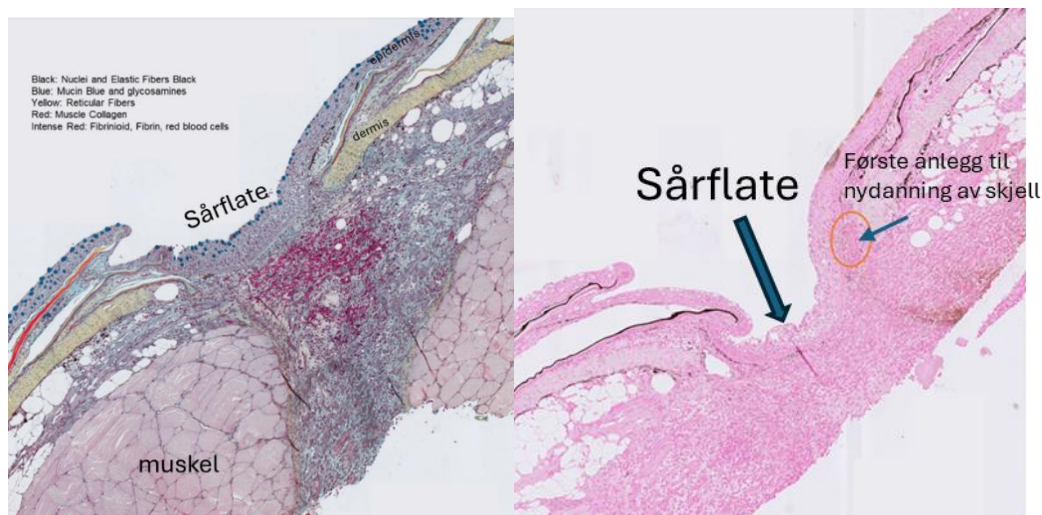
Bildeanalyse viste at begge sårtypene ble fullstendig lukket innen 6 uker i alle diettgruppene. Det ble imidlertid ikke funnet noen signifikante forskjeller i helingshastighet (lukking av sår) mellom diettgruppene for noen av sårtypene.

Mikroskopibilder av de tre AB-PAS-fargede skinnområdene (sårområde, intakt hud og skrap region) ble analysert ved 4 dager og 6 uker etter sårpåføring ved hjelp av Aiforia®s plattform. Figur 24 viser representative histologiske snitt hvor AB-PAS-metoden visualiserte glykoproteiner og mucinfordeling i sårgjenoppbyggingsprosessen. Den kvantitative AI-analysen avdekket ingen signifikante diettrelaterte forskjeller i re-epiteliseringsgrad, bindevevsremodellering eller mucinproduksjon i dermis/epidermis som kunne si noe om sårhelingsveien.



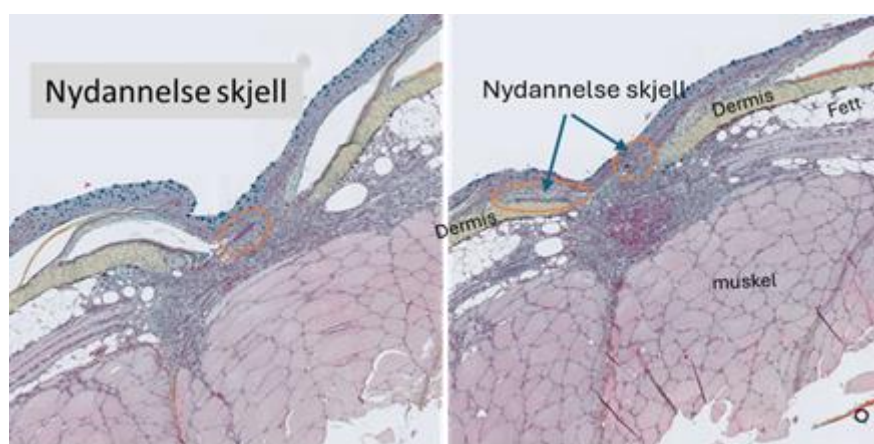
Figur 23 Mikroskopibilde + fotografi av skinn hvor de ulike sårene ble påført, henholdsvis skrapår og kuttsår sammenlignet med urørt skinnflate mellom sårflatene. Målingen av lukking av de ulike sårene ble utført med bildeanalyser.

Snitt fra sårflatene (kun dypt sår) fra de ulike diettgruppene ble videre farget med både von kossa og Movat for å studere eventuelle morfologiske forandringer mellom diettgruppene under sårhelingsprosessen ved 4 dager vha manuell mikroskopianalyse. Se Figur 24 for eksempelbilder. Movat farger kollagen gul, muskel rød, kjerner blå, mucin svart og elastiske fibre svart, Von kossa farger kalsium brunt.



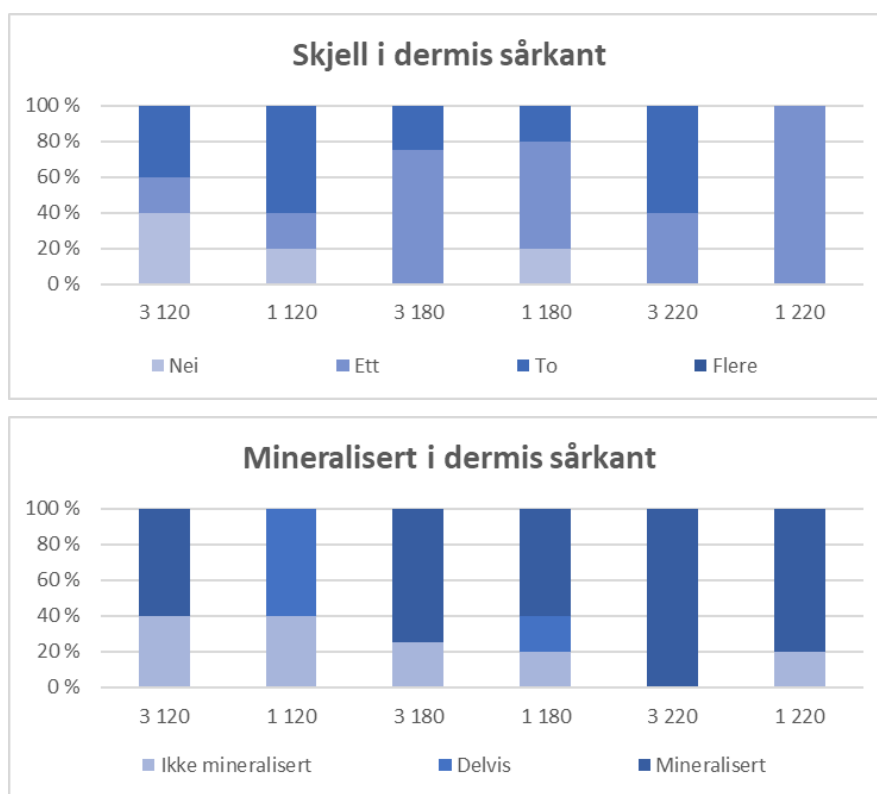
Figur 24 Eksempelbilder på Movat farget snitt (bildet til venstre) og von kossa farget snitt (bildet til høyre) av sårflate i skinnet, dag 4.

Det ble ikke funnet forskjeller i skjellutviklingen når skjellene rundt sårkuttet ble analysert. Vi studerte videre dannelse av skjell på kanten av skjellet og i området rundt dermis. I tillegg studerte vi om disse skjellene var mineraliserte eller ikke, som illustrert i Figur 25. Modning av skjellene kan leses ut ifra tykkelse, om de er rette eller krøllete eller kun i begynnende stadier, som beskrevet tidligere.



Figur 25 Dannelse av skjell i sårkanten til skinnet

Figur 26 viser manuell scoring av antall og mineralisering av skjell i sårkant. Diettgruppen føret høy omega 3 og høy sink HQ/HZn kom bedre ut enn de andre gruppene på disse scoringene, spesielt tydelig for antall mineraliserte skjell i dermis sårkant. Dette viser at både omega-3 fettsyrene EPA + DHA og sink i dietten er viktig for optimal nydannelse og mineralisering av skjell i sårflaten.



Figur 26 Scoring av antall skjell i dermis sårkant, mineralisering i dermis sårkant (snitt fra 10 fisk per diettgruppe)

5.2 A1. 2 Resultat og diskusjon *in vitro* sårhelingsmodell

Keratocytter i laksens skinn er en type epitelceller som finnes i epidermis, det ytterste laget av skinnet. Disse cellene har flere viktige funksjoner:

- **Fysisk barriere:** De danner en fysisk barriere som beskytter fisken mot ytre påvirkninger og vanntap.
- **Sterke bindinger:** De er koblet sammen med sterke bindinger, som bidrar til å forsegle skinnet.
- **Reparasjon av skadet skinn:** De spiller en viktig rolle i reparasjon av skadet skinn ved å forsegle, lukke og reparere skader.
- **Immunforsvar:** De er involvert i laksens immunforsvar, da de kan angripe og ta opp (fagocyttere) bakterier som ligger på skinnet.

Keratocytene er dermed avgjørende for å opprettholde skinnets integritet og beskytte laksen mot infeksjoner og miljøpåvirkninger.

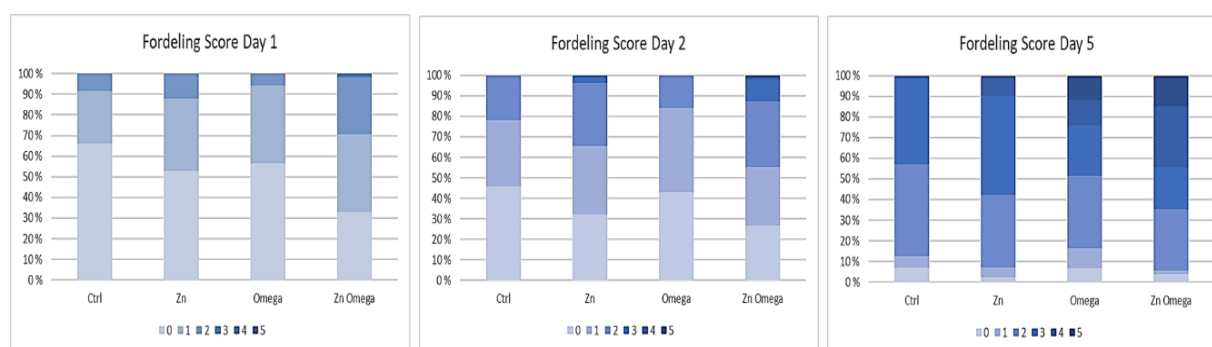
Vi ønsket å studere effektene av Zn og DHA på migreringskapasiteten til keratocytter fra laks ved å benytte en cellemodell med skjell, som tidligere beskrevet i Karlsen et al., 2021. Tre forsøk med keratocytter i kultur ble satt opp med seks fisk i hver runde. Fem skjell per brønn per fisk, totalt 30 skjell per behandling i triplikat, altså 90 skjell per behandling ble brukt i hvert forsøk.

Behandlingene var:

- Negativ ktr – L-15 vekstmedium (5% FBS)
- Zn: 0.5 mg/l Zn
- Omega-3: 10µM DHA
- Zn og omeg-3: 0.5 mg/l Zn + 10µM DHA

Migrering av keratocytter ble scoret etter disse kriteriene

Scoring	Beskrivelse
0	Ingen vekst
1	Noen få celler begynner å migrere (vandre)
2	Celler danner små celleflak
3	Celleflak som omgir skjellet, tilsvarer en størrelse på $\frac{1}{4}$ av flaten til skjellet
4	Celleflak som omgir skjellet, tilsvarer en størrelse på halvparten av flaten til skjellet
5	Celler som omgir skjellet, dekker en overflate større enn skjellet

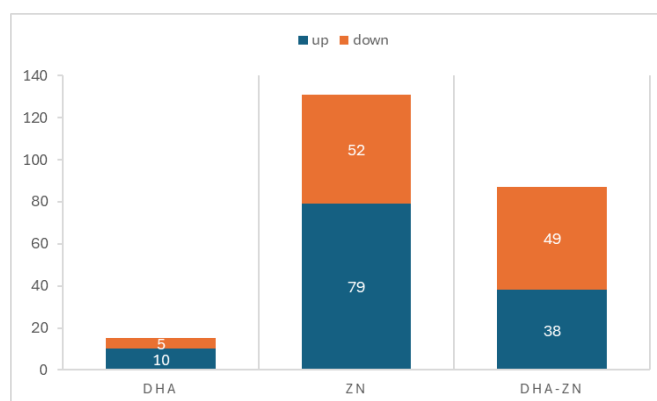


Figur 27 Resultater fra et av migreringsassayene i behandlingsgruppene ktr, Zn, DHA (omega-3) og Zn+DHA (ZnOmega) etter 1 dag, to dager og 3 dagers kultur.

Figur 27 viser at tilsetning av Zn og DHA i dyrkingsmediet øker migrasjonen til keratocytene fra skjellene. Den høyeste migrasjonen ble observert for cellene som hadde fått både Zn og DHA. Migreringskapasiteten økte jevnt over tid for alle gruppene, noe som er forventet for disse cellene. Skjellene som fikk både Zn og DHA migrerte imidlertid raskere enn skjellene i brønner som enten ikke hadde fått noen tilsetning eller kun én av komponentene, ved alle tidspunkter. Samme resultat ble funnet i alle tre separate forsøk.

Genuttrykk i keratocytter

RNA ble isolert fra cellekulturene på dag 3 og analysert med microarray. Genekspressjonen gjenspeilet ikke effektene av Zn og DHA på cellevekst og motilitet. Dette er ikke overraskende, da disse hendelsene ikke nødvendigvis krever store genreguleringer. Likevel kan microarray-dataene være interessante. De mest åpenbare effektene fremgår av DEG-tallene (Figur 28), der effekten av DHA totalt sett var neglisjerbar i motsetning til Zn. Kombinasjonen av Zn og DHA reduserte endringer i genekspressjonen sammenlignet med Zn alene, noe som viser en interaksjonseffekt mellom Zn og DHA på genuttrykk i keratocytter.



Figur 28 Antall differensielt uttrykte gener (DEG) i gruppene hvor keratocytter er tilsatt DHA, Zn og DHA+Zn sammenlignet med kontroll (blå farge er oppregulert, orange farge er nedregulert).

Mange av de funksjonelle gengruppene var kun representert med et eller noen få DEG og var derfor ikke tilstrekkelig for funksjonelle analyser, men enkeltgener er interessante. I Figur 29 er tretti gener vist. Fem og fem gener er assosiert med henholdsvis cytoskjelett og celleadhesjon. Ankycorbin, diaphanous 2, rho gtpase og dystonin er essensielle for organisering og stabilitet av cytoskjelettet, og PDZ og LIM domeneprotein 2 fremmer epitelial fenotype. Repetin og egf-7 regulerer differensiering av epitelet. Et lite sett av immun-gener viste forskjellige profiler: ned- eller oppregulering som respons på en eller to behandlinger (ingen gener med uttrykksendringer i alle tre eksponeringene). Bemerkelsesverdig er prostaglandin reduktase 1 det eneste genet som var markant oppregulert av DHA (2,7 ganger fra kontroll). Flere inflammatoriske mediatorer ble nedregulert av Zn (mmp 9 og kollagenase 3) eller DHA-Zn (saa og nk-lysin). Diaminacetyltransferase 1 og histopatologisk markør tnf decoy receptor ble oppregulert av den samme behandlingen. Figur 29 inkluderer også to proteiner i kobbermetabolismen som ble oppregulert (ceruloplasmin) eller nedregulert (slc31a1) av sink.

Function	Gene	DHA-Zn	DHA	Zn
Cytoskeleton	Ankycorbin	1.17	0.25	1.89
Cytoskeleton	Diaphanous 2	0.86	0.12	1.83
Cytoskeleton	Dystonin	1.73	0.79	2.48
Cytoskeleton	PDZ and LIM domain protein 2	0.83	0.51	0.13
Cytoskeleton	Rho GTPase-activating protein 23	0.64	0.19	1.08
Adhesion	Claudin-18	0.86	0.25	1.48
Adhesion	Nephronectin	0.69	0.37	1.35
Adhesion	Occludin	0.55	0.17	1.03
Adhesion	P63-regulated gene 1-like protein	0.26	0.78	1.03
Adhesion	B3GNTL1	1.00	0.37	1.45
ECM	Laminin subunit alpha-4	0.71	0.31	1.01
ECM	Repetin	0.95	-0.04	0.60
Differentiation	Epidermal growth factor-like 7	1.14	0.64	1.85
Differentiation	Homeobox protein HoxC8 an	1.10	0.15	1.45
Differentiation	LIM homeobox transcription factor 1,	0.73	0.22	1.30
Immune signaling	C-X-C motif chemokine 10	-0.38	-0.39	-0.95
Immune signaling	C-X-C motif chemokine 14 precursor	-0.35	-0.53	-0.86
Immune signaling	Interleukin-1 receptor type II	0.83	0.23	0.17
Immune signaling	Prostaglandin reductase 1	0.72	1.43	0.68
Immune signaling	Cytosolic phospholipase A2 gamma	0.96	0.73	-0.14
Inflammation	MHC class II antigen	-0.67	-0.48	0.12
Inflammation	MHC class Ia heavy chain	-1.28	-0.34	0.11
Inflammation	Serum amyloid A	-1.50	0.28	-0.57
Inflammation	Antimicrobial peptide NK-lysin-like	-0.67	-0.68	-0.74
Inflammation	Matrix metalloproteinase-9	-0.08	0.36	-1.24
Inflammation	Collagenase 3-like	-0.44	0.21	-1.00
Inflammation	Diamine acetyltransferase 1	1.09	0.08	-0.13
Inflammation	TNF decoy receptor	1.03	0.27	-0.18
Cu metabolism	Ceruloplasmin	0.71	0.36	0.96
Cu metabolism	High affinity copper uptake protein 1	-2.01	-0.84	-1.54

Figur 29 Utvalgte DEG, data er log2-ekspresjonsratio til kontroll. Gener med DE (>1.74-fold og p<0,05) er markert med understreket fet kursiv.

5.2.1 Hovedfunn skinnhelse og sårheling A1.3 og A1.2

For å avdekke forskjeller og studere funksjonelle egenskaper har vi kombinert in vitro- og in vivo-teknikker. Vi har undersøkt skinnegenskaper hos lakseparr i vekst (5-15 g) fôret med seks ulike dietter: lav Zn/lav omega-3, lav Zn/høy omega-3, medium Zn/lav omega-3, medium Zn/høy omega-3, høy Zn/lav omega-3 og høy Zn/høy omega-3. Deretter har vi analysert hvordan disse diettene påvirker sårheling av mekanisk induserte sår, hvor tre ulike sårtyper ble studert: dypt kutt, skinn fjernet tett inntil sårkant og overfladisk sår. Det dype kuttet ble laget med en skalpell som snittet et lite sår rett ned i skinnet og delte dermis. Det skrapte området ble kun lett skrapet med en skalpell slik at skjellene ble fjernet, men dermis forble urørt (overfladisk sår). Til slutt har vi undersøkt hvordan ulike konsentrasjoner av Zn og omega-3-fettsyren DHA påvirker migreringskapasiteten til skinnceller (keratocytter) i kultur.

Digitale og manuelle skinnanalyser viste få forskjeller mellom diettgruppene hos lakseparr i utvikling. Analysene avdekket imidlertid signifikant bedre skjellutvikling og mineralisering av skinn hos fisk fra gruppen som hadde fått både høy sink og høy omega-3. Skjellene i skinnet til denne fisken ble både dannet og modnet raskere. Tilsvarende funn ble gjort i sårstudien, der skjell regenererte raskere i sårene hos fisk som hadde fått dietten med høyest innhold av både Zn og omega-3. Andre forskjeller i sårhelingsprosessen kunne derimot ikke påvises med de valgte metodene.

I cellekulturforsøket ble det påvist et høyere migreringspotensial for skinnceller (keratocytter) som fikk tilsatt både sink og omega-3-fettsyren DHA i vekstmediet. Det var økt migrasjon dersom cellene fikk enten Zn eller DHA i mediet, men effekten var størst for cellene som hadde fått en kombinasjon av både Zn og DHA.

Rask migrering av keratocytter for å dekke et åpent sår og rask regenerering av skjell for å opprettholde skinnstyrken er viktige faktorer i sårheling hos fisk. Gjennom analysene i denne arbeidspakken har vi vist at kombinasjonen av Zn og omega-3-fettsyrer er viktige faktorer for to sentrale prosesser i skinn: migrering av keratocytter og utvikling av skjell.

Hovedfunn sårheling

- **Skinnanalyse:** Få forskjeller mellom diettgruppene, men bedre skjellutvikling og mineralisering hos fisk fôret med høy Zn og høy omega-3.
- **Sårstudie:** Raskere regenerering av skjell i sårene hos fisk med høy Zn og høy omega-3.
- **Cellekulturforsøk:** Høyere migreringspotensial for keratocytter med både Zn og omega-3-fettsyren DHA.
- **Viktige faktorer for sårheling:** Kombinasjonen av Zn og omega-3-fettsyrer er viktig for migrering av keratocytter og utvikling av skjell.

5.3 AP A3.4 Korttidsforsøk for studier av opptaksmekanismer for Zn i tarmen (HI ansvarlig)

Disse korttidsforsøkene er publisert i Aquaculture Nutrition (Fang et al., 2024), og tabeller og figurer i denne delen av rapporten er tatt fra denne artikkelen.

Medforfattere: Nini H. Sissener, Anthony Philip, Haohang Fang, Øystein Sæle, Trygve Sigholt.

Målsetting: Gjennomføre korttidsforsøk med tidsserieuttak etter fôring for å øke kunnskapen om opptaksmekanismer for Zn i tarmen hos laks, og hvordan fettnivå i fôret påvirker dette.

5.3.1 Forsøksdesign

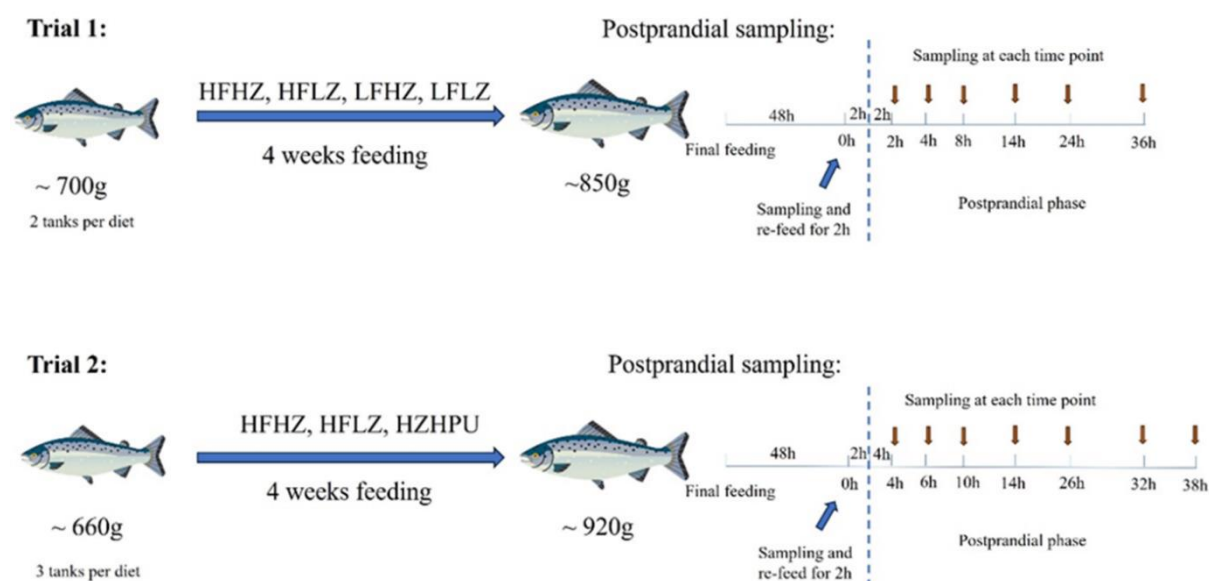
Samme fôr ble benyttet som i langtidsforsøket i AP3 (den minste pelletstørrelsen), detaljer rundt fôrformulering og analyser er rapportert i delkapittelet fra langtidsforsøket i AP3. I forsøk 1 ble fire eksperimentelle dietter, med ulike nivåer av fett og sink benyttet: HFHZ, HFLZ, LFHZ, og LFLZ.

I forsøk 2 ble tre eksperimentelle dietter brukt. De to første (HFHZ og HFLZ) var de samme som i forsøk 1, mens den tredje dietten inneholdt høyere nivå av n-3 LC-PUFA (HPUHZ).

To fôringsforsøk ble gjennomført ved Matre Forskningsstasjon ved Havforskningsinstituttet. Alle prøveuttak ble utført på bedøvet fisk. Studien ble vurdert av dyreforsøksavdelingen ved HI og godkjent som en ikke-invasiv dyrestudie (godkjenning fra Mattilsynet ikke nødvendig), gjennomført i samsvar med norske forskrifter og EU-direktiv 2010/63/EU.

I begge forsøk ble atlantisk laks (*Salmo salar*) fôret med kommersielt fôr (Skretting Norge) i 2 uker for akklimatisering. I forsøk 1 (Figur 30) ble 280 laks med gjennomsnittsvekt på 718 ± 58 g tilfeldig fordelt i åtte kar (1 350 L, dimensjoner $1,5 \times 1,5 \times 0,8$ m) med 35 fisk per kar. De fire eksperimentelle diettene (HFHZ, HFLZ, LFHZ, LFLZ) ble tilfeldig fordelt på karene i duplikater. Fiskene ble fôret to ganger daglig til metthet (kl. 09:00 og 16:00) i 4 uker. Temperaturen i vannet varierte mellom 8 og 9 °C.

I forsøk 2 (Figur 30) ble 225 fisk med gjennomsnittsvekt på 667 ± 20 g tilfeldig fordelt på ni kar (1 350 L). Tre eksperimentelle dietter (HFHZ, HFLZ og HPUHZ) ble tilfeldig fordelt på karene i triplikater. Fiskene ble fôret to ganger daglig til metthet i 4 uker, med vanntemperatur mellom 10 og 12 °C.



Figur 30 Forsøksoppsett for de to korttidsforøkene med Atlantisk laks, gitt ulike fôr, etterfulgt av en post-prandial uttaksserie

5.3.2 Metodikk

Postprandial prøvetaking

Ved avslutningen av fôringsforsøket ble fisken fastet i 48 timer for å tømme mage-tarmkanalen og nå fastestatus (0 t), da det ble tatt prøver av blod og tarm. Etterpå ble fisken fôret i 2 timer, og tiden etter måltidet (postprandial tid) ble beregnet. Blod og tarmprøver ble samlet inn på ulike postprandiale tidspunkter. I forsøk 1 ble fem fisk fra hver tank (totalt 10 fisk per diettgruppe) prøvetatt ved 2, 4, 8, 14,

24 og 36 timer etter fôring. I forsøk 2 ble tre fisk fra hvert kar (totalt ni fisk per diettgruppe) prøver ble tatt ved 4, 6, 10, 14, 26, 32 og 38 timer etter fôring.

Fiskene ble bedøvet med en overdose av tricain-mesylat (MS-222). Vekt og lengde ble målt før blodprøve ble tatt. Blodprøvene ble sentrifugert (14 200 g, 2 min, 4 °C) for å isolere plasma, som ble frosset for videre analyse. Tarmprøver ble tatt, tømt for innhold og umiddelbart frosset i flytende nitrogen.

Kjemiske analyser

Analyser av fôr er beskrevet i kapittel om langtidsforsøket på GIFAS (task 3.3).

Genekspresjon

Tarmprøver for genekspresjonsanalyse ble valgt på tre postprandiale tidspunkter basert på plasma-TAG-profiler: før eksogent lipid hadde nådd sirkulasjonen (2 h i forsøk 1; 4 h i forsøk 2), ved inntreden i sirkulasjonen (14 h i begge forsøk) og ved maksimal inntreden (24 h i forsøk 1; 26 h i forsøk 2).

Totalt RNA ble isolert fra tarmprøver ved hjelp av Maxwell HT simplyRNA Kit og analysert for kvalitet og kvantitet med henholdsvis Bioanalyzer og NanoDrop. cDNA ble syntetisert med et omvendt transkripsjonskit og kvantifisert på en qPCR-maskin med SYBR GREEN PCR Master Mix. Kandidatgenene inkluderte to husgener (β -actin og elongation factor 1 alpha [ef-1 α]), fem gener relatert til Zn-transport og elleve gener relatert til lipidtransport og -metabolisme (Tabell 10). Primerne ble designet gjennom NCBI's primerdesign-verktøy, og RT-PCR ble utført for å evaluere spesifisiteten.

Tabell 10 Primere brukt til qPCR analyse

Gene	Primer sequence (5'– 3')	Accession no. ^a	Efficiency (%)	Production (bps)	Tm (°C)
House-keeping genes					
β-actin	F: CCAAAGCCAACAGGGAGAA	BG933897	113,4	91	57,56
	R: AGGGACAACACTGCCTGGAT				61,14
ef-1α	F: TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	AF321836	100,3	57	60,69
	R: CACGGCCCACAGGTACTG				60,05
Zinc transport genes					
zip4	F: GAGCCTCCTAGTCCTCACACT	XM_045709302.1	110,6	158	60,34
	R: GTCATTTTGAGGAAATCGTGTATCA				57,93
mta	F: TGCAAGGGCAAGACTTGTGA	NM_001123677.1	104,6	87	60,11
	R: ACGTCAGTCATAGGGAATGGAC				59,57
mtb	F: CTCTTGCAACTGCGGTGGAT	NM_001123669.1	106,6	76	60,96
	R: GCAGGGGCAGCAACTTTTC				60,01
znt1	F: GTATCCTGCTCTACACCACCTA	XM_014143981.2	93,2	148	58,44
	R: CAGATGTGCAGTTCGTGGA				57,78
mtf1	F: AGTTTTTCCACAACAAAAGGGC	XM_014200437.2	115,7	169	58,39
	R: AGAGCTGTTGCTATGGTGGAC				60,07
Lipid transport and metabolism genes					
npc1l1	F: CCCGTCATGAGCCAGGATAC	XM_014171081.2	107,9	162	59,97
	R: GCATGGGGCAGACCTTTTTG				60,04
cd36	F: ACCCCCAGCAGTCACATTATT	XM_014153607.2	100,5	131	59,36
	R: GTATGTAGGTCCCAGCAGCA				59,17
fatp4	F: TCTGGAACACATGACAAGCC	XM_014125609	152,0	170	58,10
	R: GCGAACAAGTTGTGTCCTTCC				60,00
fatp6	F: ACAAACTGCAACCCGCTCTA	XM_045693823.1	115,4	156	59,89
	R: CCACCGTCTCAGTGAACCAA				59,89
fabp2	F: GGATTATGCCTCGACTGCCA	BT048647	115,9	149	59,89
	R: GCCACTCTGGGGAATTGCTA				59,74
dgat1	F: CGGTAACGGAATGGTGCGT	XM_014124329.1	100,1	148	60,74
	R: CAGCCTCTGACATCAATTGCCT				60,94
mtp	F: TGATCATTGTAAAATGTGTGCCTTT	XM_014195517.2	104,7	124	58,24
	R: ACAGCTAGCAAGTTAGCCTC				57,32
apob	F: TGGGCTTGACTGGCAAGATT	X81856	116,0	101	59,89
	R: TCCCTCATCTTGCGTTTCT				59,02
cpt1	F: TAAGAGGCCGTGGACCAATC	XM_045708590.1	95,5	195	59,46
	R: ATTGCGCTGAGCACATTGGA				60,96
mgat2	F: CGAGTGCAAGCTCTGCAAGG	XM_014205344	113,4	75	61,91
	R: GAGGTCGGGCAAGATGAAGT				59,75
apoa4	F: TGAAGGTGTTGGTGGTGCTT	XM_014201582	126,1	131	60,03
	R: TGTTGCCTTGCGGACATAGT				59,96

^a: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Fra Fang et al. (2024).

Statistisk analyse

Normalfordeling og varianshomogenitet i dataene ble analysert med Shapiro–Wilk-test og Levene's test ($p > 0,05$). I forsøk 1 ble vektøkning analysert med toveis ANOVA med fett- og Zn-nivåer som uavhengige variabler. Resultater for andre vekstparametere (startvekt, sluttvekt, og kondisjonsfaktor) ble analysert med "nested ANOVA" med kar som tilfeldig faktor. Plasma mineraler, lipider, og genekspresjon ble analysert med treveis nested ANOVA og signifikante forskjeller ble vurdert med Dunnett's test. I forsøk 2 ble vektøkning analysert med t-test mellom gruppene (HFHZ vs. HFLZ eller HFHZ vs. HPUHZ). Statistisk signifikans ble satt til $p < 0,05$, og resultater er presentert som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik (SD). Analysene ble utført i GraphPad Prism 8 og R.

5.3.3 Resultat og diskusjon A 3.4. Vekst, plasmanivåer av mineraler og lipider, genuttrykk Vekst

Veksten til laks fôret med ulike dietter fra forsøk 1 og 2 er presentert i forrige delkapittel av rapporten. I forsøk 1 var vektøkningen for fisken mellom 18,5 % og 22,2 %, mens den i forsøk 2 varierte mellom 39,6 % og 44,9 % (Tabell 11). Det var ingen signifikante forskjeller i vekst mellom diettgruppene ($p > 0,05$).

Tabell 11 Vekst hos *S. salar* gitt de ulike fôrene i forsøk 1 og 2

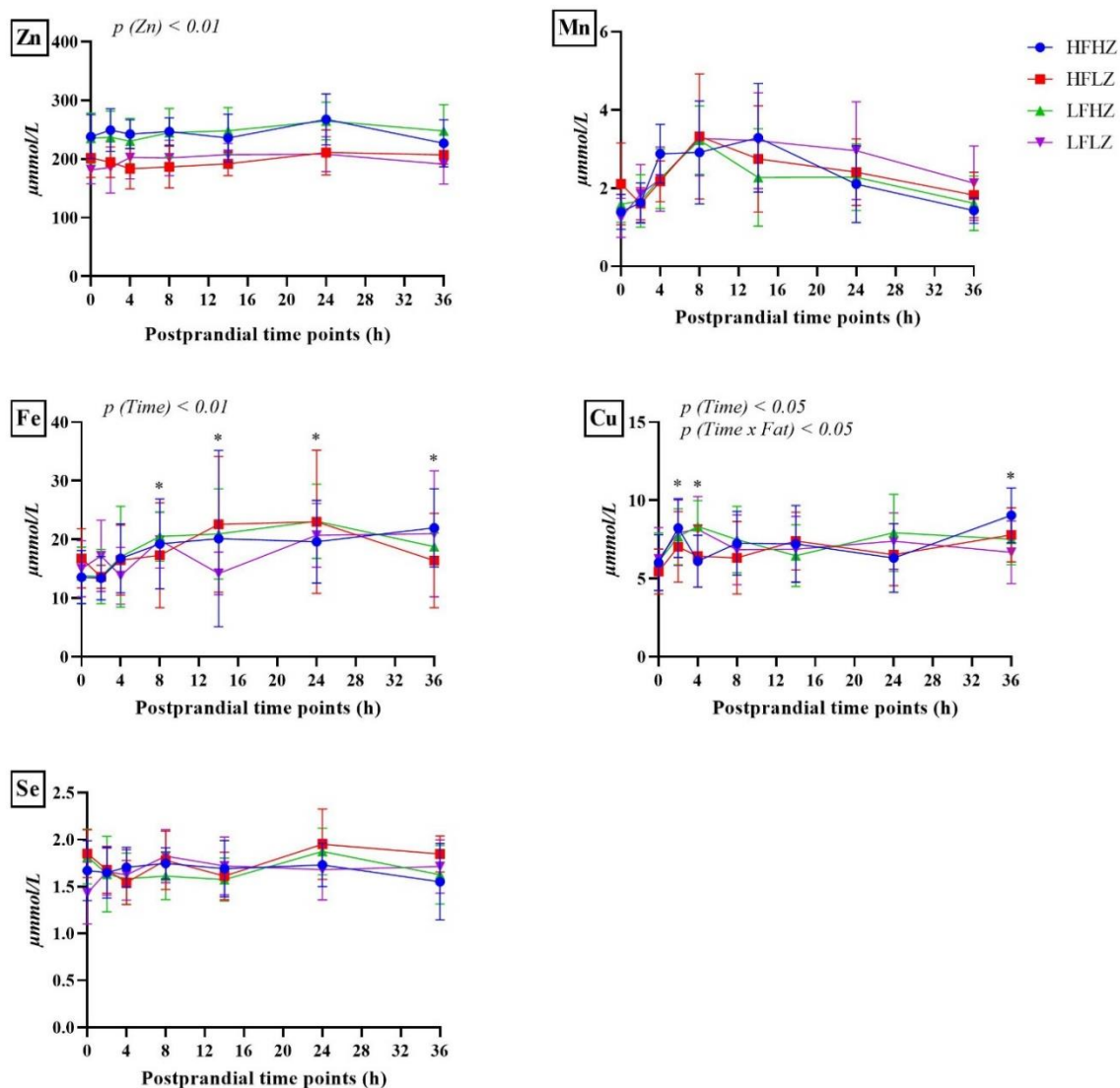
Trial 1	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ	p value		
						Zn	Fat	Zn × FAT
IW	741,9±163,7	738,6±121,4	700,5±150,0	694,2±173,6	/	0,93	0,44	0,98
ICF	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1		0,72	0,44	0,37
FW	888,2±226,8	884±180,3	828,7±190,5	849,5±263,0	/	0,90	0,51	0,86
FCF	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1	1,0±0,1		0,71	0,31	0,47
WG	19,6±2,1	19,7±2,4	18,5±4,8	22,2±2,7	/	0,45	0,78	0,48
SR	100	100	100	100	/	/	/	/

Trial 2						PUFA	Zn
IW	664,3±97,8	663,7±90	/	/	673,0±85,1	0,70	0,98
ICF	1,2±0,1	1,2±0,1			1,2±0,1	0,83	0,96
FW	925,7±160,6	955,4±169,7	/	/	975,5±138	0,33	0,59
FCF	1,2±0,1	1,2±0,1			1,2±0,1	0,06	0,16
WG	39,6 ± 4,0	43,7 ± 3,8	/	/	44,9 ± 3,8	0,11	0,27
SR	94,7±6,1	94,7±9,2	/	/	98,7±2,3	0,35	0,99

IW (g): initial weight; ICF(g/cm³): initial condition factor = (initial weight (g) /initial length (cm) ^3) ×100; FW (g): final weight; FCF (g/cm³): final condition factor= (final weight (g) /final length (cm) ^3) ×100; WG (%): weight gain= (average final weight – average initial weight)/average initial weight×100; SR (%): survival rate= (final number of fish)/(initial number of fish) ×100; Values are mean $\pm$ SD. Fra Fang et al. (2024).

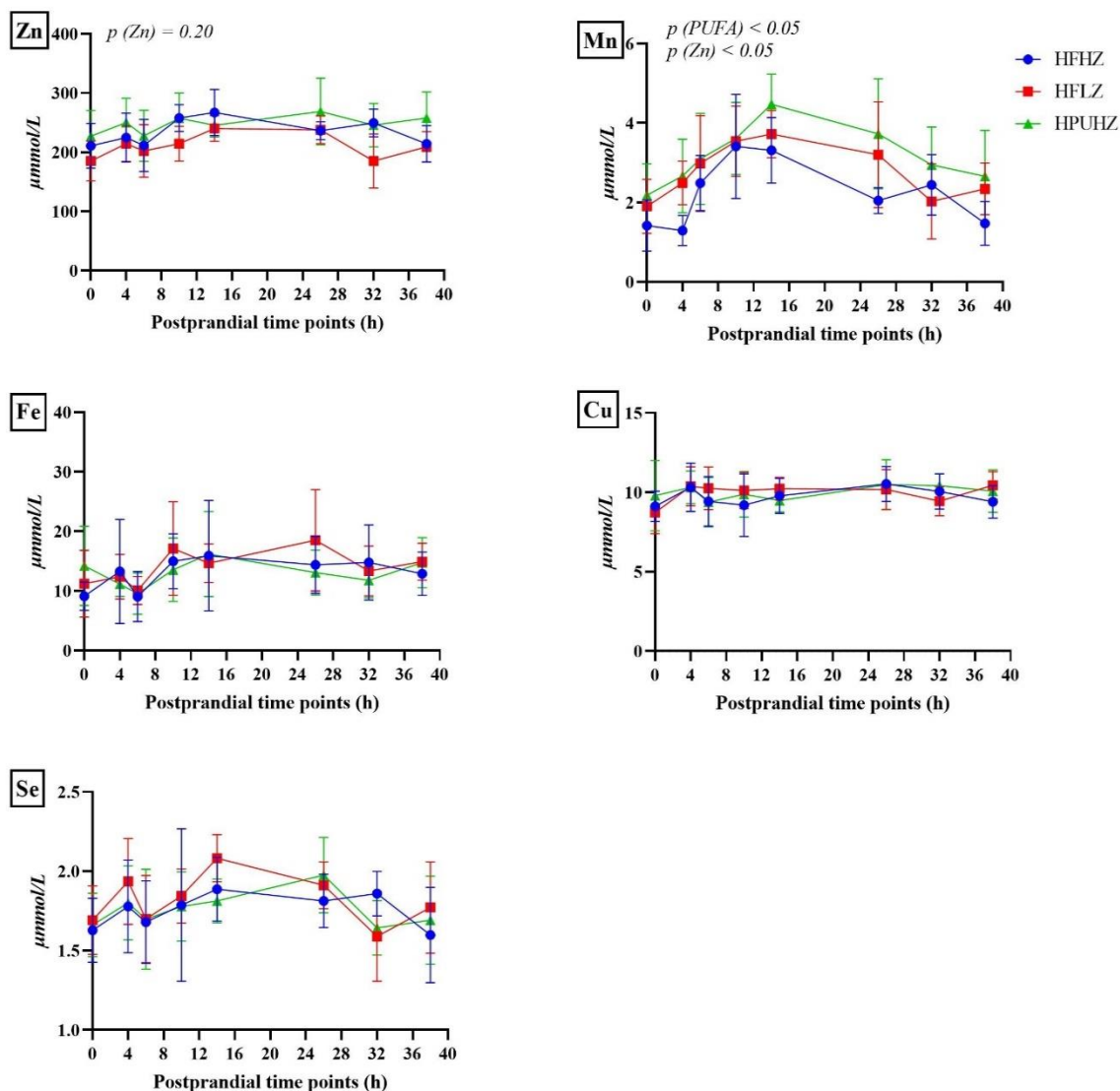
Postprandiale plasmanivåer av mineraler og lipider

I forsøk 1 ga lav Zn i fôret signifikant reduserte postprandiale Zn-nivåer i plasma ($p < 0,01$) (Figur 31). Plasmanivåene av jern (Fe) og kobber (Cu) ble også signifikant påvirket av tid ($p < 0,01$ og $p < 0,05$, henholdsvis), med toppverdier ved spesifikke postprandiale tidspunkter. For eksempel nådde Fe toppnivåer mellom 14 og 24 timer etter fôring, mens Cu viste toppverdier ved 2–4 og 36 timer. Fettinnhold i fôret påvirket ikke plasmanivåene av Zn, Mn, Fe eller Se ($p > 0,05$).



Figur 31 Postprandiale profiler for plasma mineraler hos laks gitt ulike nivåer av fett og Zn (forsøk 1); Hvert punkt i figuren er gjennomsnitt $\pm$ SD ($n = 10$) for et uttakstidspunkt etter fôring; *: Signifikant forskjell fra pre-prandiale resultater (0h); Zn: zinc; Mn, mangan; Fe, jern; Cu, kobber; Se, selen. Figur fra Fang et al. (2024).

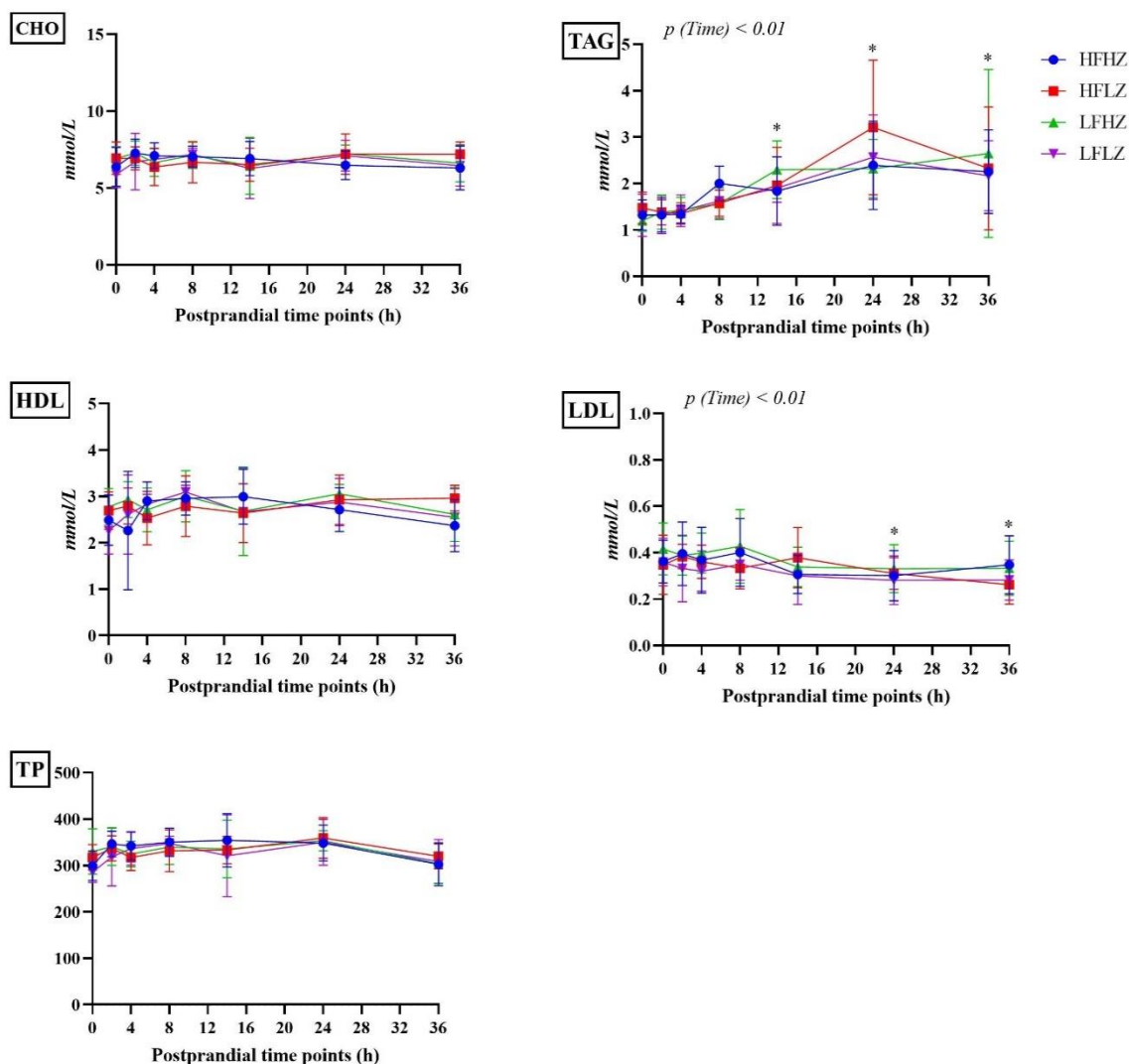
I forsøk 2 ble de postprandiale Zn-nivåene i plasma ikke påvirket av Zn i fôr5 ($p = 0,20$) (Figur 32). Imidlertid reduserte HFHZ-dietten signifikant plasmanivåene av mangan (Mn) sammenlignet med HFLZ-dietten ($p < 0,05$). Dietter med høy n-3 LC-PUFA økte signifikant plasmanivåene av Mn sammenlignet med lav n-3 LC-PUFA-dietter ($p < 0,05$), noe som antakelig skyldes forskjeller i Mn-nivåene i diettene.



Figur 32 Postprandiale profiler for plasma mineraler hos laks gitt ulike nivåer av Zn og n-3 LC-PUFA (forsøk 2); Hvert punkt i figuren er gjennomsnitt $\pm$ SD ($n = 10$) for et uttakstidspunkt etter fôring; *: Signifikant forskjell fra preprandiale resultater (0h); Zn: zinc; Mn, mangan; Fe, jern; Cu, kobber; Se, selen. Figur fra Fang et al. (2024).

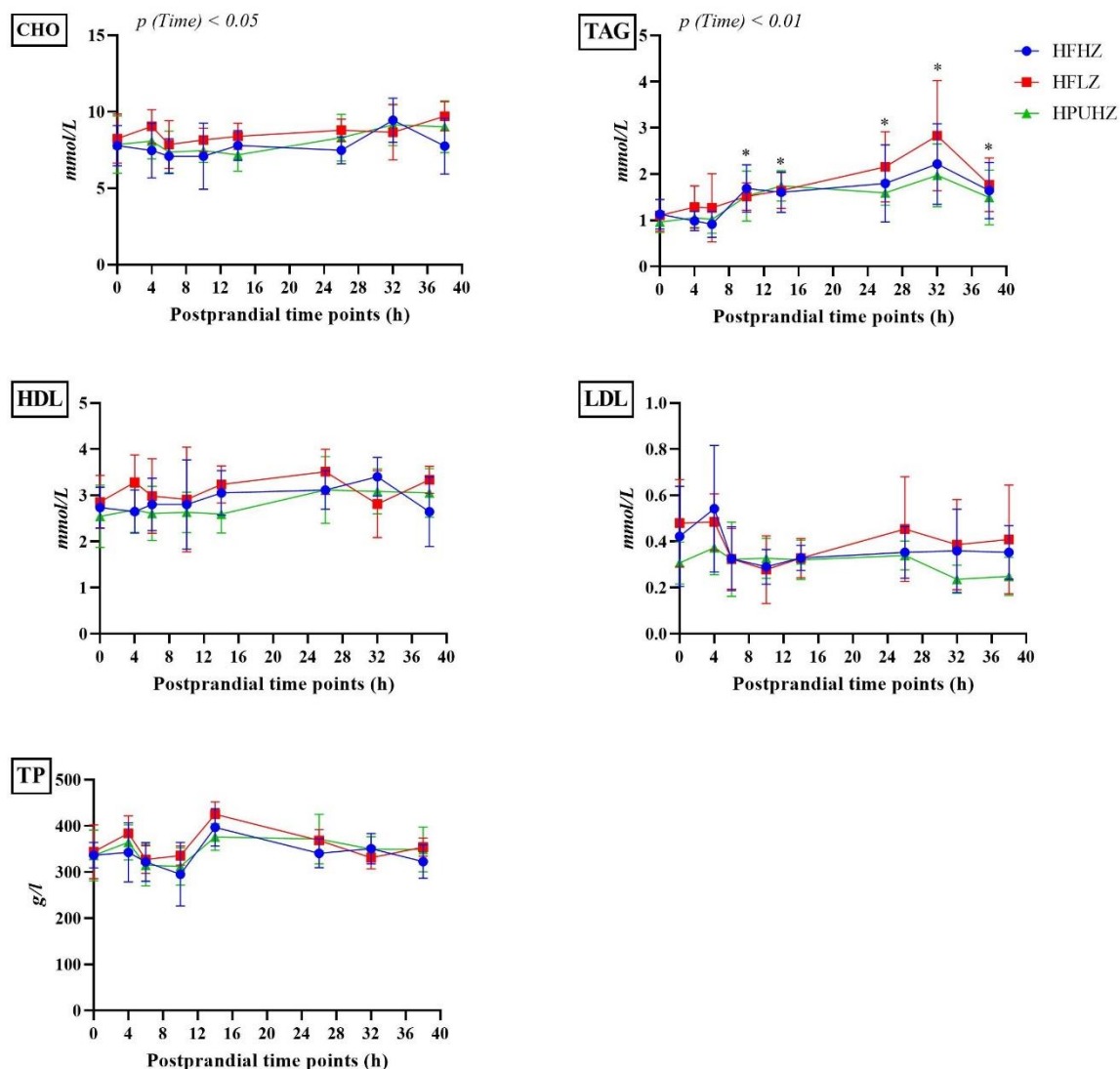
Postprandiale plasmalipider

I forsøk 1 ble det postprandiale triglyseridnivået (TAG) i plasma signifikant påvirket av tid ($p < 0,01$) (Figur 33). TAG-nivåene steg betydelig etter 14 timer og nådde toppnivåer ved 24 timer, som vedvarte til 36 timer ($p < 0,01$). Fett- og sinknivåer i diettene påvirket ikke TAG-nivåene ($p > 0,05$).



Figur 33 Postprandiale profiler for plasmalipider hos laks gitt ulikt fettnivå og Zn-nivå (forsøk 1); Hvert punkt i figuren er gjennomsnitt $\pm$ SD ($n = 10$) for et uttakstidspunkt etter fôring; *: Signifikant forskjell fra pre-prandiale resultater (0h); CHO: kolesterol; TAG: Triacylglycerol; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; TP: total protein. Figur fra Fang et al. (2024).

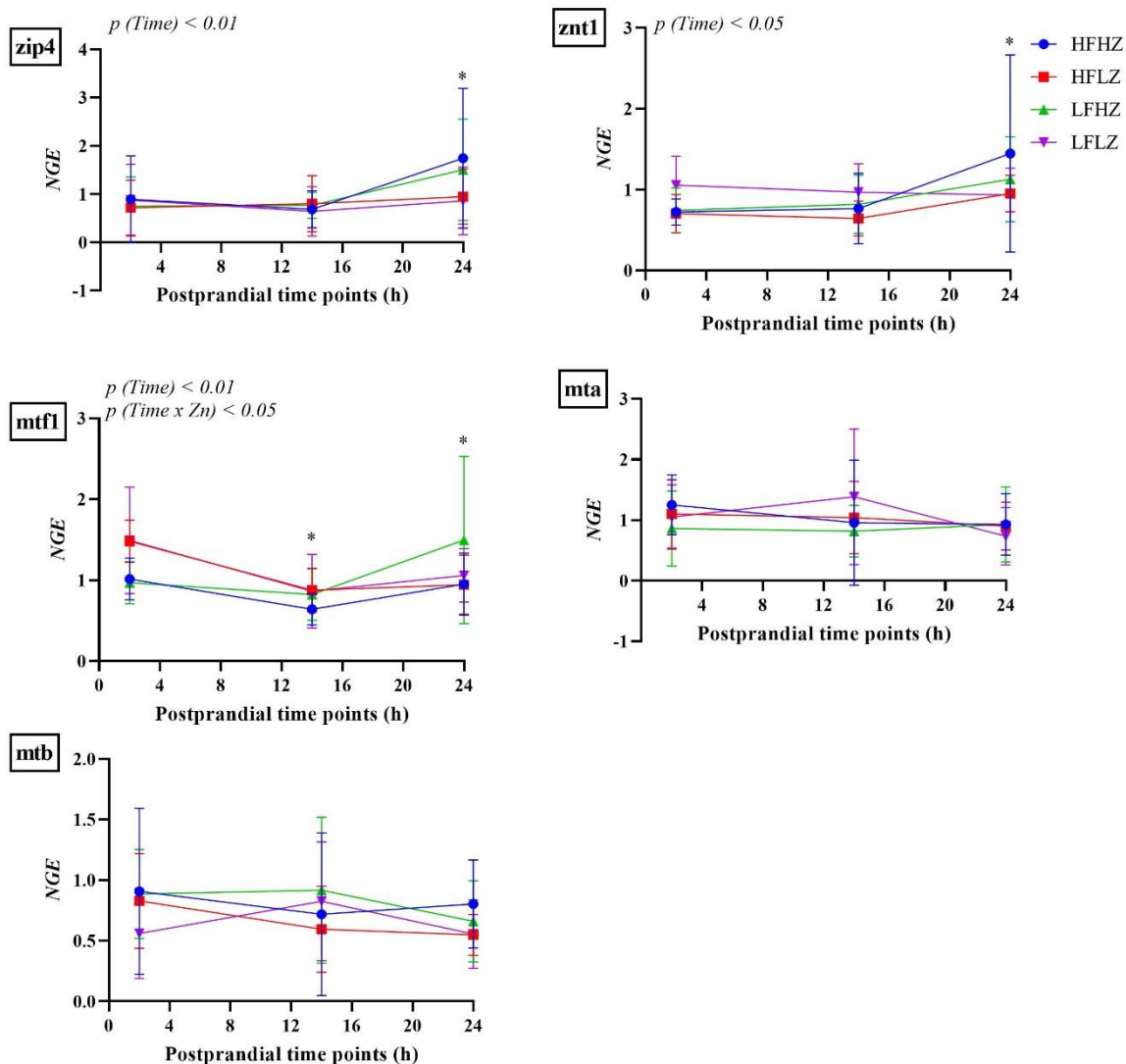
I forsøk 2 var TAG-nivåene i plasma også signifikant påvirket av tid ($p < 0,01$) (Figur 34). Nivåene steg signifikant mellom 10 og 38 timer etter måltidet ($p < 0,05$). Kolesterolnivåene (CHO) ble også påvirket av tid ($p < 0,05$), med høyere nivåer ved 32 timer sammenlignet med 6 timer. Verken Zn eller n-3 LC-PUFA påvirket TAG-nivåene ($p > 0,05$).



Figur 34 Postprandiale profiler for plasmalipider hos laks gitt ulikt nivå av Zn og n-3 LC-PUFA (forsøk 2); Hvert punkt i figuren er gjennomsnitt $\pm$ SD ($n = 10$) for et uttakstidspunkt etter fôring; *: Signifikant forskjell fra pre-prandiale resultater (0h); CHO: kolesterol; TAG: Triacylglycerol; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; TP: total protein. Figur fra Fang et al. (2024).

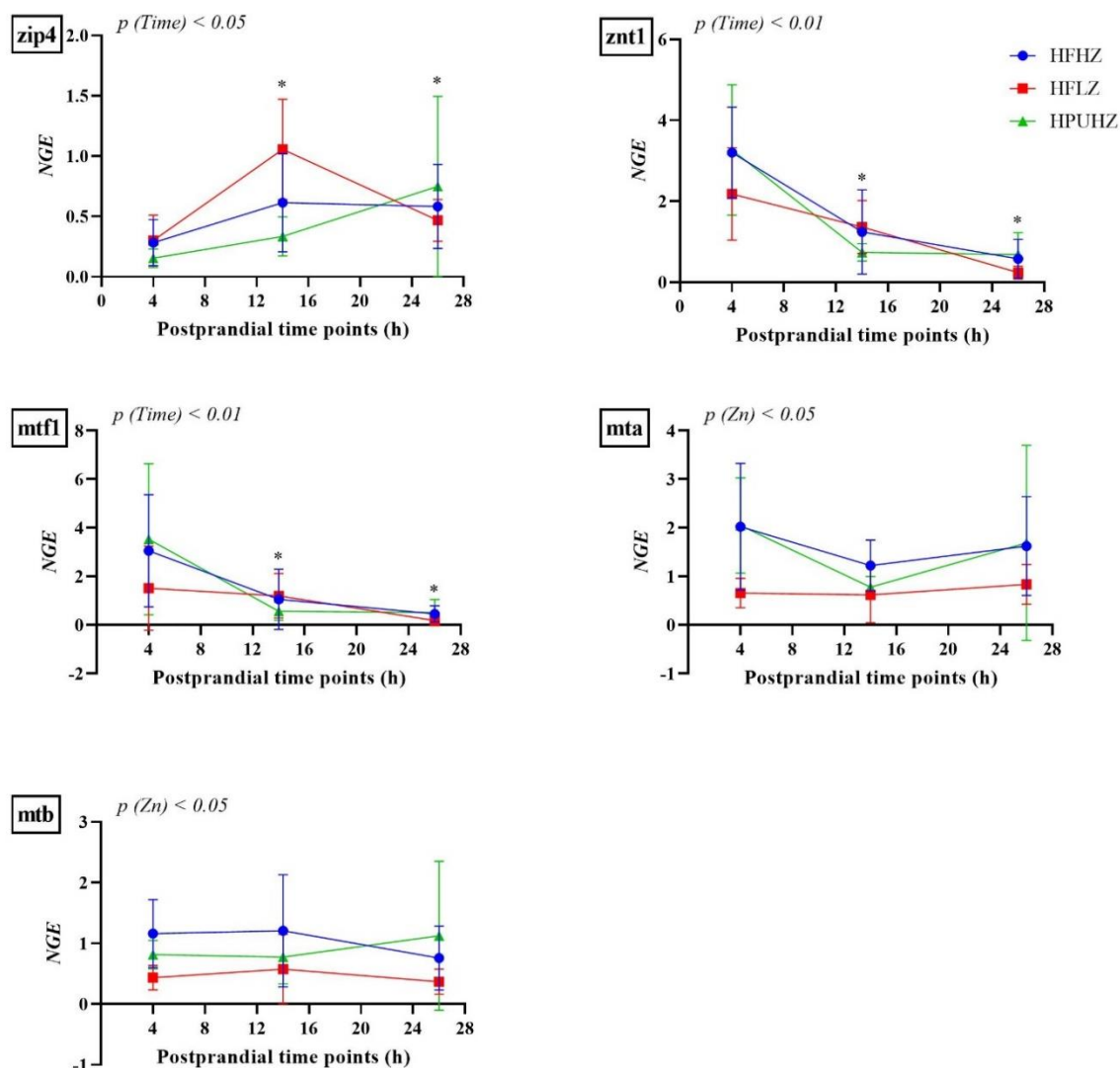
Postprandialt genuttrykk relatert til Zn-opptak og -transport

I forsøk 1 ble tarmens mRNA-ekspressjon relatert til Zn-opptak og -transport ikke påvirket av fôrnivåene av Zn eller fett ($p > 0,05$) (Figur 35). Tidspunktet påvirket imidlertid genekspressjonen av *zip4* ($p < 0,01$), *znt1* ($p < 0,05$) og *mtf1* ($p < 0,01$), som alle var oppregulert ved 24 timer sammenlignet med 2 timer.



Figur 35 Postprandialt genuttrykk i tarm, relater til Zn transport i *Salmo salar* føret med ulike nivå av fett og Zn (forsøk 1); Intestinal Zn uptake: zip4; Intracellular Zn transportation: mta, mtb; Zn efflux: znt1, mtf1; Gjennomsnitt $\pm$ SD ($n = 10$); NGE: normalized gene expression; *: Signifikant forskjell fra 2h etter føring. Figur fra Fang et al. (2024).

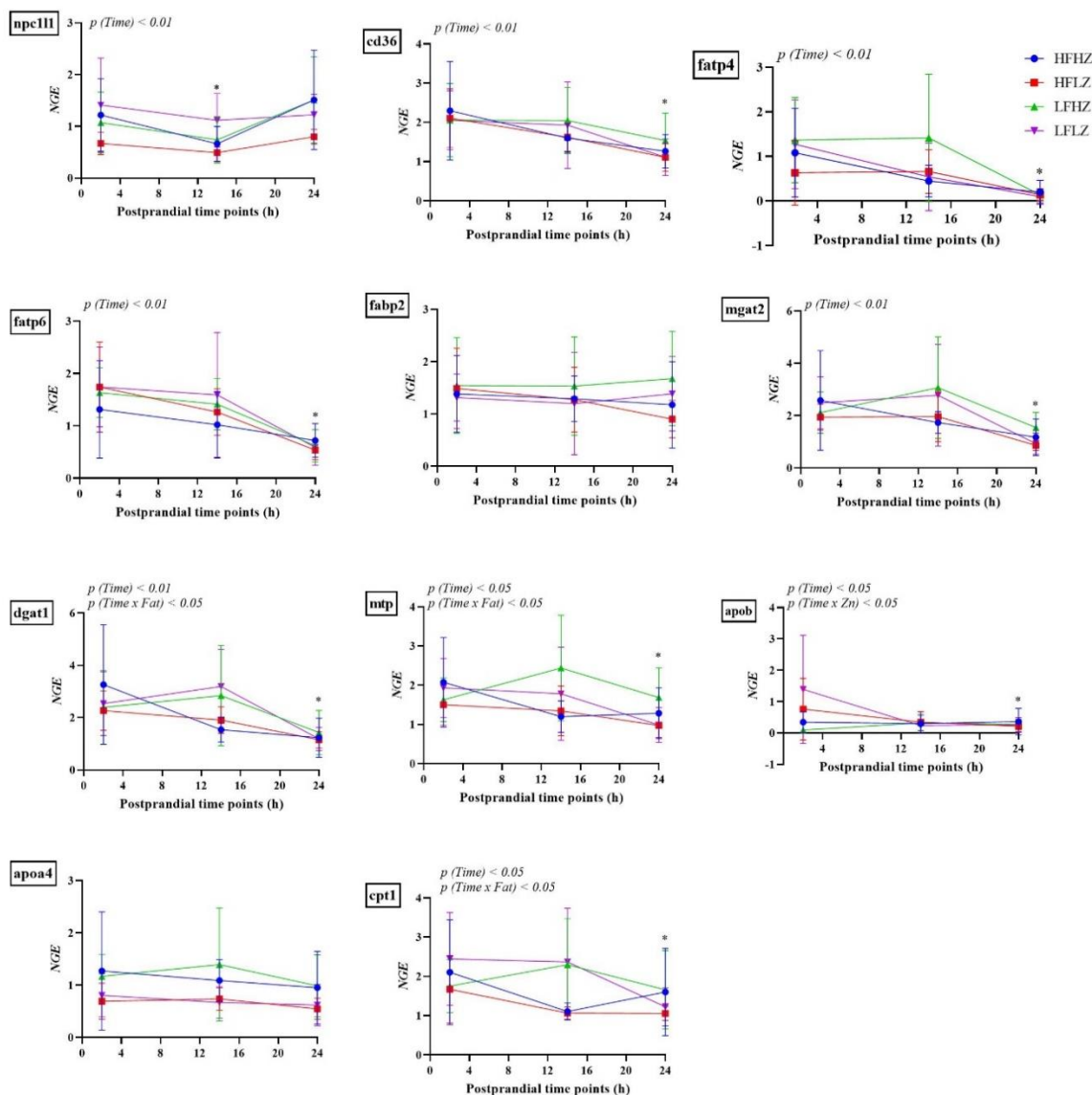
I forsøk 2 ga lavere Zn-nivå i dietten signifikant redusert postprandial mRNA-ekspressjon av metallothionein (mta og mtb) ($p < 0,05$) (Figur 36). Postprandial timing påvirket også signifikant ekspressjonen av zip4, znt1 og mtf1, med oppregulering av zip4 og nedregulering av znt1 og mtf1 ved 26 timer sammenlignet med 4 timer.



Figur 36 Postprandialt genuttrykk i tarm, relater til Zn transport i *Salmo salar* føret med ulike nivå av Zn og n-3 LC-PUFA (forsøk 2); Intestinal Zn uptake: zip4; Intracellular Zn transportation: mta, mtb; Zn efflux: znt1, mtf1; Gjennomsnitt $\pm$ SD ($n = 9$); NGE: normalized gene expression; *: Signifikant forskjell fra 4h etter føring. Figur fra Fang et al. (2024).

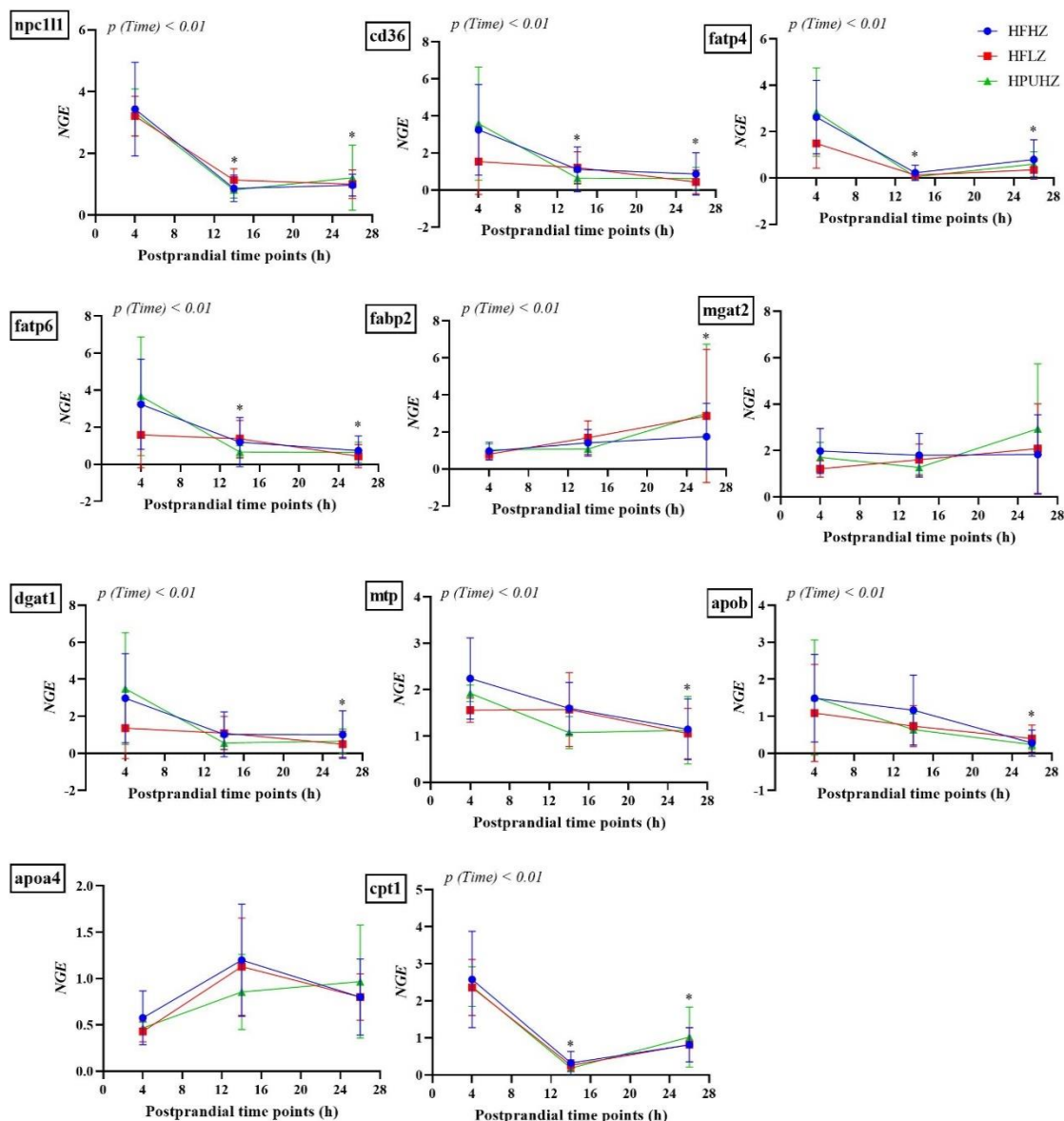
Postprandialt genuttrykk relatert til lipidopptak og -transport

I forsøk 1 ble genespresjon relatert til lipidopptak og -transport ikke påvirket av sinknivåene i dietten ($p > 0,05$) (Figur 37). Interaksjonen mellom fettinnhold og tid påvirket imidlertid ekspresjonen av dgat1, mtp og cpt1 ($p < 0,05$). Gener relatert til TAG-opptak (cd36, fatp4) og fettsyreoksidasjon (cpt1) ble nedregulert ved 24 timer sammenlignet med 2 timer.



Figur 37 Postprandialt genuttrykk i tarm av gener relater til lipid-opptak og -transport i *Salmo salar* gitt fôr med ulike nivå av fett og Zn (forsøk 1); Opptak av fettsyrer i tarm: *cd36*; opptak av kolesterol: *npc1l1*; intracellulær fettsyretransport: *fatp4*, *fatp6*, *fabp2*; re-esterifisering av TAG: *mgat2*, *dgat1*; dannelse av lipoproteiner: *mtp*, *apob*, *apo4*; fettsyre β -oxidation: *cpt1*; Gjennomsnitt $\pm$ SD ($n = 10$); NGE: normalized gene expression; *: Signifikant forskjell fra 2h. Figur fra Fang et al. (2024).

I forsøk 2 ble genekspressjon relatert til lipidopptak og -transport heller ikke påvirket av Zn-nivåer ($p > 0,05$) (Figur 38). Postprandial timing påvirket imidlertid signifikant de fleste av disse genene, inkludert *npc1l1*, *cd36*, og *mtp*, som ble nedregulert ved 26 timer sammenlignet med 4 timer.



Figur 38 Postprandialt gennuttrykk i tarm av gener relater til lipid-opptak og -transport i *Salmo salar* gitt fôr med ulike nivå av Zn og n-3 LC-PUFA (forsøk 2); Opptak av fettsyrer i tarm: cd36; opptak av kolesterol: npc111; intracellulær fettsyretransport: fatp4, fatp6, fabp2; re-esterifisering av TAG: mgat2, dgat1; dannelse av lipoproteiner: mtp, apob, apo4; fettsyre β -oxidation: cpt1; Gjennomsnitt $\pm$ SD (n = 9); NGE: normalized gene expression; *: Signifikant forskjell fra 4h. Figur fra Fang et al. (2024).

Økt kunnskap om postprandial absorpsjonskinetikk av sink (Zn) og hvordan denne påvirkes av fôret kan forbedre forståelsen av Zn-tilgjengelighet fra fôret. I motsetning til hva som er observert i regnbueørret og hybridstripet bass (Apines et al., 2003; Prabhu et al., 2014; Savolainen and Gatlin III, 2010), ble det ikke observert en tydelig absorpsjonstopp i den postprandiale plasmaprofilen for Zn i våre forsøk. Tidligere studier har vist at Zn-nivåer i plasma umiddelbart etter måltider kan øke kraftig når dietten inneholder svært lave eller mangelfulle Zn-nivåer, noe som gir en synlig topp i plasmanivåene.

I forsøk 1 ble ikke mRNA-uttrykket relatert til tarmens Zn-opptak og -transport (zip4 og znt1) påvirket selv om postprandiale plasmanivåer av Zn var korrelert med fôrnivå av Zn. Dette kan skyldes passive opptaksmekanismer i tarmen, som dominerer ved optimale eller høye Zn-nivåer, mens aktive opptaksmekanismer som ZIPs og ZnTs kun oppreguleres ved begrensede Zn-nivåer (Glover and

Hogstrand, 2002; Prabhu et al., 2018). I tillegg til absorpsjon spiller andre metabolske prosesser, som lagring og utskillelse, en viktig rolle i reguleringen av Zn-status i plasma (Hambidge, 2003).

I forsøk 2 (10–12 °C) påvirket ikke Zn i før de postprandiale Zn-nivåene i plasma, i motsetning til forsøk 1 (8–9 °C). Økte vanntemperaturer kan øke mineralakkumulering i vev (Bervoets et al., 1996; He et al., 2023), noe som kan forklare denne forskjellen. Høyt Zn-nivå i føret i forsøk 2 førte til høyere ekspresjon av metallothionein (mta og mtb) i tarmen, noe som tyder på at overskudds-Zn midlertidig ble lagret i tarmen før transport til plasma. Disse resultatene understreker tarmens regulerende rolle i Zn-transport.

Lipidabsorpsjon skjer hovedsakelig i pylorusblindsekker og midttarm hos atlantisk laks (Denstadli et al., 2004; Røsjø et al., 2000). I de nåværende forsøkene begynte plasma-TAG-nivåene å stige betydelig ved 14 timer (forsøk 1) og 10 timer (forsøk 2), noe som indikerer tidspunktet hvor eksogene lipider begynte å sirkulere i blodet. Selv om hepatisk VLDL-sekresjon kan bidra til plasma-TAG, er denne andelen liten sammenlignet med lipider absorbert fra tarmen. Diettnivåer av Zn og n-3 LC-PUFA påvirket ikke de postprandiale plasma-TAG-nivåene, noe som tyder på at disse komponentene ikke hadde en direkte effekt på lipidabsorpsjonen. Imidlertid ble genekspresjon relatert til lipidopptak, som *cd36* og *fatp4*, nedregulert på senere postprandiale tidspunkter, noe som reflekterer endringer i metabolske behov etter et måltid.

Selv om studier i andre arter har vist at sink kan påvirke lipidmetabolismen (Koo et al., 1985; Lee et al., 1986; Ma and Wang, 2023), observerte ikke vi noen direkte effekter av Zn på genekspresjon relatert til lipidopptak og -transport.

5.3.4 Oppsummering av hovedfunn A 3.4, Zn opptak i tarm og metabolisme

Denne studien undersøkte hvordan førnivåene av sink (Zn), fett og n-3 LC-PUFA påvirker postprandiale plasmanivåer, samt tarmens opptak og transport av Zn og lipider hos laks. Resultatene viste at økt Zn-nivå i føret økte Zn-nivået i plasma ved lavere temperaturer (8–9 °C), men ikke ved høyere temperaturer (10–12 °C). Videre ble genuttrykk relatert til Zn-opptak og -transport påvirket av tid etter et måltid, men ikke av fett- eller n-3 LC-PUFA-nivåer i føret. Tilsvarende påvirket ikke Zn-nivåene genuttrykk relatert til lipidopptak og -transport. Disse funnene viser den komplekse reguleringen av Zn- og fettmetabolisme i laks, hvor tarmen spiller en nøkkelrolle i å tilpasse absorpsjonsmekanismer til før og miljøfaktorer. For å optimalisere førsammensetning ift opptak og retensjon av Zn, er det nødvendig med videre studier som undersøker samspillet mellom Zn, fett og andre næringsstoffer.

5.4 A1.1. Effekter av fettsyrer på opptak av Zn i tarmepitelceller (RTgutGC)

(Ansvarlig HI)

Medforfattere: Øystein Sæle og Gopika Radhakrishnan

5.4.1 Forsøksdesign

Effekten av interaksjoner mellom divalente ioner og fettsyrer på opptak og transport av disse er beskrevet i pattedyr (Biehler et al., 2011; Droke et al., 2003). Vi undersøkte hvordan mettet, enumettet og flerumettet fett påvirket cellulært opptak og transport av Zn. Tarmepitelcellelinjen RTgutGC, beskrevet av (Kawano et al., 2011) ble inkubert med Zn i kombinasjon med hver av de tre fettsyrekategoriene. Intensjonen var å eksponere cellene for den radioaktive formen ⁶⁵Zn for å spore og kvantifisere cellenes apikale til basolaterale transport av Zn. Dessverre lot dette seg ikke gjøre innenfor budsjettammene.

To forsøk ble satt opp for å evaluere effekten av fettsyretype på cellulært opptak av Zn. Først en kvantitativ studie basert på kjemisk måling av Zn²⁺ som ble transportert over et dyrket RTgutGC epitel. Det andre forsøket var basert på semikvantitativ visuell måling. Her ble cellene inkubert med Zn²⁺,

fettsyre og FluoZin AM (Invitrogen). FluoZin har høy affinitet for Zn^{2+} uten å bli påvirket av Ca^{2+} . Den avgir 50 ganger sterkere fluorescens når miljøet, cytosol i dette tilfellet, er mettet med Zn^{2+} .

For å kunne utføre disse forsøkene måtte vi først etablere cellenes toleransegrense for Zn^{2+} . Følgende punkter ble utført:

1. Bestemme celletetthet og eksponeringstid.
2. Dyrking av celler i Leibovitz' L-15 komplett medium (21083027, Gibco Thermofisher), supplert med 10 % fosterbovint serum (F7524, Sigma Aldrich) og 1 % antibiotika-antimykotisk løsning (A5955, Sigma Aldrich), vedlikeholdt ved 19 °C under normal atmosfære, og eksponering for sink i ulike konsentrasjoner.
3. Dyrking av celler i ferskvannsbasert medium for å unngå interaksjoner mellom aminosyrer og sink, vedlikeholdt ved 19 °C under normal atmosfære, og eksponering for sink i ulike konsentrasjoner.
4. Dyrking av celler først i Leibovitz' L-15 komplett medium, fulgt av dyrking i forberedt medium med eksponering for sink i ulike konsentrasjoner.

Optimalisering av sinkopptak

1. Testing av cellenes integritet på membraninnsatser ved bruk av TEER-målinger.
2. Bestemme konsentrasjonen av sink som kreves for pålitelige data.
3. Testing av den tidsavhengige funksjonen til sink for å fastsette varigheten av eksperimentet på membraninnsatser.
4. Metoder for å isolere celler fra membranen på innsatsene.

Optimalisering av visualisering av sink

1. Testing av sinkkonsentrasjoner på mikroskål.
2. Testing av konsentrasjonen av sinkprober.
3. Bestemme varigheten nødvendig for at sink skal binde seg vellykket.

5.4.2 Metodikk

Rutinemessig RTgutGC cellekultur

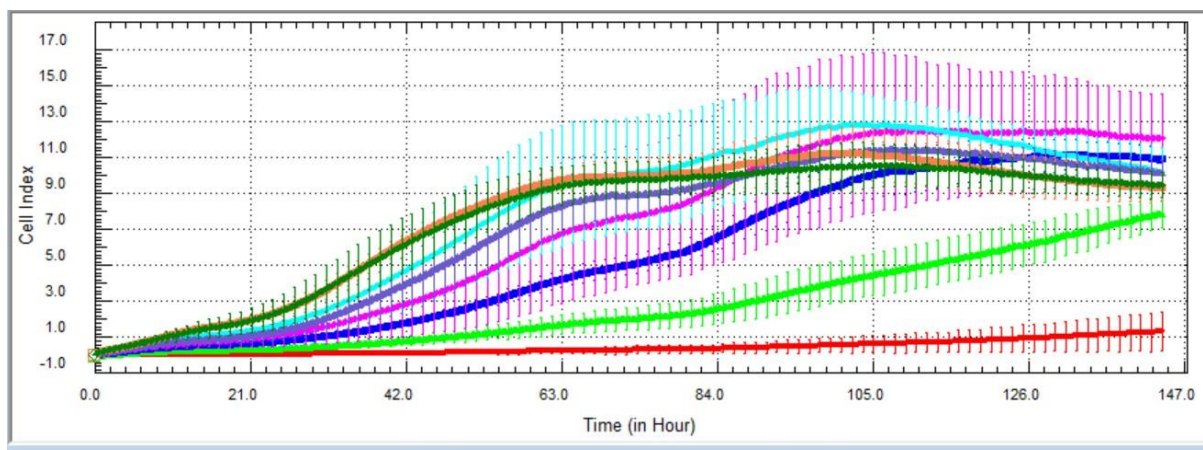
Den intestinale epitelcellelinjen fra regnbueørret (RTgutGC) ble anskaffet fra det sveitsiske føderale instituttet for akvatisk vitenskap og teknologi (Eawag), Sveits, gjennom en materialoverføringsavtale. RTgutGC-celler ble rutinemessig dyrket i henhold til metodene beskrevet av (Kawano et al., 2011). Kort fortalt ble cellene dyrket i en 75 cm² kulturkolbe med Leibovitz' L-15 komplett medium (21083027, Gibco ThermoFisher), supplert med 10 % føtalt bovint serum (F7524, Sigma Aldrich) og 1 % antibiotika-antimykotisk løsning (A5955, Sigma Aldrich), vedlikeholdt ved 19 °C under normal atmosfære. Etter å ha nådd konfluens på 7–10 dager, ble cellene subkulturert for rutinemessig vedlikehold i henhold til metoden beskrevet av Kawano et al. (2011) eller høstet for bruk i eksperimenter.

Bestemmelse av celletetthet og eksponeringstid

I denne studien valgte vi celler i området 5000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 40000 og 50000: fra "a" til "h" i triplikater fylt fra 1–3 i en xCELLigence-plate over en periode på 146 timer. xCELLigence-maskinen må oppbevares i en 19 °C-inkubator i minst 24 timer før eksperimentet starter. Etter 24 timer plasseres xCELLigence-platen, som inneholder 100 µL medium, inni maskinen for å oppnå likevekt før cellene med den definerte tettheten som kreves for eksperimentet tilsettes.

Optimalisering av medier

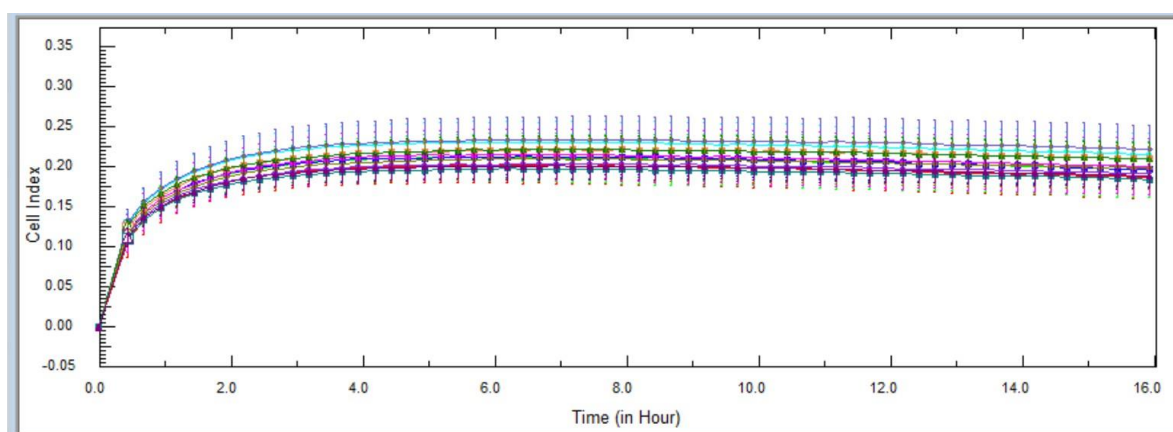
Leibovitz' L-15 komplett medium. (21083027, Gibco Thermofisher), supplementert med 10 % fetal bovine serum (F7524, Sigma Aldrich) og 1% Antibiotisk Antimycotic Løsning (A5955, Sigma Aldrich).



Figur 39 Cellevekst med Leibovitz' L-15 medium: 15 000 celler/ μ L etter 48 timer

Tabell 12 Forberedt medium med definerte ioniske sammensetninger

Element	Molar mass (g)	Ionic composition (mM)	Reported before (Prabhu et al., 2018)
Ca	40	6,25	5,3 mM
Mg	24,31	38,66	32,5 mM
K	39,098	9,21	8,6 mM
Na	22,989	182,71	157,0mM



Figur 40 Celleindex med forberedt medium: 15 000 celler/ μ L etter 1,5 timers eksponering

Toksisitetstest ved bruk av xCELLigence-systemet

Toksisitetseffektene av sink på RTgutGC ble utført i henhold til metodene beskrevet av (Rolfs et al., 2002). Kort fortalt ble E96 xCELLigence-platen forberedt ved å tilsette 100 μ L kulturmedium i hver brønn og inkubere i xCELLigence i 30 minutter med bakgrunnskorrigering. Cellene ble sådd med en tetthet på 15 000 celler/brønn i 100 μ L kulturmedium. Celleadhesjon og proliferasjon ble overvåket hvert 15. minutt av xCELLigence-systemet. Cirka 48 timer etter såing, når cellene var i logaritmisk vekstfase, ble de eksponert for 100 μ L medium som inneholdt BSA-konjugert FA 200 μ M (HA, OA eller DHA) med sink i

konsentrasjoner på 25–800 μM ($n=4$), og eksperimentene ble videreført i ytterligere 48 timer. Kontroller mottok kun medium.

Forberedelse av sink

For å lage en 5000 μM sink stockløsning tilsettes 14,38 mg sink i 10 ml vann, og deretter lages ulike konsentrasjoner (25 μM – 200 μM – 800 μM).

1. Tilsett 14,378 mg sinksulfat i 10 ml medium (forberedt medium) og løs det ordentlig opp i et 15 mL rør.
2. Overfør volumene i henhold til de angitte konsentrasjonene.
3. Ta en 96-brønns forberedelsesplate og tilsett 200 μL av løsningene med forskjellige konsentrasjoner.
4. Fra denne forberedelsesplaten, ta 100 μL og tilsett det i xCELLigence-platen med celler som er plassert inne i maskinen.

Merk: Hvis cellene dyrkes i det samme mediet, følg samme prosedyre. Hvis de først dyrkes i vanlig cellemedium og deretter byttes til det nye mediet, følg disse trinnene:

- Fjern det komplette mediet med en pipette (sjekk om det skal brukes suksjon eller vanlig pipette).
- Vask med PBS (to ganger).
- Tilsett 200 μL av det nye mediet fra forberedelsesplaten som inneholder kontaminantene (sink).

Forberedelse av FA-BSA-komplekser

De fettsyrene heksansyre (HA, 153745, Sigma-Aldrich), oljesyre (OA, O1008, Merck) eller arakidonsyre (ARA, 10931, Merck) ble konjugert med fettsyrefritt bovint serumalbumin (BSA, A6003, Sigma Aldrich) i henhold til metoden beskrevet av (Nøstbakken et al., 2012).

Kort fortalt ble en passende mengde FA veid i en mørk glassbeholder for å oppnå en konsentrasjon på 3,46 mM, og 0,04 ml kloroform per mg FA ble tilsatt for å løse opp fettsyrene fullstendig. Etter at kloroformen ble fordampet under en N_2 -strøm, ble reststoffet oppløst i 0,124 M KOH i et forhold på 1:3 og vortexet kontinuerlig i 10 minutter.

Fettsyrefritt BSA (1,5 mM), oppløst i serumfritt kulturmedium (Leibovitz' L-15), ble tilsatt i et molarforhold på 2,5:1 til FA og ble kontinuerlig omrørt i et vannbad i 45 minutter ved 37 °C. Den endelige konsentrasjonen av FA var 3,46 mM, og løsningen ble filtersterilisert og lagret ved -20 °C til bruk.

Celledyrking på permeable membraner

RTgutGC-celler fra rutinemessige kulturkolber ble trypsinert, talt og sådd med en tetthet på 75 000 celler/ cm^2 i det apikale kammeret i 6 brønner med kommersielt tilgjengelige permeable transwell-membraninnsatser (ThinCert® cellekulturinnsatser, porestørrelse = 0,4 μm ; polyetylentereftalat [PET] fra Greiner Bio-One, Tyskland), i henhold til tidligere beskrivelse (Geppert et al., 2016; Minghetti et al., 2017). De apikale og basolaterale kamrene ble fylt med henholdsvis 2 ml og 3 ml komplett L-15 kulturmedium, og kulturmediet i begge kamrene ble skiftet hver tredje dag. Cellene ble dyrket i 18–20 dager ved 19 °C før eksperimentene.

Den transepiteliale elektriske motstanden (TEER) ble målt for å vurdere tettheten av cellemonolagene ved hjelp av en epitelial volt-ohm-måler (EVOM) med doble "chopstick"-elektroder (World Precision Instruments, New Haven, CT). TEER-verdiene ble beregnet i henhold til metoden beskrevet av Geppert et al. (2016).

Bestemmelse av totalt sink ved ICP-MS

For bestemmelse av totalt Zn ble celleekstraktene nedbrutt ved hjelp av mikrobølgeassistert syrefordøyelse basert på prosedyren beskrevet av (Julshamn et al., 2007). Celleekstraktene fra de apikale og basolaterale kamrene ble fordøyd med 2,0 mL HNO₃ (69 % w/w) og 0,5 mL H₂O₂ (30 % w/w) i en Milestone-MLS-1200 mikrobølgeovn (Milestone Inc., Shelton, CT, USA). De fordøyde prøvene ble deretter fortynnet til 25 mL med Milli-Q® vann.

Bestemmelsen av totalt Zn ble utført ved hjelp av ICP-MS (iCapQ ICP-MS, Thermo Scientific, Waltham, USA) utstyrt med en autosampler (FAST SC-4Q DX, Elemental Scientific, Omaha, USA). Prøvene ble analysert i tilfeldig rekkefølge. Data ble samlet inn og behandlet ved hjelp av Qtegra ICP-MS-programvaren (Thermo Scientific, versjon 2.1, 2013). For kvantitativ bestemmelse av totalt Zn ble en ekstern kalibreringskurve (10 til 500 ng mL⁻¹) brukt, og to sertifiserte referansematerialer ble inkludert for å vurdere metodens nøyaktighet: hummer-hepatopankreas (TORT-3; National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Canada) og østersvev (SMR 1566b; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA). De oppnådde verdiene var i samsvar med de sertifiserte verdiene. Den validerte rekkevidden for Zn-bestemmelse er fra 0,5 til 1400 mg kg⁻¹ (DW).

Visualisering av intracellulært sink

RTgutGC-celler ble sådd i μ -slide 8-brønnsplater med et kammerdekket objektglass (Ibidi GmbH, 80826) med en tetthet på $1,5 \times 10^5$ celler/ml og inkubert ved 19 °C i 48 timer før FA-Zn-behandling. Deretter ble cellene vasket to ganger med PBS og inkubert med 200 μ M fettsyrer (HA, OA eller DHA) konjugert med BSA i 16 timer ved 19 °C. BSA i serumfritt cellekulturmedium uten fettsyrer ble brukt som kontroll.

Kort fortalt ble en 2 mM FluoZin-3 AM DMSO-stamopløsning fortynnet til en endelig konsentrasjon på 3 μ M i fosfatfri HBSS-buffer. Fosfatfri HBSS-buffer ble brukt for å unngå utfelling av Zn²⁺ ved tilstedeværelse av fosfat. RTgutGC-cellene ble vasket med fosfatfri HBSS og deretter inkubert med FluoZin-3 AM/fosfatfri HBSS i 1 time ved 19 °C, etterfulgt av en 30-minutters vask i fosfatfri HBSS-buffer ved 19 °C. Bildeopptak ble utført umiddelbart etter vask. Visualisering av sink ble oppnådd ved hjelp av et Ti-E invertert mikroskop (Nikon, Japan) med et CFI Super Plan Fluor ELWD ADM 20X C PH-1 objektiv, numerisk apertur 0,45 (Nikon, Japan), og en C2+ konfokal skanner (Nikon, Japan). Bilder ble tatt opp ved bruk av NIS Elements AR v.4.51 (Nikon, Tokyo, Japan).

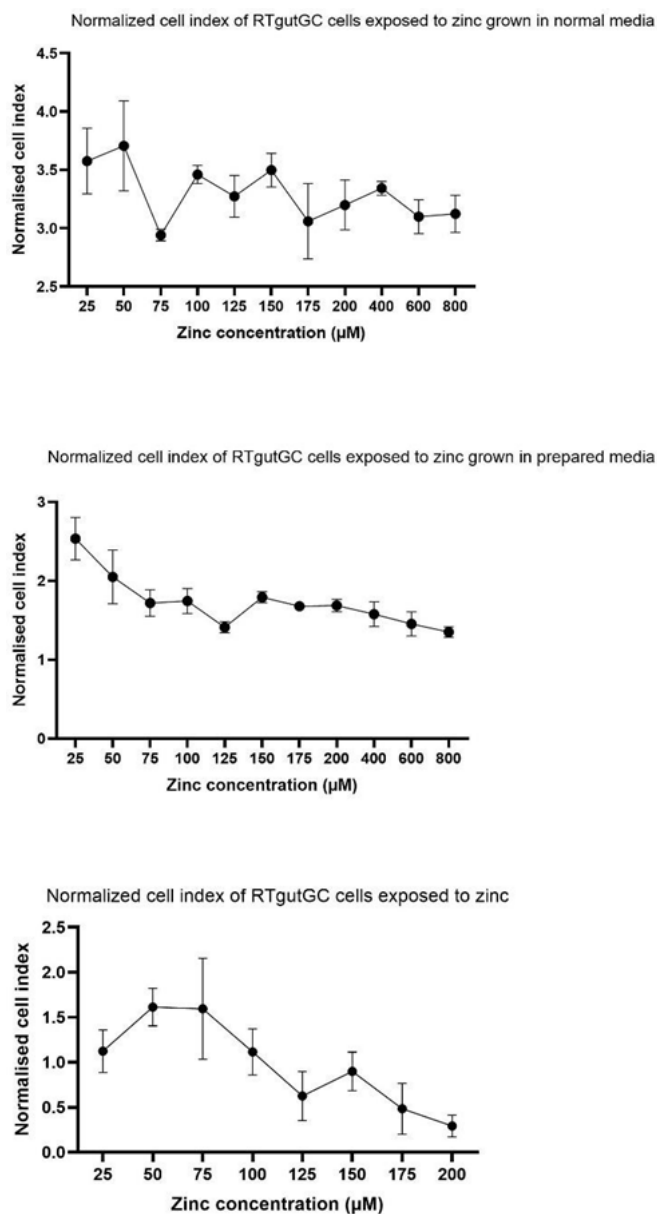
5.4.3 Resultat og diskusjon A1.1.Celle-viabilitet og permeabilitet, Zn opptak i celler

Sink-viabilitetstest

Sink (Zn) viabilitetstesten ble utført i RTgutGC-celler eksponert for tre forskjellige mediesammensetninger (Figur 41). Cellene ble eksponert for Zn i området 25–800 μ M dyrket i forberedt ferskvannsmidde (FW) (Figur 41A), i komplett L-15-medium supplert med 10 % føtalt bovint serum og 1 % antibiotika-antimykotisk løsning (Figur 41B), samt 25–200 μ M for celler som opprinnelig ble dyrket i komplett L-15-medium og deretter eksponert for Zn i forberedt ferskvannsmidde. Styrken av celleadhesjon er representert som Cell Index (CI), som er en enhetsløs måling. Celleindeksen til cellene, som startet med 15 000 celler per brønn, økte etter hvert som celletallet økte. CI ble normalisert ved tidspunktet før Zn ble tilsatt.

Generelt reduserte RTgutGC-cellene den metabolske aktiviteten på en doseavhengig måte ved økende konsentrasjoner av Zn (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 400, 600 og 800 μ M) (Figur 41). Det var en signifikant reduksjon i celleindeksen for celler eksponert for høyere konsentrasjoner ($P < 0,05$), men responsene varierte mellom de forskjellige eksponeringsmediene.

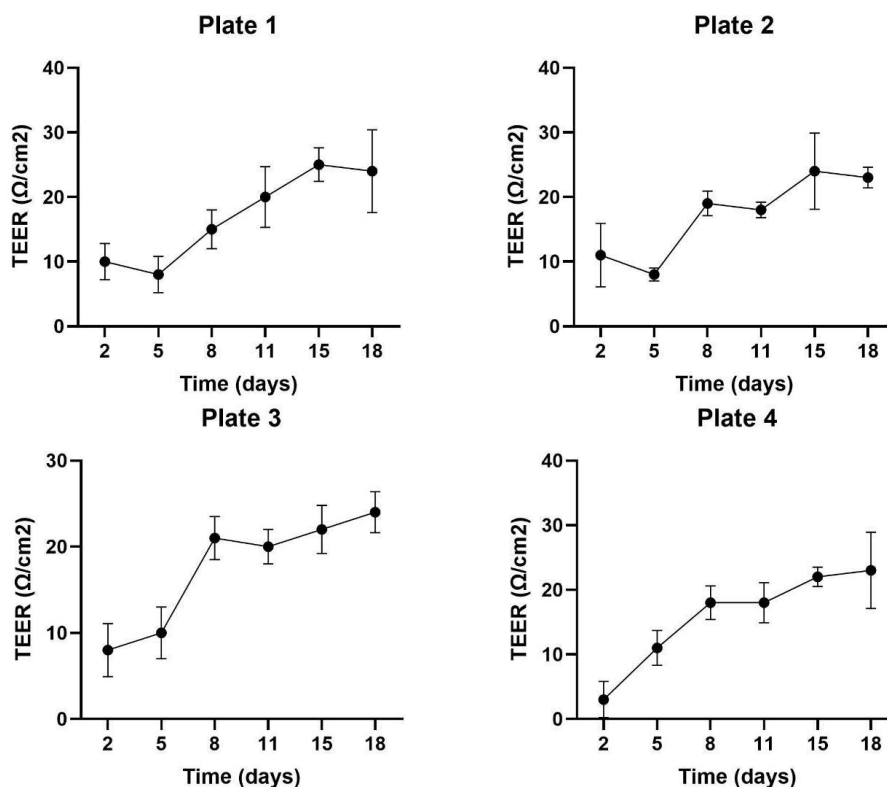
For eksempel, i Figur 41A falt den metabolske aktiviteten til cellene eksponert for Zn i komplett medium signifikant ved konsentrasjoner over 50 μM og forble lik på høyere doser av Zn (100–800 μM). I Figur 41B reduserte den metabolske aktiviteten til cellene betydelig ved konsentrasjoner over 25 μM og fortsatte å synke ved høyere konsentrasjoner (50–800 μM). I Figur 41C, hvor cellene opprinnelig ble dyrket i komplett medium og deretter eksponert for Zn i forberedt ferskvannsmedium, fortsatte cellene å vokse opp til 75 μM , etterfulgt av en betydelig reduksjon i celleleviabilitet ved eksponering for høyere doser av Zn (100–200 μM). Basert på alle målingene av celleleviabilitet for de forskjellige Zn-konsentrasjonene i de ulike mediene, ble 25 μM valgt for de følgende fettsyre-eksperimentene (FA).



Figur 41 Normalisert celleindeks for RTgutGC-celler eksponert for Zn. Øverste panel (A): Eksponering for sink med celler dyrket kun i normalt medium og eksponert for sink. Mellomste panel (B): Eksponering for sink med celler dyrket i forberedt medium og eksponert for sink. Nederste panel (C): Eksponering for sink med celler dyrket i normalt medium, etterfulgt av forberedt medium, og eksponert for sink.

Cellepermeabilitet

Sink-FA-transport TEER-verdiene (transepithelial electrical resistance) økte og stabiliserte seg på et gjennomsnitt på 20 Ω cm² etter 18–20 dager med kultur, med signifikante forskjeller observert over tid (Figur 42). TEER-verdiene nådde et stabilt platå etter omtrent 10–12 dager og forble stabile.

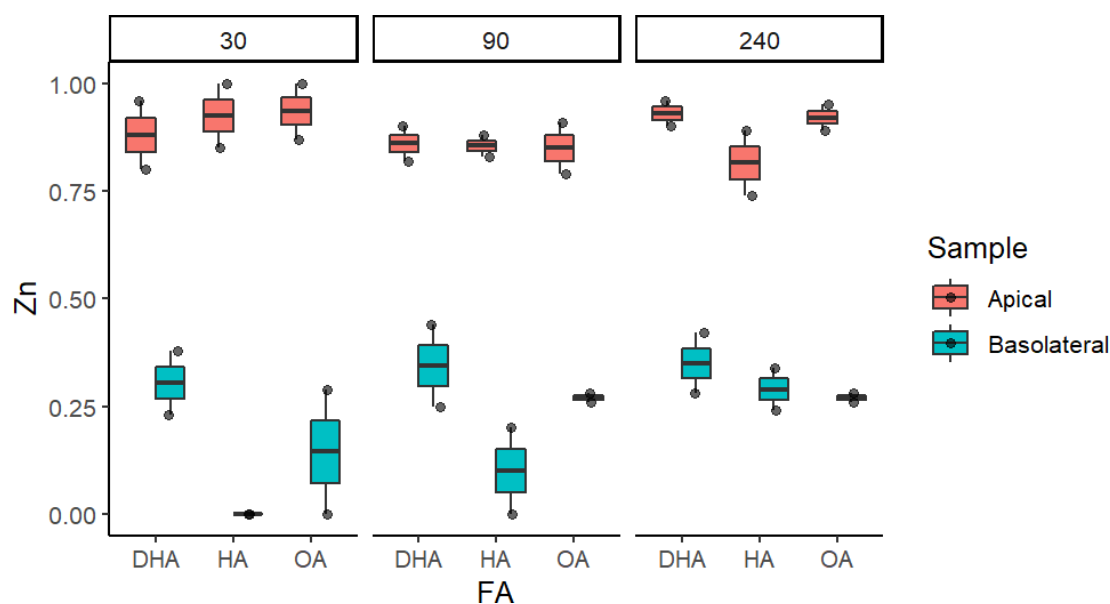


Figur 42 Transepithelial elektrisk motstand (TEER) av RTgutGC-celler. Cellene ble sådd med en tetthet på 75 000 celler/cm² på transwell-membraninnsatser (0,4 μ m porestørrelse) og dyrket i opptil 18 dager.

Zn-konsentrasjonene ble analysert i ulike fettsyrebehandlinger (FA): dokosaheksaensyre (DHA), heksansyre (HA) og oljesyre (OA) ved fire tidspunkter (30, 90, 240 og 960 minutter) i både apikale og basolaterale rom for å studere Zn-opptaket i RTgutGC-cellene. En konsentrasjon på 200 μ M ble valgt for alle fettsyrebehandlinger basert på tidligere studier.

Dataene er presentert som boksplott, som viser Zn-fordelingen (mg/kg) under hver betingelse. Zn-konsentrasjonen i det apikale rommet var signifikant høyere ($P < 0,05$) på tvers av alle fettsyrebehandlinger og lavere i de basolaterale Zn-nivåene ved eksponering mellom 30–240 minutter, noe som indikerer minimal Zn-translokasjon på disse tidspunktene (Figur 43).

Etter 960 minutter (16 timer) nærmet imidlertid konsentrasjonen av Zn i begge rom seg nesten likevekt. Dette indikerer at et tidsrom mellom 30–240 minutter kan være et bedre vindu for å forstå Zn-opptaket i RTgutGC-cellene. En merkbar forskjell dukket opp i basolaterale Zn-konsentrasjoner, spesielt for DHA- og HA-behandlingene ved 240 minutter, som viste en liten økning sammenlignet med tidligere tidspunkter (~0,35 mg/kg for DHA, ~0,30 mg/kg for HA). De apikale Zn-nivåene forble høye (0,92–0,93 mg/kg) for DHA og OA, med en liten nedgang i HA (~0,82 mg/kg).



Figur 43 Zn nivå i serum på den apikale siden og den basolaterale siden av RTgutGC dyrket på «transbrønnmembrane inserts» eksponert for forskjellige fettsyrer (DHA, HA, eller OA) i 30, 90 og 240 min.

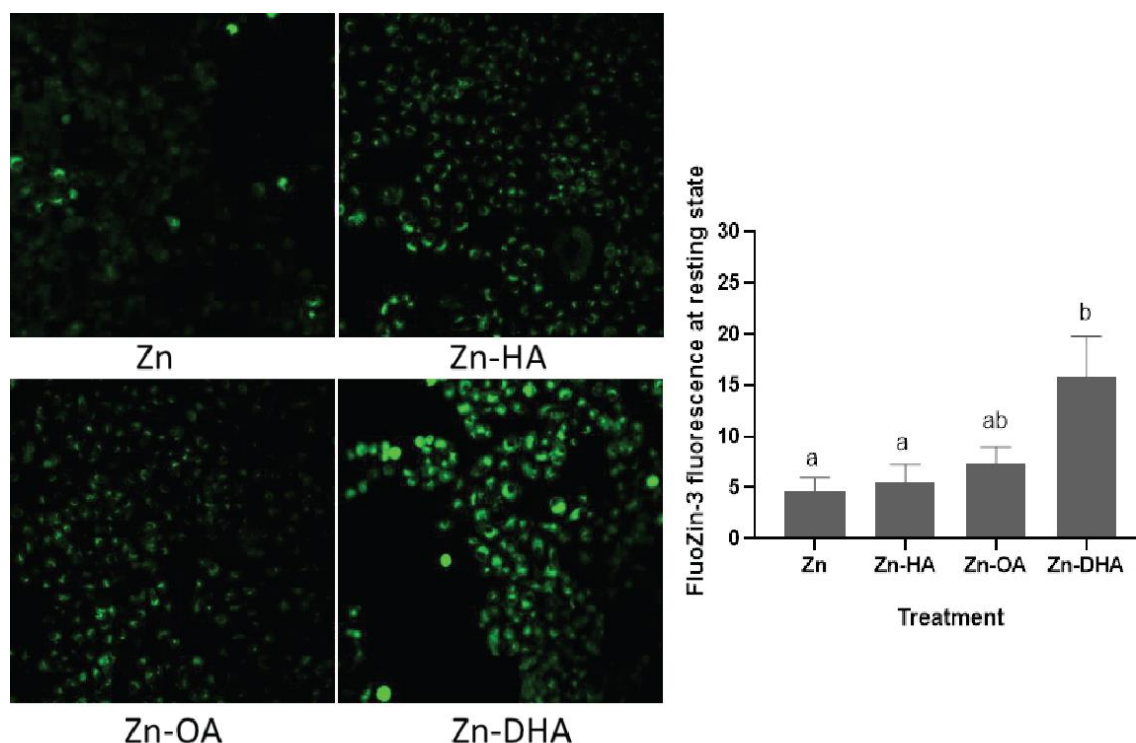
Måling av fluorescensintensiteter av Zn på tvers av fettsyrebehandlinger

Bildeanalysen ble utført ved hjelp av ImageJ. Enkeltcelleanalyser ble utført som beskrevet av Han et al., (2018). Kort fortalt ble 13 celler tilfeldig valgt, og hver celle ble definert som et individuelt interesseområde (ROI).

Bakgrunnsfluorescens ble beregnet ved å gjennomsnittlig signalintensitetene til et område uten celler. Fluorescensintensiteten til FluoZin-3 for hver ROI ble beregnet ved å trekke fra bakgrunnsfluorescensen fra de rå gjennomsnittlige fluorescensintensitetene for hver kanal.

FluoZin-3-fluorescensintensitet har blitt mye brukt for å estimere intracellulære Zn-nivåer. Det bør også bemerkes at fluorescenssignalet (F) ikke bare avhenger av Zn-nivået, men også av mengden fargestoff til stede i en celle eller i et organelle.

Fra Figur 44 kan det tolkes at Zn eksponert med DHA etter 60 minutter hadde signifikant høyere ($P < 0,05$) Zn-opptak i cellene sammenlignet med HA. Effekten av DHA var nesten tre ganger høyere enn kontrollen (kun Zn), mens OA hadde en moderat effekt, og HA viste ingen signifikant forskjell fra Zn alene ($P > 0,05$). Disse resultatene tyder på at DHA kan spille en unik rolle i Zn-absorpsjon eller cellulært opptak. Videre studier vil inkludere mer presise beregninger av Zn-nivåer ved å normalisere hviletilstanden av fluorescens til apo-tilstanden av fluorescens etter behandling med TPA (F/F_{min}), hvor F_{min} gir en Zn-uavhengig indikator på mengden fargestoff i hver celle (Han et al., 2018).



Figur 44 Venstre panel: RTgutGC eksponert for Zn med 3 μM FluoZin-3 i fosfatfri HBSS-buffer, alene, med HA, OA eller DHA. Høyre panel: Intensiteten av fluorescensen målt i cellene i de fire behandlingene. Jo mer Zn i cellene jo sterkere fluorescens.

5.4.4 Hovedfunn A1.1. Zn opptak i tarmceller og effekt av DHA

Her viser vi at det er mulig å måle opptak og transport av Zn med begge metodene brukt i denne studien. RTgutGC dyrket på membran transporterer Zn gjennom cellene til det basolaterale miljøet. Det vil derimot oppstå likevekt mellom det apikale miljøet og det basolaterale etter ca. 16 timer. Våre resultater viser at transporten er mest dynamisk mellom 30 og 90 min. eksponeringstid. Ved målinger basert på fluorescens markør som reagerer med Zn i cytol, har vi gode resultater med eksponeringstid på helt opp til 16 timer.

Begge metodene viser samme trend; DHA øker opptak og transport av Zn i forhold til kontroll, det ser også ut til at den enumettede fettsyren oljesyre også har en positiv effekt på Zn opptak og transport i RTgutGC i forhold til kontroll og den korte heksansyren.

Disse resultatene er basert på få målinger, og må derfor repeteres for å bekrefte resultatene. På den annen side så gir uavhengige forsøk med forskjellig måle metode samme trend, hvilket øker styrken av resultatene.

5.5 A1.4. Behov for EPA til post smolt i gjennomstrømningsanlegg (FT) sammenlignet resirkuleringsanlegg (RAS) (Nofima ansvarlig, samarbeid med GU, HI)

Medforfattere: Bente Ruyter, Nini Sissener, Kiran Subash, Marta Bou, André Meriak, Anne Marie Langseter og Gerd Berge

Formål:

Gjennomføre fôringsforsøk i to produksjonssystemer, henholdsvis gjennomstrømming (FT) og resirkulering (RAS) for å øke kunnskapen om hvordan produksjonssystem og forhøyet nivå av eikosapentaensyre (EPA) i dietten vil påvirke ytelse og helse til post-smolt.

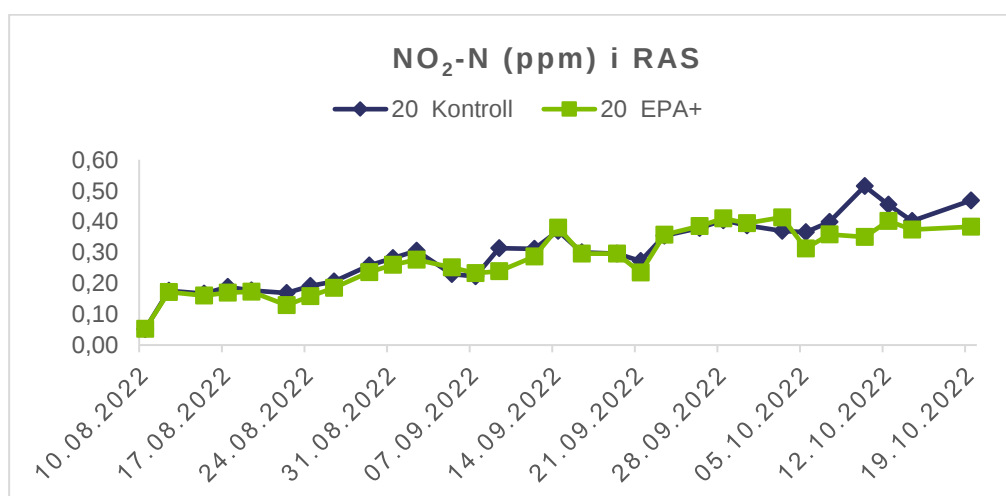
I et tidligere FHF prosjekt #901265 viste analyser fra kommersielle anlegg en trend til at nivå av EPA var ulikt i barrierevev til post-smolt i RAS sammenlignet med FT. Derfor er det viktig å undersøke om laksen har ulikt behov for EPA i RAS sammenlignet med FT.

5.5.1 Forsøksdesign

Fôringsforsøket startet opp 9. august 2022. Det ble benyttet 600 post-smolt (ER-4-21). 50 forsøksfisk med en gjennomsnittlig startvekt på 101 g ble jevnt fordelt på 6 FT kar og 6 RAS kar med samme vannvolum (500 l), 3 kar per diettgruppe. Forsøksfisk i både RAS- og FT-kar ble føret de samme to diettene, enten en kontrolldiett med tilnærmet kommersielt nivå av EPA (Ktr) eller en diett med høyere nivå av EPA (EPA+) i 76 dager under kontinuerlig lys fram til forsøksavslutning 24.-25. oktober. Vannkvalitetsparametere, fôringsregime, lysregime og fysisk-kjemiske parametere ble tilstrebet holdt mest mulig identisk mellom de to systemene (Tabell 13). RAS hadde en vannutvekslingshastighet på 22 % per dag (175 ml/minutt), noe som medførte god vannkvalitet og en relativ moderat økning i NO₂ i RAS gjennom forsøket (Figur 45).

Tabell 13 Gjennomsnittlige vannkvalitetsparametere, temperatur, oksygeninnhold, salinitet, Ph, og nitrogenforbindelser gjennom forsøksperioden for de to systemene RAS og FT

	RAS	FT
Temperatur (°C)	12,3 (11,9 - 12,6)	12,0 (11,0 - 13,0)
Oksygen (%)	87,5 (78,5 - 97,0)	87,3 (78,4 - 94,0)
Salinitet (‰)	33,0 (32,4 - 33,5)	32,9 (32,4 - 33,5)
pH	7,7 (7,4 - 8,0)	
TAN (NH ₃) (ppm)	0,50 (0,43 - 0,59)	
NO ₂ -N (ppm)	0,29 (0,05 - 0,30)	



Figur 45 Gjennomsnittlig økning i NO₂ nivået (ppm) i vann for tre forsøkskar i diettgruppene Ktr og EPA+ gjennom hele forsøksperioden i RAS

Fôrsammensetning

De to forsøksfôrene med pelletstørrelse på 3,5 mm, ble produsert ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen (Tabell 14-Tabell 15). Kontrollfôret hadde et EPA-innhold på 9,73 mg EPA/g fôr og EPA+ fôret hadde et EPA-innhold på 14,55 mg EPA/g fôr. Fôrene var iso-energetiske og inneholdt 46 % protein, 25 % fett, 6,9 % stivelse, 8,2 % aske og 6,5 % vann med et energiinnhold på 22,1 MJ/Kg. 100 mg/kg yttriumoksid (Y₂O₃) ble tilsatt både Ktr og EPA+ diettene som en markør for fordøyelighetsestimering av mineraler. Det ble benyttet automatiske båndmatere med en fôringsfrekvens hvert 15. minutt. Mengden fôr som ble gitt var i henhold til fôringstabeller og forventet veksthastighet og justert i henhold til observert appetitt.

Tabell 14 Fôrsammensetning

	Ktr	EPA+
Formulering (%)		
Fiskemel	30,0	30,0
Soya SPC >62 %	17,0	17,0
Hvetegluten	15,00	15,00
Hvete	11,8	11,8
Fiskeolje 19/21, (coating)	0	4,8
Fiskeolje 19/21	0,54	0,54
EpaxEPA6015 (coating)	0	1,46
Rapsolje	2,29	2,29
Rapsolje (coating)	10,48	11,74
Lecithin, (raps)	0,5	0,5
Mono-calcium Phosphate (MCP)	2,5	2,5
Vitamin premix	0,5	0,5
Carop, Pink (10 % astax)	0,05	0,05
Yttrium oxide	0,01	0,01
L-Lys (79 %)	0,35	0,35
L-Threonine	0,2	0,2
L-Methionine	0,04	0,04
L-Histidine	0,25	0,25
Kjemisk sammensetning		
Vann (%)	6,5	6,5
Protein - (%)	46,0	46,0
Fett - (%)	24,0	25,0
Aske (%)	8,2	8,2
Energi (MJ/Kg)	22,1	22,1
Mineraler		
Fosfor - total (%)	1,01	1,01
Calcium (%)	0,73	0,73
Zinc total, mg/kg	180	120

Tabell 15 Analysert kjemisk sammensetning og % EPA og DHA av totale fettsyrer av fôrene

	Ktr	EPA+
Tørrstoff (%)	93,3	92,5
Aske (%)	7,9	7,9
Protein (%)	46,4	45,8
Fett% (Folch)	26,7	27,9
Energi (MJ/kg)	22,7	22,3
% av totale fettsyrer		
EPA	3,8	5,4
DHA	4,3	3,6
EPA+DHA	8,2	9,0

Tabell 16 Fettsyresammensetning av fôrene(mg/g)

Fettsyrer	Ktr	EPA +
14:0	8,2	5,3
16:0	25,4	20,8
18:0	5,1	4,6
20:0	0,9	1,0
ΣSFA¹	41,1	33,2
16:1 n-7	5,7	3,6
18:1 n-9	81,1	97,3
18:1 n-7	5,9	6,0
20:1 n-9	11,1	9,8
22:1 n-11	13,9	11,4
ΣMUFA²	122,4	132,5
18:2 n-6	33,4	40,8
18:3 n-6	0,1	0,3
20:2 n-6	0,4	0,3
20:4 n-6	0,5	0,8
Σn-6	34,4	42,1
18:3 n-3	10,0	12,2
20:4 n-3	0,9	0,8
20:5 n-3	9,7	14,5
22:5 n-3	1,0	0,8
22:6 n-3	11,1	9,8
Σn-3	32,7	38,1
ΣPUFA³	67,1	80,2
EPA+DHA	20,8	24,4
n-3/n-6	0,95	0,9
Others⁴	7,89	6,02

¹Σ SFA inkluderer 15:0, 17:0, 22:0.

²Σ MUFA inkluderer 14:1n-5, 15:1,17:1n-7, 22:1n-7, 22:1n-9, 24:1n-9, 24:1n-9

³Σ PUFA er summen av Σ n-6 og Σ n-3.

⁴Σ Others ikke identifisert.

5.5.2 Metodikk

Ved avslutning av forsøket ble all forsøksfisk avlivet med en overdose av Finquel (1000 mg/g, Nederland). Det ble tatt vevsprøver av lever, hjerte, tarm, gjeller og NQC av 10 fisk per kar. Lever og hjerte ble veid for å beregne hepatosomatisk indeks (HSI) og kardiosomatisk indeks (CSI). Vevsprøver ble frosset på flytende nitrogen og også fordelt på RNA later.

Det ble tatt sampleprøve av faeces fra de resterende fiskene per kar ved å stryke fisken som beskrevet av Austreng, E. (1978). Samleprøver fra hvert kar ble frosset og lagret ved -20 °C. prøvene ble frysetørket før analyse.

Formler:

$$\text{Kondisjonsfaktor (K-faktor)} = \frac{\text{Kroppsvekt (g)}}{\text{Lengde (cm)}^3} \times 100$$

$$\text{Leverindeks (hepatosomatisk indeks, HSI)} = \frac{\text{Levervekt (g)}}{\text{Rundvekt (g)}} \times 100$$

$$\text{Hjerteindeks (kardiosomatisk indeks, CSI)} = \frac{\text{Hjertevekt (g)}}{\text{Rundvekt (g)}} \times 100$$

$$\text{Spesifikk vekstrate (SGR)} = \left[\left(\frac{W_2}{W_1} \right)^{\frac{1}{d}} - 1 \right] \times 100$$

$$\text{Vekstfaktor (termisk vekstkoeffisient, TGC)} = \left(\frac{\sqrt[3]{W_2} - \sqrt[3]{W_1}}{T \times d} \right) \times 1000$$

W2 er vekten på fisken ved slutten av forsøket (g), W1 er vekten på fisken i begynnelsen av forsøket (g), d er totalt antall dager, T er gjennomsnittstemperatur (°C)

Beregning av fordøyelighetskoeffisient (ADC):

$$\text{ADC (\%)} = (100 [(M_{\text{fôr}} \times N_{\text{faeces}}) / (M_{\text{faeces}} \times N_{\text{fôr}})]) \times 100$$

M-fôr – Konsentrasjon av markør (Y2O3) i fôret i mg/kg, M-faeces – Konsentrasjon av markør (Y2O3) i avføringen i mg/kg, N-fôr – Konsentrasjon av næringsstoff (mineral) i fôret i mg/kg, M-faeces – Konsentrasjon av næringsstoff (mineral) i avføringen i mg/kg.

Analyser

Fett, fettsyrer og lipidklasser ble analysert som beskrevet i Bou et al., 2017. **Mineralanalyse** av faeces ble utført av Biolab, Nofima, Bergen. Nivåene av P, Mg, Zn og Ca ble bestemt ved bruk av induktivt koblet plasmaoptisk emisjonsspektroskopi (ICP-OES) (Agilent 5110 VDV, Agilent Technologies, Mulgrave, Australia). ICP-OES-elementbestemmelsesbetingelsene var i samsvar med NS:EN 15621:2017-metoden tilpasset OES. Et eksternt laboratorium (Eurofins, Molde, Norge) undersøkte seleninnholdet i alle prøvene. **Genuttrykk** ble analysert som beskrevet Lutfi et al., 2022.

Tabell 17 Oversikt over genbanknumre og primersekvenser

Gene	Accession no.	Direction	Primer sequence 5'→3'
ef1a	AF321836	Forward	CACCACCGGCCATCTGATCTACAA
		Reverse	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC
rpol2	CA049789	Forward	TAACGCCTGCCTCTTCACGTTGA
		Reverse	ATGAGGGACCTTGTAGCCAGCAA
eif-3	DW542195	Forward	CAGGATGTTGTTGCTGGATGGG
		Reverse	ACCCAAGTGGGCAGGTCAAGA
LPCAT	NM_001141753	Forward	TCGGACTGGTTTTGGCTCTC
		Reverse	CGCTGCAACTATTTGGCGTT
AGPAT3	NM_001140138	Forward	CTTCCAGAACAAAGGTCTGTGGT
		Reverse	TATGGTGCATTCTGTCCCCG
GPAT3	NM_001141489	Forward	CTCGCTAAGACAACGAAGAGGT
		Reverse	CAGAGAGGTCTGTCATGCACT
AGPAT4	NM_001141264	Forward	AGAAAGGCCTGCCTAAACTCA
		Reverse	ATGTGTAGCATTTTGTGATTCTGGA
GPAT4	NM_001140176	Forward	GCTGCTATGCAATGGTTGGG
		Reverse	AGACTCGAGCGGACTGACTT
chk	DY706802	Forward	CTCAAGTTTGCCCGTCTGAT
		Reverse	CACAGGGGAATGAGTGGAGT
slc44a2	NM_001140367	Forward	TCGTCATCATTTTGCTGCTC
		Reverse	AGGCGATGACAATGGATAGG
pemt	XM_014158251	Forward	GTTGCTGTCATCGCCATCAT
		Reverse	GAGGAGGATGATGAGGGTGC

Histologi av skinn ble analysert med Aiforia (Nofimas digitale histopatologiske analyseplattform), og en algoritme utviklet for å evaluere skinnkvalitet ⁴⁷.

Statistikk: Kar ble brukt som eksperimentell enhet. En toveis variansanalyse (toveis ANOVA) ble brukt for å teste effekten av produksjonssystem (RAS vs FT) og diett på produksjonsparametere, fordøyelighet av mineraler, total fettsyresammensetning og fettinnhold, relative nivåer og forhold mellom PL-klasser, fettsyresammensetning av fosfolipidklasser og relativt genuttrykk. Forskjellen ble ansett som signifikant ved $P < 0,05$. P-verdier ble inkludert og tolket som trender når de faller mellom 0,05 og 0,10. Disse statistiske analysene ble utført ved hjelp av programvaren SAS (SAS institute Inc., Cary, NC, 1989-2007).

5.5.3 Resultat og diskusjon A1.4, RAS/FT: Vekst, fettsyresammensetning, stress, barrierevev, helsemarkører

Vekst

Tabell 18 viser at laksen i gjennomstrømmingssystemet (FT) hadde signifikant høyere tilvekst gjennom forsøksperioden sammenlignet med laksen i resirkuleringsanlegget (RAS). Dette resulterte i høyere sluttvekt og kondisjonsfaktor for FT-gruppen. Det ble ikke observert noen signifikante effekter av fôrsammensetningen på tilvekst eller organindekser.

Tabell 18 Tilvekst og organindekser til Atlantisk laks føret henholdsvis kontrollfôr Ktr og økt nivå av EPA (EPA+) i RAS og FT i RAS, toveis ANOVA er benyttet til å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Standard error means (SEM) er representert som pooled S.E.M., $P < 0,05$ er signifikant.

	RAS		FT		Pooled S.E.M	Modell	Toveis ANOVA P-verdier		
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+			System FT/RAS	Diett Ktr/EPA+	Interaksjon
Startvekt (g)	101,0	101,0	101,0	101,0	0,0	0,97	0,74	0,74	1,00
Sluttvekt (g)	406,6	400,9	435,9	439,0	2,98	<,0001	<,0001	0,68	0,18
SGR	1,85	1,83	1,92	1,93	0,01	0,89	0,0004	<,0001	0,57
TGC	3,01	2,97	3,17	3,19	0,02	0,91	0,0002	<,0001	0,51
K-faktor	1,4	1,4	1,4	1,5	0,01		0,003	0,0006	0,18
Hepatosomatisk index (HSI)	1,1	1,1	1,2	1,2	0,04	0,24	0,06	0,54	0,89
Hjerte index	0,15	0,14	0,15	0,15	0,01	0,07	0,89	0,8	0,61

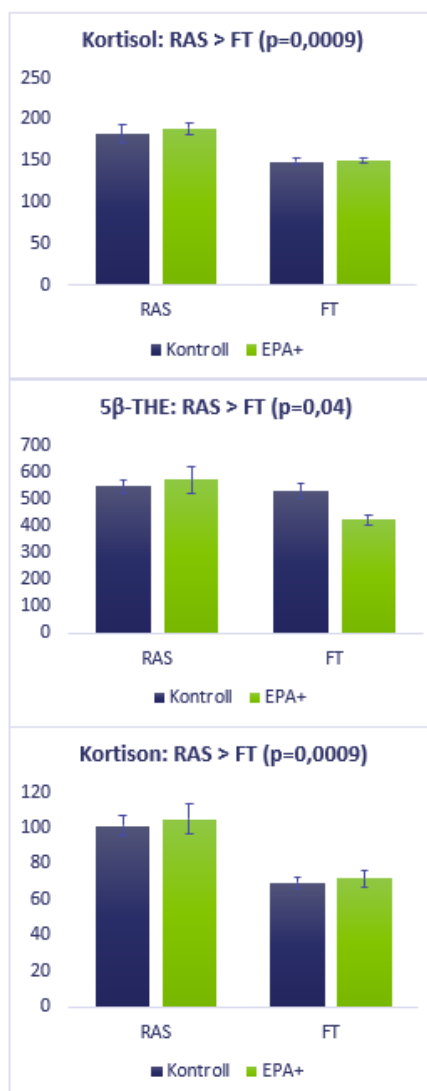
Fordøyelighet av mineraler og nivå av stressmarkører i faeces

Tabell 19 viser en Zn-fordøyelighet på ca. 22 % og en P-fordøyelighet på ca. 46 % i begge diettgrupper. Det var ingen signifikant effekt av produksjonssystem på fordøyelighet av Zn og P.

Tabell 19 Fordøyelighetskoeffisient for mikronæringsstoffene fosfor (P) og sink (Zn) i de to produksjons-systemene, RAS og FT, etter føring med Ktr og EPA+-diett. Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Gjennomsnittsverdier i prosent og pooled S.E.M. $P < 0,05$ = signifikant.

	RAS		FT		Pooled S.E.M	Modell	Toveis ANOVA P-verdier		
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+			System (FT/RAS)	Diett (Ktr/ EPA+)	Interaksjon
P (%)	44,9	46,2	46,0	46,3	2,56	0,91	0,70	0,63	0,74
Zn (%)	21,5	20,0	23,5	21,2	2,57	0,45	0,31	0,24	0,79

Figur 46 viser konsentrasjon av stressmarkørene kortisol, 5 β -hydrokortisol, og kortison i faeces. Det var ingen effekt av diett på disse stressmarkørene, men alle tre stressmarkører var signifikant høyere i RAS enn FT.



Figur 46 Konsentrasjon av stressmarkørene cortisol, 5β-hydrocortisol, og kortison i fæces fra diettgruppene Ktr og EPA+. Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Gjennomsnittsverdier ng/ml ±S.E.M. $P < 0,05$ regnes som signifikant.

Fett og fettsyresammensetning av muskel

Tabell 20 viser den totale fettsyresammensetningen i norsk kvalitetssnitt av muskel (NQC). Fettsyresammensetningen av muskel var ikke påvirket av produksjonssystem, men reflekterte i stor grad sammensetningen av forsøksfødrene. Hovedforskjellen var signifikant høyere nivåer av EPA og DPA i de to EPA+ diettgruppene.

Tabell 20 Totale fettsyrer i NQC (% av TFA) til laks i de to diettgruppene Ktr og EPA+ holdt i to produksjonssystem RAS og FT. Resultatene er vist som gjennomsnittsverdier per kar (n=3) og standard error of mean (S.E.M). Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). $P < ,05$ regnes som signifikant.

	RAS		RAS		FT		FT		P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi
	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Modell	System	Diett	Interaksjon
Fett%	8,3	0,21	8,3	0,06	8,3	0,12	9,4	0,74	0,22			
14:0	2,7	0,01	2,0	0,03	2,4	0,31	2,0	0,01	0,04	0,32	0,01	0,43
16:0	12,0	0,10	11,0	0,16	11,2	0,84	10,9	0,04	0,33			
18:0	2,8	0,05	2,8	0,10	2,8	0,10	2,8	0,02	0,95			
20:0	0,4	0,01	0,4	0,03	0,4	0,01	0,4	0,00	0,23			
22:0	0,2	0,01	0,3	0,01	0,2	0,02	0,2	0,01	0,03	0,10	0,02	0,10
Sum SFA	18,4	0,17	16,9	0,31	17,4	1,26	16,6	0,08	0,28			
16:1n7	2,1	0,02	1,6	0,02	2,1	0,04	1,6	0,01	<,0001	0,62	<,0001	0,94
18:1n9	33,8	0,14	35,5	0,22	36,0	2,20	36,0	0,10	0,48			
18:1n7	2,6	0,02	2,5	0,01	2,7	0,11	2,5	0,00	0,17			
20:1n11	0,7	0,01	0,8	0,02	0,7	0,04	0,7	0,00	0,09	0,10	0,06	0,35
22:1n11	4,7	0,05	3,6	0,03	3,7	1,01	3,6	0,01	0,41			
22:1n9	0,7	0,01	0,7	0,01	0,7	0,04	0,7	0,00	0,37			
24:1n9	0,6	0,01	0,6	0,01	0,5	0,07	0,6	0,01	0,51			
Sum MUFA	52,2	0,08	51,2	0,20	52,5	0,44	51,4	0,32	0,04	0,40	0,008	0,80
18:2n6	12,1	0,07	12,9	0,11	13,0	0,92	13,0	0,04	0,45			
18:3n6	0,3	0,01	0,3	0,01	0,3	0,03	0,3	0,00	0,28			
18:3n3	3,2	0,06	3,5	0,02	3,7	0,51	3,5	0,02	0,66			
20:4n3	0,6	0,01	0,5	0,02	0,6	0,08	0,5	0,02	0,23			
20:1n9	5,0	0,03	4,4	0,02	4,5	0,61	4,4	0,01	0,39			
20:2n6	1,1	0,00	1,2	0,00	1,1	0,02	1,2	0,01	0,0005	0,75	<,0001	0,08
20:3n6	0,5	0,00	0,4	0,01	0,4	0,06	0,5	0,02	0,49			
20:4n6	0,2	0,01	0,3	0,01	0,2	0,01	0,3	0,00	<,0001	0,54	<,0001	0,54
20:3n3	0,3	0,01	0,3	0,01	0,3	0,04	0,3	0,00	0,81			
20:5n3	2,3	0,03	3,4	0,09	2,4	0,16	3,3	0,02	<,0001	0,71	<,0001	0,38
22:5n3	0,9	0,01	1,2	0,03	1,0	0,12	1,2	0,01	0,02	0,41	0,005	0,41
22:6n3	6,4	0,12	6,0	0,10	5,5	0,69	6,2	0,14	0,40			
EPA + DHA	8,6	0,12	9,4	0,19	7,9	0,54	9,5	0,14	0,01	0,30	0,003	0,20
sumN3	13,7	0,17	15,0	0,21	13,4	0,13	15,0	0,15	0,0002	0,59	<,0001	0,45
sumN6	14,2	0,07	15,2	0,12	15,0	0,86	15,2	0,03	0,35			

Mineraler og helsemarkører i serum

Tabell 21 viser ingen signifikante forskjeller i serumnivåene av mineralene Cl, Na, K, Ca og P mellom de ulike diettgruppene og produksjonssystemene. Det ble imidlertid observert en tendens til høyere ureakonsentrasjon i serum hos fisk i resirkulerende akvakultursystemer (RAS) sammenlignet med fisk i gjennomstrømmingssystemer (FT). Dette kan sannsynligvis tilskrives det høyere nivået av nitrogenforbindelser i vannet til RAS-fisk.

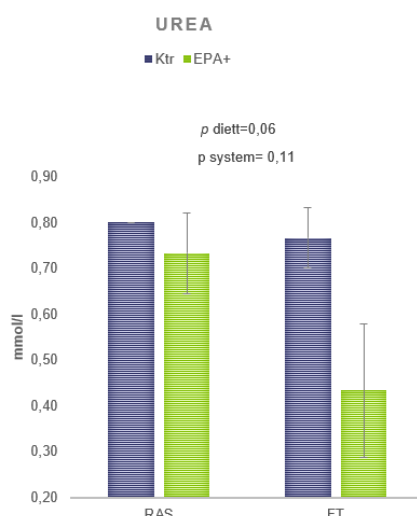
Interessant nok førte økt innhold av EPA, særlig i FT-systemet, til redusert ureakonsentrasjon i serum (Figur 47). Selv om dette fenomenet ikke er grundig undersøkt hos fisk, kan det trekkes paralleller til studier på mennesker. Enkelte humanstudier har indikert at et høyere inntak av EPA fra sjømat kan være assosiert med lavere risiko for nyresykdom. Dette antas å være relatert til EPAs betennelsesdempende egenskaper, som mulig kan redusere opphopning av urea - et nitrogenholdig avfallsstoff som filtreres av nyrene (Garman et al., 2009).

Det er viktig å merke seg at forskningen på dette området ikke er entydig. Mens noen studier antyder en positiv effekt av omega-3 fettsyrer på nyrefunksjon, viser andre ingen signifikant påvirkning. Ytterligere forskning er nødvendig for å fullt ut forstå sammenhengen mellom EPA-inntak og ureakonsentrasjon i fisk, samt de underliggende mekanismene.

Serumnivåene av leverenzymene ASAT (aspartat aminotransferase) og ALAT (alanin aminotransferase) ble signifikant påvirket av både produksjonssystem og diett. Høyere verdier av disse enzymene ble observert hos fisk i FT-systemet sammenlignet med RAS, noe som sannsynligvis henger sammen med det høyere fettnivået i leveren til fisk i FT (Figur 48). Tidligere studier har vist at økt fettnivå i leveren kan føre til høyere nivåer av ASAT og ALAT i plasma. I FT-systemet førte økt EPA-nivå i dietten til lavere verdier av både ASAT og ALAT, mens denne effekten ikke ble observert hos fisk i RAS-systemet.

Tabell 21 Konsentrasjon av mineraler, urea og glukose. ASAT og ALAT i serum til laks i de to diettgruppene Ktr og EPA+ holdt i to produksjonssystem RAS og FT. Resultatene er vist som gjennomsnittsverdier per kar (n=3) og standard error of mean (S.E.M). Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). $P < ,05$ regnes som signifikant.

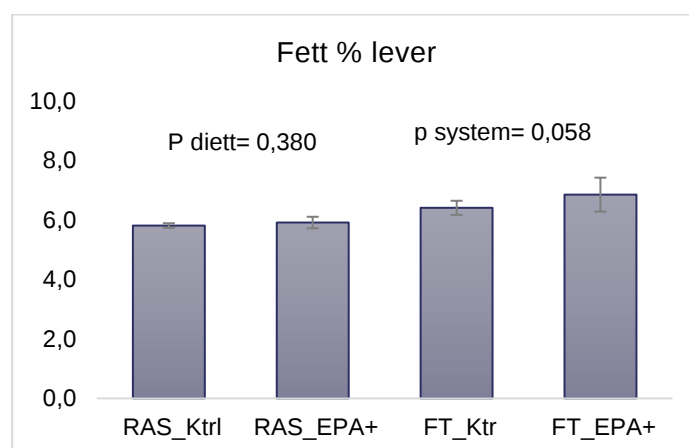
	RAS		RAS		FT		FT		P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi
	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Modell	System	Diett	Interaksjon
Cl (mmol/l)	133,3	0,88	132,3	0,88	131,0	0,00	133,0	0,00	0,11	0,22	0,45	0,04
Na (mmol/l)	161,3	1,45	161,0	1,00	162,7	0,67	161,3	1,20	0,73	0,48	0,48	0,67
K (mmol/l)	1,0	0,15	1,0	0,21	0,7	0,03	1,3	0,30	0,36	1,00	0,21	0,21
Mg (mmol/l)	1,0	0,12	1,0	0,08	1,2	0,19	1,0	0,22	0,79	0,60	0,49	0,64
Ca (mmol/l)	3,4	0,08	3,4	0,10	3,5	0,09	3,2	0,13	0,27	0,37	0,23	0,18
P (mmol/l)	4,8	0,24	4,7	0,23	5,6	0,56	4,7	0,45	0,37	0,36	0,26	0,31
Urea (mmol/l)	0,8	0,00	0,7	0,09	0,8	0,07	0,4	0,15	0,07	0,11	0,06	0,18
Gluk (mmol/l)	5,1	0,15	5,0	0,12	5,4	0,26	4,9	0,15	0,32	0,47	0,17	0,29
ASAT (U/l)	519,9	73,9	567,8	96,6	1826,0	273,4	1081,6	150,4	0,002	0,0006	0,07	0,05
ALAT (U/l)	2,6	0,62	2,4	0,33	7,0	0,54	3,2	0,79	0,002	0,002	0,01	0,01



Figur 47 Konsentrasjon av urea (mmol/L) i serum til diettgruppene Ktr og EPA+ i RAS og FT. Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene ($n=3$). Gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M. $P < 0,05$ regnes som signifikant.

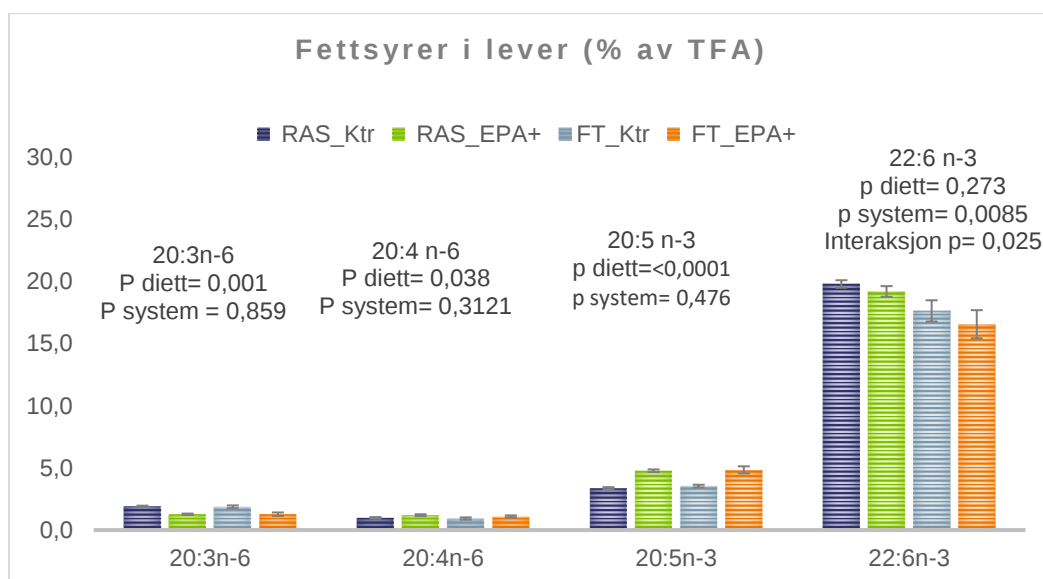
Fett, fettsyrer, stressmarkører og eikosanoider i lever

Figur 48 viser en tendens til høyere leverfettprosent i gjennomstrømmingssystemer (FT) sammenlignet med resirkulerende systemer (RAS) ($p=0,058$). Videre var det signifikant høyere nivåer av ARA og EPA i fisk føret med EPA+-dietten i begge produksjonssystemer (Figur 49), i samsvar med diettens sammensetning.

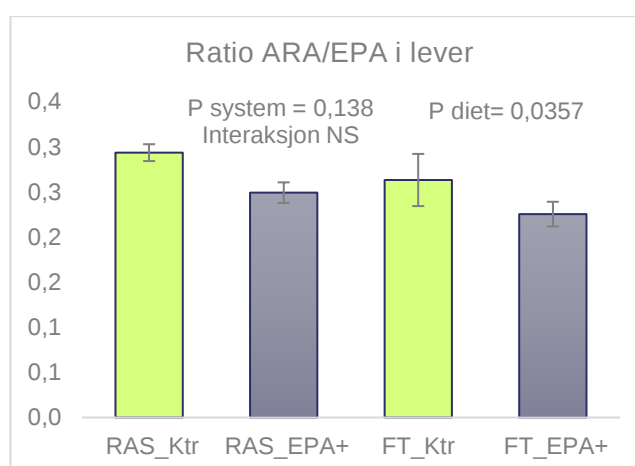


Figur 48 Leverens fettprosent hos laks fra kontroll- (Ktr) og EPA+-dieltgruppene i RAS og FT. For å analysere signifikante forskjeller mellom gruppene ble det utført en toveis variansanalyse (ANOVA) med tre replikater per gruppe ($n=3$). Resultatene presenteres som gjennomsnittsverdier i prosent $\pm$ S.E.M. Statistisk signifikans ble satt til $p < 0,05$.

Leverens DHA-innhold (i prosent av totale fettsyrer) var uavhengig av diettsammensetning (Figur 49), men viste signifikant variasjon mellom produksjonssystemer. Høyere DHA-prosent ble observert i RAS sammenlignet med FT. Dette kan sannsynligvis tilskrives den lavere totale fettprosenten i lever hos fisk i RAS, noe som resulterer i en konsentrasjonseffekt av DHA, i motsetning til en fortynningseffekt observert i FT-systemet. Figur 50 viser en tendens til høyere ratio av ARA/EPA i RAS sammenlignet med FT ($p=0,138$).



Figur 49 Utvalgte fettsyrer i prosent av TFA i lever til laks i diettgruppene Ktr og EPA+ i RAS og FT. Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Gjennomsnittsverdier i prosent $\pm$ S.E.M. $P < 0,05$ regnes som signifikant.



Figur 50 Ratio av ARA/EPA i total fettfraksjon fra lever til laks i diettgruppene Ktr og EPA+ i RAS og FT. Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M., $P < 0,05$ regnes som signifikant.

Tabell 22 viser konsentrasjonen av leukotriener og prostaglandiner og nivåer av Carnosic acid og carnosol i lever til laks. Det var ingen effekt på prostaglandinnivåene av PGE_2 og PGE_3 av hverken diett eller produksjonssystem. Både LTB_4 og LTB_5 hadde signifikant høyere konsentrasjon i lever til fisk fra RAS enn i FT. LTB_5 dannes fra EPA og er et eikosanoid som generelt er mindre potent og har mer anti-inflammatoriske egenskaper sammenlignet med LTB_4 som dannes fra ARA. LTB_4 kan bidra til inflammasjon i lever ved å øke produksjonen av proinflammatoriske cytokiner, mens LTB_5 kan motvirke noen av de proinflammatoriske effektene av LTB_4 i leveren.

Antioksidanten carnosol var signifikant høyere, mens antioksidanten carnosic acid var signifikant lavere i RAS enn FT. Carnosic acid og carnosol finnes i enkelte urteekstrakt fra f.eks rosmarin og salvie. Carnosic acid er vist å omdannes til carnosol under oksidative forhold, noe som kan tyde på høyere omdanning av carnosic acid til carnosol i RAS enn FT i vår studie. Begge stoffene er kraftige antioksidanter, men virker på ulike måter. Carnosic acid fungerer som en kjemisk quencher av reaktive oksygenforbindelser (ROS), mens carnosol hemmer lipidperoksidering direkte. Både carnosol og

carnosic acid har antiinflammatoriske effekter og er vist å hemme produksjonen av betennelsesfremmende stoffer som PGE₂, IL-1 β og TNF- α 1.

Tabell 22 Konsentrasjon (ng/g) av leukotriener og prostaglandiner og nivåer av Carnosic acid og carnosol i lever til laks i diettgruppene Ktr og EPA+ i RAS og FT. Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Data er oppgitt som gjennomsnittsverdier og S.E.M. P < ,05 regnes som signifikant.

	RAS		RAS		FT		FT		P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi
	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Modell	System	Diett	Samspill
LTB₄	2,49	0,46	2,68	0,24	0,46	0,07	0,52	0,07	<,0001	<,0001	0,65	0,82
LTB₅	8,38	2,34	6,32	1,55	1,23	0,19	1,32	0,26	0,001	0,0001	0,51	0,47
PGE₂	0,85	0,29	3,89	3,28	0,53	0,30	1,34	0,48	0,47	0,39	0,25	0,5
PGE₃	0,18	0,07	1,29	1,07	0,12	0,06	0,43	0,16	0,4	0,4	0,19	0,46
Carnosol	86,74	2,83	91,19	2,97	49,91	13,20	58,51	13,16	0,006	0,0006	0,49	0,83
Carnosic acid	0,33	0,16	0,28	0,28	25,61	8,30	12,00	5,42	0,001	0,0004	0,17	0,17

Fettsyresammensetning av ulike lipidklasser i gjeller

Total lipidfraksjon fra gjeller til fisk i RAS hadde en høyere prosentandel av palmitinsyre (16:0) og av den proinflammatoriske fettsyren arakidonsyre (ARA, 20:4n-6, Tabell 23) enn prøver fra fisk i FT. Samtidig hadde gjelleprøver fra fisk i RAS lavere nivåer av oljesyre (18:1n-9), totale enumettede fettsyrer (MUFA), linsyre (18:2n-6) og alfa-linoleninsyre (18:3n-3) sammenlignet med prøver fra FT (Tabell 23). Det ble ikke observert signifikante forskjeller i nivåene av eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) mellom de to produksjonssystemene. Fisk som ble føret med EPA+-dietten, viste høyere nivåer av EPA, ARA, dokosaheksaensyre (DPA, 22:5n-3) og MUFA i gjellene sammenlignet med fisk som fikk kontroldietten.

Tabell 23 Totale fettsyrer i gjeller (% av TFA) til laks i de to diettgruppene Ktr og EPA+ holdt i to produksjonssystem; RAS og FT. Resultatene er vist som gjennomsnittsverdier per kar (n=3) og S.E.M. Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). $P < ,05$ regnes som signifikant.

	RAS		FT		Toveis ANOVA				
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+	Pooled S.E.M	Modell	System (FT/RAS)	Diett (Ktr/EPA)	Interaksjon
Fett (%)	2.26	2.30	2.27	2.22	0.06	0.80	0.55	0.90	0.45
14:0	1,72	1,42	1,84	1,51	0,05	0,002	0,09	0,0004	0,77
16:0	16,30	15,96	15,45	15,36	0,11	0,0009	0,0002	0,08	0,29
18:0	4,05	4,45	4,10	4,08	0,13	0,19	0,26	0,19	0,15
20:0	0,23	0,25	0,26	0,26	0,01	0,54	0,28	0,45	0,59
Σ SFA¹	23,29	22,92	22,62	21,84	0,32	0,06	0,02	0,11	0,52
16:1n-7	2,34	1,93	2,13	1,69	0,12	0,03	0,10	0,009	0,90
18:1n-9	16,63	18,34	19,19	19,92	0,49	0,008	0,003	0,04	0,34
18:1n-7	1,66	2,01	1,78	1,75	0,15	0,48	0,67	0,34	0,26
20:1n-9	1,91	1,90	2,35	2,02	0,07	0,005	0,003	0,04	0,054
22:1n-11	0,98	0,86	1,55	1,09	0,06	0,0002	0,0002	0,001	0,03
Σ MUFA²	29,40	30,15	32,27	31,47	0,41	0,005	0,0009	0,95	0,10
18:2n-6	5,82	6,21	6,94	6,86	0,18	0,007	0,001	0,43	0,24
20:2n-6	0,88	0,97	0,94	0,96	0,03	0,23	0,52	0,09	0,29
20:3n-6	1,17	0,80	1,09	0,80	0,03	<,0001	0,21	<,0001	0,27
20:4n-6	2,65	3,24	2,38	2,81	0,09	0,0008	0,004	0,0004	0,40
Σ n-6³	10,65	11,62	11,39	11,57	0,25	0,08	0,21	0,047	0,15
18:3n-3	1,09	1,31	1,46	1,54	0,04	0,0003	0,0001	0,007	0,14
18:4n-3	1,27	1,00	1,00	1,03	0,13	0,45	0,39	0,39	0,29
20:5n-3	4,36	5,86	4,27	5,90	0,20	0,0005	0,90	<,0001	0,76
22:5n-3	0,97	1,35	1,00	1,34	0,04	0,0002	0,76	<,0001	0,68
22:6n-3	17,33	16,62	16,44	15,68	0,64	0,39	0,19	0,29	0,97
Σ n-3⁴	25,20	26,46	24,49	25,87	0,78	0,38	0,43	0,13	0,94
Σ PUFA⁵	37,79	39,73	37,59	39,24	0,99	0,39	0,74	0,11	0,89
EPA + DHA	21,70	22,49	20,71	21,58	0,84	0,55	0,29	0,35	0,96
n-3/n-6	2,37	2,28	2,15	2,24	0,05	0,09	0,04	0,97	0,12
Σ Andre ⁶	9,49	7,00	7,50	7,45	NA	NA	NA	NA	NA

¹Σ SFA inkluderer 15:0, 17:0, 22:0. ²Σ MUFA inkluderer 15:1, 17:1 Dimethyl, 17:1n-7, 16:1n-9, 18:1n-9T, 18:1n-11, 20:1n-7, 22:1n-7, 22:1n-9, 24:1n-9. ³Σ n-6 inkluderer 18:3n-6, 22:4n-6. ⁴Σ n-3 inkluderer 20:4n-3, 20:3n-3. ⁵Σ PUFA inkluderer 16:3 n-4.

Total lipidfraksjon ble deretter separert i ulike lipidklasser, fosfatidylcholine (PC), fosfatidyletanolamine (PE), fosfatidylserine (PS) og fosfatidylinositol (PI) og analysert for totalnivå og fettsyresammensetning av hver lipidklasse.

Tabell 24 viser at den totale mengden fosfolipider (mg/g) i gjellevevet hos atlantisk laks ikke ble påvirket av verken produksjonssystem eller diett. PC er den dominerende PL-klassen i gjellene og utgjør mer enn 50 % av total PL, noe som er mer enn dobbelt så mye som PE. PC og PE utgjør til sammen mer enn 80 % av total PL. Tilsvarende er prosentandelen av PS (9-10 % av total PL) mer enn dobbelt så høy som PI. De relative nivåene av hver enkelt fosfolipidklasse ble ikke signifikant påvirket av

produksjonssystem eller diett. Imidlertid viste konsentrasjonen av PE en tendens ($p=0,07$) til å være lavere i gjelleprøvene fra RAS-systemet enn fra FT.

Ratioen mellom de viktigste fosfolipidklassene indikerer at forholdet mellom PC og PE i RAS var 9-11 % høyere enn i FT og en lignende tendens ($p=0,08$) til økning i dette forholdet ble observert hos fisk fôret med EPA+-diett. Fosfolipidratioen PC/PE (fosfatidylkolin/fosfatidyletanolamin) spiller antagelig en viktig rolle for gjellenes funksjon ved å påvirke cellemembraners egenskaper. Denne ratioen har innflytelse på membranfluiditet, permeabilitet og stabilitet, som alle er kritiske for gjellenes evne til effektiv gassutveksling og ioneregulering. PC øker generelt membranfluiditeten og fleksibiliteten, mens PE bidrar til stabilitet og reduserer fluiditeten. Balansen mellom disse fosfolipidene påvirker også aktiviteten til membranproteiner, inkludert ionekanaler og transportproteiner som er essensielle for gjellefunksjonen. En optimal PC/PE-ratio er derfor avgjørende for gjellenes evne til å utføre sine viktige fysiologiske funksjoner og tilpasse seg ulike vannmiljøer, og denne ratioen kan variere mellom fiskearter og miljøforhold.

Tabell 24 Nivå av totale PL og prosentfordeling av ulike fosfolipidklasser, phosphatidylcholine (PC), phosphatidyletanolamine (PE), phosphatidylserine (PS) og phosphatidylinositol (PI) og ratioen mellom sentrale PL klasser i de to diettgruppene Ktr og EPA+ holdt i to produksjonssystem RAS og FT. Resultatene er vist som gjennomsnittsverdier per kar ($n=3$) og standard error of mean (S.E.M). Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene ($n=3$). $P < 0,05$ regnes som signifikant.

	RAS		FT		Pooled S.E.M	Modell	Toveis ANOVA P-verdier		
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+			System (FT/RAS)	Diet (Ktr/EPA)	Interaksjon
Σ PL1 (mg/g)	3,94	3,72	4,07	3,64	0,31	0,76	0,93	0,33	0,75
% PC	58,09	59,77	57,95	60,08	1,09	0,43	0,94	0,12	0,84
% PE	22,54	21,45	24,79	23,62	1,04	0,21	0,07	0,31	0,97
% PS	10,38	9,77	8,85	8,54	1,10	0,64	0,24	0,69	0,89
% PI	4,16	4,29	4,34	4,03	0,54	0,98	0,94	0,87	0,70
PC/PE	2,60	2,79	2,34	2,55	0,10	0,07	0,03	0,08	0,95
PC/PS	5,97	6,24	6,64	7,10	0,76	0,74	0,34	0,64	0,90
PE/PS	2,35	2,24	2,84	2,79	0,33	0,51	0,16	0,81	0,94

¹Σ PL er summen av alle PL klassene PC, PE, PS, in mg/g

Tabell 25 viser at fettsyreene 16:0, 18:1n-9, 20:5n-3 og 22:6n-3 var de mest sentrale i PC, med den høyeste prosentandel av 16:0 (ca. 27 %). Videre hadde forsøksfisk i RAS hadde 2-4 % høyere andel 16:0, 6-8 % lavere andel 14:0, 1-2 % høyere monoumettede fettsyrer enn fisk i FT. Samtidig var prosentandelen av EPA og total PUFA henholdsvis 6-9 % og 1-3 % lavere i RAS enn i FT. Prosentandelene av DHA og ARA var imidlertid ikke signifikant forskjellige mellom systemene.

Tabell 25 Prosentvis sammensetning av fettsyrer i fosfolipidklassen PC i gjellevevet hos atlantisk laks i de to produksjonssystemene, RAS og FT, etter fôring med kontrollfôr og EPA+. En toveis variansanalyse (ANOVA) er brukt for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Prosentverdiene er representert som gjennomsnitt. Standardfeilene (SEM) er representert som samlet S.E.M. $P < 0,05$ anses som signifikant.

PC	RAS		FT		Toveis ANOVA P-verdier				
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+	Pooled S.E.M	Modell	System (FT/RAS)	Diett (Ktr/EPA)	Inter- aksjon
14:0	2,07	1,78	2,25	1,89	0,04	<0,0001	0,004	<0,0001	0,35
16:0	27,82	27,8	26,7	27,17	0,26	0,04	0,01	0,42	0,37
18:0	2,86	2,95	2,85	2,96	0,06	0,44	0,97	0,12	0,94
Σ SFA¹	34,2	34,01	33,48	33,55	0,29	0,30	0,08	0,83	0,67
16:1n-7	1,65	1,43	1,53	1,28	0,04	0,0006	0,005	0,0002	0,66
18:1n-9	22,39	23,12	22,11	22,67	0,15	0,009	0,04	0,003	0,59
20:1n-9	1,16	1,19	1,57	1,37	0,15	0,27	0,09	0,62	0,46
22:1n-11	0,75	0,56	0,99	0,86	0,07	0,01	0,005	0,05	0,69
Σ MUFA²	29,83	29,98	29,62	29,34	0,17	0,13	0,04	0,70	0,26
18:2n-6	5,16	4,67	5,41	4,73	0,11	0,005	0,20	0,0009	0,42
20:3n-6	1,48	0,95	1,57	0,98	0,02	<0,0001	0,04	<0,0001	0,34
20:4n-6	2,18	2,73	2,23	2,60	0,10	0,008	0,65	0,001	0,37
Σ n-6	8,82	8,35	9,21	8,31	0,18	0,03	0,37	0,006	0,29
18:3n-3	BDL	BDL	BDL	BDL	NA	NA	NA	NA	NA
18:4n-3	0,98	0,98	1,07	0,94	0,02	0,009	0,19	0,01	0,01
20:5n-3	5,63	7,50	6,00	8,20	0,15	<0,0001	0,007	<0,0001	0,30
22:5n-3	1,00	1,34	1,43	1,81	0,10	0,003	0,001	0,006	0,85
22:6n-3	18,77	17,39	17,91	17,42	0,30	0,04	0,20	0,01	0,17
Σ n-3	26,38	27,21	26,42	28,38	0,33	0,008	0,10	0,002	0,12
Σ PUFA³	35,2	35,56	35,63	36,69	0,34	0,07	0,05	0,07	0,33
EPA + DHA	24,40	24,89	23,91	25,62	0,29	0,02	0,68	0,006	0,07
n-3/n-6	2,99	3,26	2,87	3,42	0,09	0,008	0,83	0,002	0,15

SFA inkluderer 15:0, 17:0, 20:0.

²Σ MUFA inkluderer 14:1n-5, 15:1, 16:1T, 17:1 Dimethyl, 17:1n-7, 16:1n-9, 20:1n-11, 24:1n-9.

Tabell 26 viser at den dominerende fettsyren i PE i gjellene til laksen var 22:6n-3 (DHA), ca. 33 % DHA, prosentvis mer enn dobbelt så høy som 18:1n-9 og tre ganger så mye som 16:0. PE i gjellene til forsøksfisk i RAS hadde 11-16 % høyere total mettet fett enn fisk i FT. MUFA var imidlertid ikke signifikant forskjellige mellom produksjonssystemene. 18:2n-6 var 8-12 % lavere i RAS-fisk enn i FT-fisk. Tilsvarende var EPA og ARA henholdsvis 11-13 % og 5-13 % lavere i RAS enn i FT. Prosentandelen av DHA var imidlertid ikke signifikant forskjellig mellom produksjonssystemene. Forsøksfisk fôret med EPA+-diett hadde 17-20 % høyere EPA og 10-21 % høyere ARA i gjellene enn kontrollfôret fisk.

Tabell 26 Prosentvissammensetning av fettsyrer i fosfolipidklassen PE i gjellevevet hos atlantisk laks i de to produksjonssystemene, RAS og FT, etter fôring med kontrollfôr og EPA+. En toveis variansanalyse (ANOVA) er brukt for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Prosentverdiene er representert som gjennomsnitt. Standardfeilene (SEM) er representert som samlet S.E.M. $P < 0,05$ anses som signifikant.

PE	RAS		FT		Toveis ANOVA P-verdier				
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+	Pooled S.E.M	Modell	System (FT/RAS)	Diett (Ktr/EPA)	Interaksjon
14:0	0,27	0,23	0,32	0,26	0,02	0,08	0,09	0,04	0,87
16:0	10,72	10,73	10,53	10,28	0,29	0,68	0,31	0,70	0,67
18:0	6,47	6,34	5,56	5,70	0,22	0,04	0,007	0,98	0,55
Σ SFA¹	18,55	18,34	17,31	17,40	0,46	0,21	0,04	0,91	0,76
16:1n-7	0,21	0,17	0,22	0,17	0,008	0,002	0,49	0,0003	0,43
18:1n-9	15,63	15,88	15,81	15,73	0,15	0,67	0,92	0,60	0,29
20:1n-9	2,29	2,49	2,72	2,47	0,17	0,42	0,25	0,90	0,23
22:1n-11	0,52	0,49	0,67	0,56	0,05	0,12	0,055	0,17	0,43
Σ MUFA²	22,42	22,26	22,75	22,23	0,27	0,52	0,59	0,24	0,51
18:2n-6	4,85	4,78	5,49	5,22	0,13	0,01	0,003	0,22	0,46
20:3n-6	1,04	0,69	0,97	0,61	0,05	0,0004	0,18	<0,0001	0,90
20:4n-6	4,31	5,22	4,98	5,50	0,21	0,02	0,05	0,01	0,39
Σ n-6	10,20	10,68	11,45	11,33	0,34	0,10	0,02	0,61	0,41
18:3n-3	BDL*	BDL*	BDL*	BDL*	NA	NA	NA	NA	NA
18:4n-3	0,89	0,97	0,92	0,93	0,03	0,41	0,98	0,17	0,35
20:5n-3	4,07	4,89	4,70	5,51	0,19	0,005	0,01	0,003	0,98
22:5n-3	0,98	1,38	1,18	1,56	0,08	0,006	0,06	0,002	0,89
22:6n-3	33,93	32,26	33,36	32,46	0,77	0,43	0,82	0,13	0,63
Σ n-3³	40,26	39,89	40,41	40,63	0,66	0,86	0,51	0,90	0,65
Σ PUFA⁴	50,46	50,54	51,85	51,96	0,61	0,23	0,05	0,88	0,98
EPA + DHA	38	37,14	38,06	37,97	0,68	0,75	0,53	0,51	0,59
n-3/n-6	3,95	3,74	3,54	3,60	0,14	0,26	0,09	0,62	0,38

¹Σ SFA inkluderer 15:0, 17:0, 20:0.

²Σ MUFA inkluderer 15:1, 16:1T, 17:1 Dimethyl, 17:1n-7, 16:1n-9, 20:1n-7, 20:1n-11.

³Σ n-3 inkluderer 18:3n-3.

Tabell 27 Prosentvis sammensetning av fettsyrer i fosfolipidklassen PS i gjellevevet hos atlantisk laks i de to produksjonssystemene, RAS og FT, etter fôring med kontrollfôr og EPA+. En toveis variansanalyse (ANOVA) er brukt for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Prosentverdiene er representert som gjennomsnitt. Standardfeilene (SEM) er representert som samlet S.E.M. $P < 0,05$ anses som signifikant.

PS	RAS		Flow-through		Pooled S.E.M	Moell	Toveis ANOVA P-verdier		
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+			System (FT/RAS)	Diett (Ktr/EPA)	Interaksjon
14:0	0,55	0,41	0,36	0,37	0,08	0,42	0,20	0,47	0,42
16:0	16,92	16,19	16,25	16,66	0,97	0,84	0,55	0,52	0,94
18:0	18,19	20,33	20,82	21,22	1,09	0,27	0,14	0,28	0,44
Σ SFA¹	36,96	38,22	38,46	38,53	0,69	0,39	0,23	0,36	0,41
16:1n-7	0,42	0,29	0,34	0,17	0,08	0,22	0,23	0,09	0,84
18:1n-9	13,11	11,88	10,38	11,19	0,82	0,19	0,07	0,81	0,25
20:1n-9	2,53	2,17	2,27	2,28	0,13	0,33	0,60	0,22	0,21
Σ MUFA²	23,76	21,21	19,97	20,20	0,59	0,007	0,003	0,09	0,047
18:2n-6	2,95	2,69	2,90	2,67	0,15	0,46	0,80	0,13	0,91
20:3n-6	1,28	0,95	1,20	0,51	0,20	0,10	0,23	0,04	0,40
20:4n-6	2,33	3,33	2,35	2,34	0,36	0,21	0,22	0,21	0,20
Σ n-6	6,56	6,97	6,45	5,51	0,55	0,35	0,19	0,64	0,25
18:3n-3	1,32	1,01	0,89	1,10	0,14	0,24	0,26	0,73	0,10
18:4n-3	0,84	0,86	0,77	0,86	0,06	0,62	0,53	0,34	0,55
20:5n-3	1,85	1,81	1,21	1,44	0,38	0,60	0,22	0,81	0,72
22:5n-3	1,23	1,70	1,29	1,98	0,14	0,01	0,23	0,003	0,43
22:6n-3	24,53	25,43	27,95	27,15	1,12	0,20	0,05	0,97	0,47
Σ n-3	29,76	30,80	32,11	32,53	0,95	0,23	0,06	0,47	0,75
Σ PUFA³	36,32	37,77	38,56	38,04	0,66	0,18	0,09	0,50	0,17
EPA + DHA	26,38	27,23	29,16	28,59	0,80	0,13	0,03	0,87	0,40
n-3/n-6	4,62	4,46	5,05	6,16	0,65	0,31	0,14	0,48	0,36

¹Σ SFA inkluderer 15:0, 17:0, 20:0.

²Σ MUFA inkluderer 15:1, 16:1n-9, 16:1T, 17:1 Dimethyl, 17:1n-7, 18:1n-7, 20:1n-7, 20:1n-11.

De mest sentrale fettsyrene i PS i gjellene til laksen var ca. 25 % DHA og ca. 20 % 18:0 (Tabell 28). Fisk i RAS hadde 5-19 % høyere total MUFA i gjellevevets PS enn i FT. SFA var imidlertid ikke signifikant forskjellige mellom systemene. DHA var 6-12 % lavere i RAS enn i FT, mens EPA og ARA ikke var signifikant forskjellig mellom systemene. Fettsyrene i gjellevevets fosfolipid PS ble ikke påvirket av diett sammensetningen.

Tabell 28 Prosentvis sammensetning av fettsyrer i fosfolipidklassen PI i gjellevevet hos atlantisk laks i de to produksjonssystemene, RAS og FT, etter fôring med kontrollfôr og EPA+. En toveis variansanalyse (ANOVA) er brukt for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). Prosentverdiene er representert som gjennomsnitt. Standardfeilene (SEM) er representert som samlet S.E.M. $P < 0,05$ anses som signifikant.

Variable	RAS		FT		Pooled S.E.M	Modell	Toveis ANOVA P-verdier		
	Ktr	EPA+	Ktr	EPA+			System (FT/RAS)	Diett (Ktr/EPA)	Interaksjon
14:0	0,75	0,61	0,43	0,80	0,12	0,21	0,59	0,38	0,07
16:0	16,84	16,41	14,66	18,17	2,21	0,74	0,92	0,51	0,40
18:0	23,06	24,83	28,25	27,51	1,29	0,07	0,01	0,70	0,36
Σ SFA¹	41,95	43,04	44,30	47,42	1,36	0,09	0,04	0,16	0,48
18:1n-9	9,04	8,50	7,13	6,79	0,56	0,06	0,01	0,46	0,86
20:1n-9	1,28	0,89	1,05	0,79	0,23	0,50	0,49	0,20	0,78
Σ MUFA²	23,22	20,70	16,27	17,33	1,36	0,02	0,005	0,61	0,23
18:2n-6	1,89	1,68	1,40	1,18	0,09	0,002	0,0004	0,04	0,98
20:3n-6	2,50	1,52	2,04	1,12	0,53	0,35	0,44	0,11	0,96
20:4n-6	13,85	16,92	19,52	19,75	1,49	0,07	0,02	0,30	0,37
Σ n-6	18,25	20,12	22,96	22,05	1,50	0,20	0,06	0,76	0,38
18:3n-3	3,15	2,06	1,99	2,38	0,42	0,26	0,34	0,42	0,11
20:5n-3	1,88	1,81	2,06	2,04	0,13	0,50	0,16	0,77	0,85
22:5n-3	BDL*	BDL*	BDL*	BDL*	NA	NA	NA	NA	NA
22:6n-3	10,74	10,11	11,64	8,24	0,79	0,08	0,56	0,03	0,12
Σ n-3³	15,77	14,85	16,12	12,85	1,15	0,26	0,50	0,10	0,34
Σ PUFA⁴	34,02	34,96	39,08	34,90	1,69	0,22	0,18	0,36	0,17
EPA + DHA	12,61	11,92	13,70	10,28	0,86	0,11	0,75	0,04	0,15
n-3/n-6	0,86	0,74	0,71	0,60	0,08	0,19	0,09	0,16	0,98
Σ Others⁵	1,20	1,93	0,54	0,55	NA	NA	NA	NA	NA

¹Σ SFA inkluderer 15:0, 17:0.

²Σ MUFA inkluderer 15:1, 16:1n-7, 1, 6:1n-9, 17:1n-7, 17:1 Dimethyl, 20:1n-7, 20:1n-11.

³Σ n-3 inkluderer 18:4n-3, 22:5n-3.

PI i gjellevevet hadde høyest prosentandel av 18:0 (25 %) og 20:4n-6 (ARA) (13-20 %). PI i gjellene til forsøksfisk i RAS var 10-18 % lavere i 18:0, 25-27 % høyere i 18:1n-9 enn fisk i FT-systemet. PUFA 18:2n-6 var 35-42 % lavere. Tilsvarende var den prosentvise sammensetningen av ARA 14-29 % lavere i RAS sammenlignet med FT. Prosentandelen av EPA og DHA var imidlertid ikke signifikant forskjellig mellom systemene. Den prosentvise sammensetningen av EPA, ARA SFA og MUFA i gjelle-PI var ikke signifikant forskjellig mellom diettgruppene. DHA var imidlertid 6-29 % lavere og 18:2n-6 var 35-42 % høyere hos fisk fôret med EPA-diett enn i kontrollgruppen, og dette samsvarer med diettens sammensetning.

Hovedfunn lipidklasser i gjellevev

Produksjonssystemet hadde relativt små effekter på den totale fettsyresammensetningen i gjellene. Det mest bemerkelsesverdige er den høyere prosentandelen av arakidonsyre (ARA) i RAS sammenlignet med FT. Derimot hadde produksjonssystemet en betydelig effekt på enkelte fosfolipider, spesielt PE og PI. Det er interessant at ARA reduseres i PE og PI hos fisk i RAS, mens den øker i den totale fettsyrefraksjonen (Tabell 29). Dette kan indikere frigivelse av ARA fra fosfolipidene PE og PI for syntese

av pro-inflammatoriske eikosanoider i RAS. ARA produserer generelt mer pro-inflammatoriske eikosanoider, mens EPA-deriverte eikosanoider er antiinflammatoriske. Balansen mellom disse fettsyrene kan dermed påvirke gjellenes fysiologiske respons, inkludert vaskulær funksjon, immunforsvar og mulig ioneregulering. Produksjonssystem påvirket også prosentandelen av enkelte mettede, monoumettede og flerumettede fettsyrer i de ulike lipidklassene.

Tabell 29 Oppsummering av de mest sentrale endringene i ulike fosfolipidklasser gjeller mellom RAS sammenlignet med FT

	RAS/FT	Prosent endring	Mest sentrale fettsyrer i lipidklassen
PC	16:0 ↑ EPA ↓ ARA	2-4 % 6-9 % Ingen sign. forskjell	≈27 % 16:0, ≈22 % 18:1n-9, ≈18 %DHA
PE	18:0 ↑ 18:2n-6 ↓ EPA ↓ ARA ↓	11-16% 8-12% 11-13% 5-13%	≈33 % DHA, ≈15 % 18:1n-9
PS	18:1 n-9 ↑ DHA ↓ ARA og EPA -	5-19 % 6-12 % Ingen sign. forskjell	≈25 % DHA, ≈18 % 18:0
PI	18:0 ↓ 18:1 n-9 ↑ 18:2n-6 ↓ ARA ↓ EPA -	10-18 % 25-27 % 35-42 % 14-20 % Ingen sign. forskjell	≈25 % 18:0, ≈17 % ARA
TFA (tot fettsyrefrak)	ARA ↑ EPA -	11-15 % Ingen sign. forskjell	

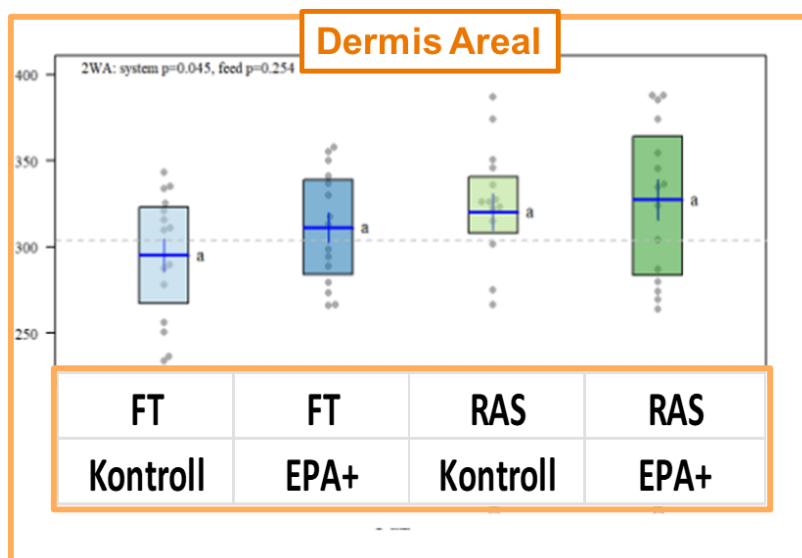
Fett, fettsyrer og morfologi av skinn

Tabell 30 viser den totale fettsyresammensetningen i skinn. Fettsyresammensetningen av skinnet var ikke påvirket av produksjonssystem, men reflekterte i stor grad sammensetningen av forsøksfôrene. Hovedforskjellen var signifikant høyere nivåer av EPA og DPA i de to EPA+ diettgruppene.

Tabell 30 Totale fettsyrer i skinn (% av TFA) til laks i de to diettgruppene Ktr og EPA+ holdt i to produksjonssystem RAS og FT. Resultatene er vist som gjennomsnittsverdier per kar (n=3) $\pm$ standard error of mean (S.E.M). Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene $P < 0,05$ regnes som signifikant.

	RAS		RAS		FT		FT		P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi
	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Modell	System	Diett	Interaksjon
Fett%	7,6	0,74	7,0	1,80	5,9	0,53	12,0	1,21	0,03	0,19	0,05	0,02
14:0	2,5	0,10	1,9	0,13	2,3	0,15	2,0	0,02	0,02	0,79	0,004	0,23
16:0	11,7	0,18	10,6	0,13	11,3	0,26	10,5	0,17	0,009	0,33	0,001	0,53
18:0	2,8	0,05	2,8	0,05	2,9	0,04	2,8	0,05	0,35			
Sum SFA	17,9	0,32	16,1	0,19	17,4	0,42	16,2	0,20	0,006	0,46	0,001	0,46
16:1 n-7	2,1	0,06	1,5	0,07	1,9	0,07	1,7	0,01	0,001	0,89	0,0002	0,08
18:1 n-9	30,6	0,87	31,4	1,67	29,9	0,83	35,0	0,18	0,03	0,19	0,02	0,07
20:1 n-9	4,3	0,21	3,6	0,30	4,2	0,18	4,2	0,03	0,15			
22:1 n-11	4,0	0,24	3,0	0,27	3,8	0,18	3,5	0,05	0,04	0,47	0,01	0,12
22:1 n-9	0,6	0,03	0,6	0,03	0,6	0,03	0,6	0,00	0,17			
24:1 n-9	0,6	0,01	0,5	0,01	0,6	0,02	0,5	0,01	0,01	0,22	0,002	0,56
Sum MUFA	47,5	1,33	45,9	2,22	46,6	1,15	50,6	0,28	0,18			
18:2 n-6	11,4	0,11	12,0	0,25	11,3	0,09	12,8	0,12	0,0006	0,07	0,0002	0,02
18:3 n-6	0,4	0,02	0,4	0,04	0,5	0,06	0,4	0,02	0,33	0,81	0,19	0,21
18:3 n-3	3,0	0,04	3,2	0,10	3,0	0,05	3,5	0,03	0,0009	0,10	0,0003	0,03
20:4 n-3	0,6	0,01	0,5	0,04	0,6	0,02	0,5	0,00	0,02	0,94	0,004	0,15
20:2 n-6	1,0	0,02	1,1	0,03	1,1	0,03	1,2	0,01	0,08	0,34	0,02	0,55
20:3 n-6	0,6	0,04	0,6	0,05	0,7	0,04	0,5	0,01	0,06	0,90	0,04	0,06
20:4 n-6	0,5	0,02	0,7	0,11	0,6	0,03	0,5	0,01	0,11			
20:3 n-3	0,1	0,09	0,3	0,01	0,0	0,00	0,3	0,01	0,003	0,47	0,0005	0,26
20:5 n-3	2,8	0,12	4,2	0,30	3,0	0,15	3,6	0,05	0,002	0,23	0,0004	0,04
22:5 n-3	0,9	0,02	1,2	0,03	0,9	0,02	1,2	0,01	<,0001	0,11	<,0001	0,18
22:6 n-3	7,3	0,43	7,3	0,65	7,6	0,48	5,9	0,07	0,13			
EPA+DHA	10,0	0,55	11,6	0,95	10,5	0,63	9,5	0,11	0,20			
sum n-3	14,7	0,47	16,8	0,85	15,0	0,59	15,0	0,06	0,10	0,21	0,10	0,10
sum n-6	14,0	0,08	14,8	0,10	14,1	0,03	15,3	0,12	<,0001	0,01	<,0001	0,04

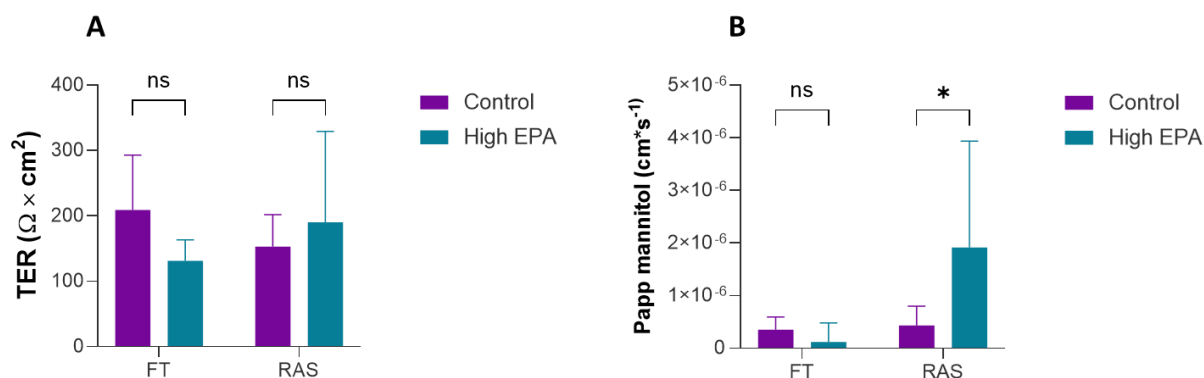
Figur 51 viser ingen signifikante dietteffekter på tykkelse av skinnets dermis ($p = 0,254$). Toveis ANOVA analyse viste at laks i RAS hadde signifikant tykkere dermis enn fisk i FT ($p = 0,045$).



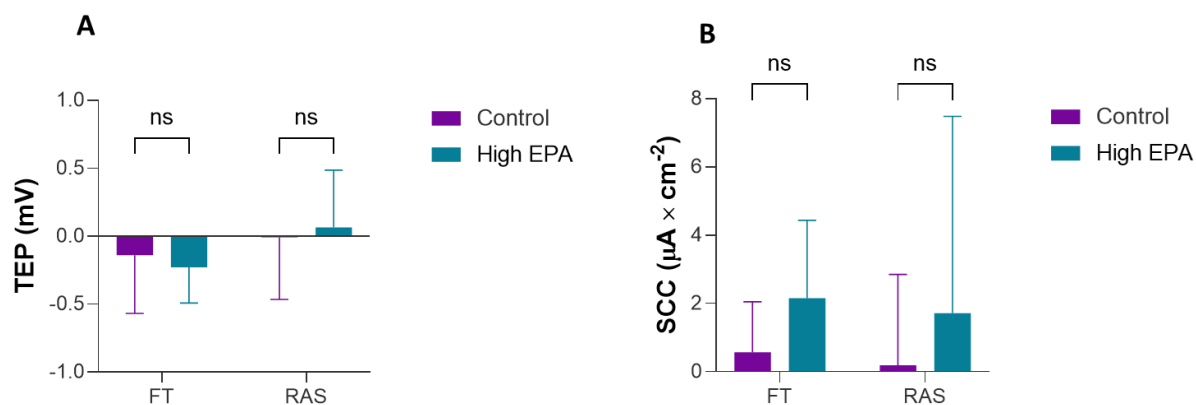
Figur 51 Viser areal av skinnets dermis i de to diettgruppene Ktr og EPA+ holdt i de to produksjonssystemene RAS og FT. Resultatene er vist som gjennomsnittsverdier per kar ($n=3$) $\pm$ SEM.

Barrierefunksjon til skinn (ansvarlig Gøteborg Universitet, Henrik Sundh)

Ingen effekter av dietten ble observert for TER i skinn (Transepitelial elektrisk motstand) (Figur 52A). Papp (permeabilitetskoeffisient) for mannitol ble økt av høyt EPA-innhold i RAS-systemet (Figur 52B). Ingen effekter ble observert for ionetransport målt som TEP (Transepitelialt potensial) (Figur 53A) eller SCC (Kortslutningsstrøm) (Figur 53B).



Figur 52 Skinnets barrierefunksjon vurdert som transepitelial elektrisk motstand (TER; A) og diffusjonshastighet for mannitol (Papp; B) i diettgruppene EPA+ og Ktr i RAS og FT.



Figur 53 Transportfunksjoner i huden vurdert som transepitelial potensialdifferanse (TEP; A) og kortslutningsstrøm (SCC; B) i diettgruppene EPA+ og Ktr i RAS og FT.

Barrierefunksjon og fettsyresammensetning av tarm (ansvarlig Gøteborg Universitet, Henrik Sundh).

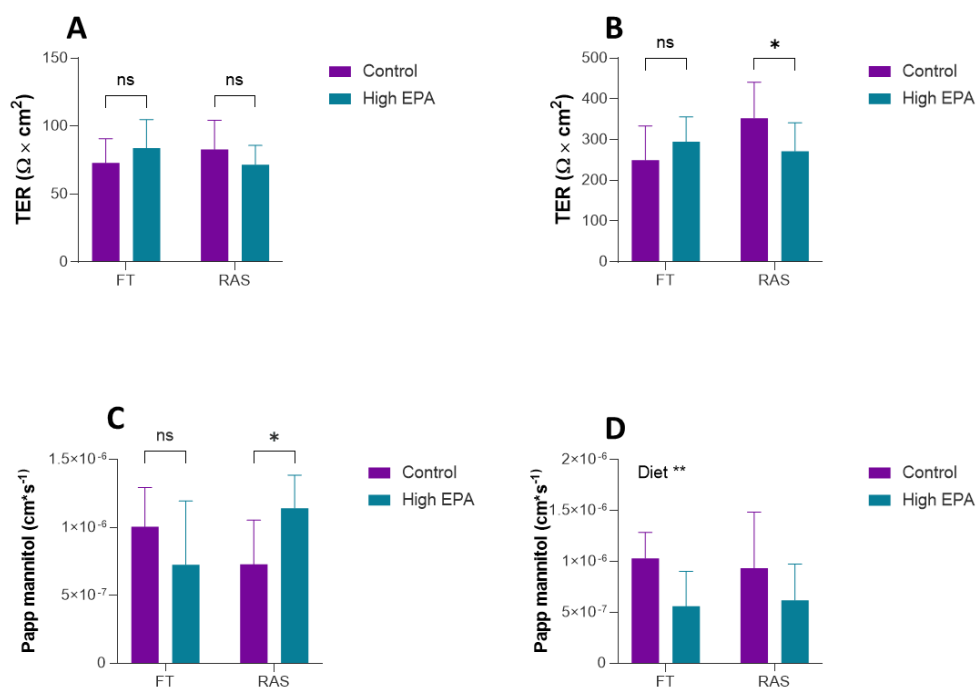
Tabell 31 viser den totale fettsyresammensetningen av midttarm. Fettsyresammensetningen av midttarm var ikke påvirket av produksjonssystem, men reflekterte i stor grad sammensetningen av forsøksfôrene. Hovedforskjellen var signifikant høyere nivåer av EPA, DPA og ARA i de to EPA+ diettgruppene.

Tabell 31 Totale fettsyrer i tarm (% av TFA) til laks i de to diettgruppene Ktr og EPA+ holdt i to produksjonssystem RAS og FT. Resultatene er vist som gjennomsnittsverdier per kar (n=3) og standard error of mean (S.E.M). Toveis ANOVA er benyttet for å teste for signifikante forskjeller mellom gruppene (n=3). P <,05 regnes som signifikant.

	RAS		RAS		FT		FT		P-verdi	P-verdi	P-verdi	P-verdi
	Ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	ktr	S.E.M	EPA+	S.E.M	Modell	System	Diett	Interaksjon
Fett%	5,6	0,33	4,9	0,14	5,2	0,13	5,5	0,44	0,41			
14:0	2,1	0,12	1,5	0,03	2,0	0,10	1,6	0,11	0,008	0,81	0,001	0,40
16:0	12,7	0,30	11,9	0,13	12,8	0,20	12,4	0,37	0,14			
18:0	3,8	0,15	4,0	0,05	4,0	0,05	4,3	0,34	0,44			
Sum SFA	19,6	0,38	18,6	0,18	19,9	0,22	19,3	0,68	0,19			
16:1 n-7	1,4	0,08	1,0	0,02	1,3	0,01	1,2	0,13	0,02			
18:1 n-9	24,0	0,85	22,7	0,34	23,1	0,57	25,0	1,29	0,30			
18:1 n-7	2,1	0,06	2,0	0,06	2,1	0,02	2,1	0,07	0,41			
18:2 n-6	10,0	0,17	9,4	0,25	9,5	0,14	10,0	0,51	0,44			
20:1 n-11	0,6	0,03	0,5	0,01	0,6	0,01	0,6	0,05	0,78			
20:1 n-9	3,7	0,12	2,8	0,05	3,6	0,13	3,1	0,18	0,004	0,38	0,0007	0,14
22:1 n-11	3,5	0,14	2,3	0,06	3,3	0,15	2,4	0,16	0,0003	0,63	<,0001	0,32
22:1 n-9	0,5	0,02	0,4	0,02	0,5	0,01	0,5	0,02	0,01	0,54	0,003	0,07
24:1 n-9	0,6	0,02	0,5	0,04	0,5	0,02	0,5	0,01	0,56			
Sum MUFA	38,7	1,11	34,5	0,31	37,2	0,91	37,6	1,91	0,17			
18:3 n-6	0,5	0,01	0,6	0,02	0,5	0,02	0,5	0,04	0,68			
18:3 n-3	2,2	0,09	2,2	0,05	2,1	0,02	2,4	0,14	0,20			
20:2 n-6	1,0	0,06	1,0	0,06	1,1	0,00	1,1	0,04	0,40			
20:3 n-6	1,0	0,04	0,9	0,04	1,0	0,01	0,8	0,05	0,007	0,97	0,001	0,25
20:4 n-6	0,8	0,05	1,0	0,03	0,8	0,01	1,0	0,06	0,003	0,66	0,0003	0,60
20:3 n-3	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00	0,1	0,08	0,44	0,35	0,35	0,35
20:5 n-3	3,4	0,18	4,9	0,17	3,6	0,12	4,9	0,19	0,0003	0,38	<,0001	0,63
22:5 n-3	0,9	0,04	1,1	0,03	0,9	0,04	1,2	0,02	0,0005	0,04	<,0001	0,52
22:6 n-3	13,7	0,85	13,6	0,48	14,5	0,44	13,6	0,51	0,68			
EPA + DHA	17,1	1,01	18,4	0,64	18,1	0,55	18,6	0,70	0,55			
sum n-3	20,7	0,94	22,0	0,60	21,6	0,61	22,6	0,45	0,30			
Sum n-6	13,3	0,13	12,9	0,28	13,0	0,11	13,5	0,41	0,40			

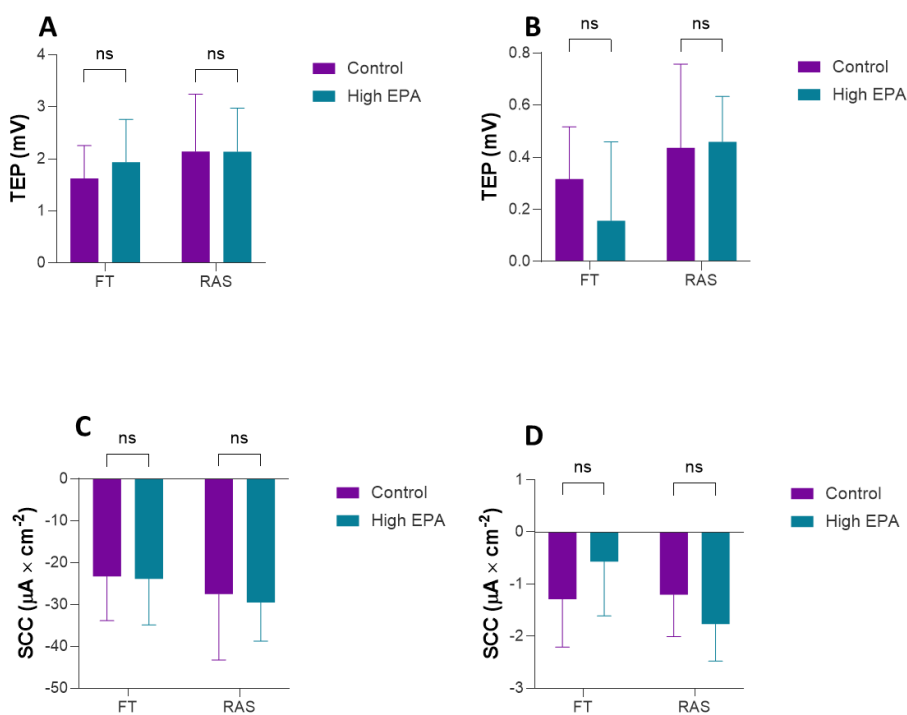
Tarmens barrierefunksjon

I den proksimale tarmen ble det ikke observert noen signifikante effekter på TER (Figur 54A). I den distale tarmen (baktarmen) førte høyt EPA-innhold til redusert TER hos fisk i RAS (Figur 54B). Diffusjonshastighet (Papp) for mannitol økte i den proksimale tarmen i gruppen med høyt EPA-innhold hos fisk i RAS (Figur 54C), mens høyt EPA-innhold generelt reduserte Papp i den distale tarmen (Figur 54D).

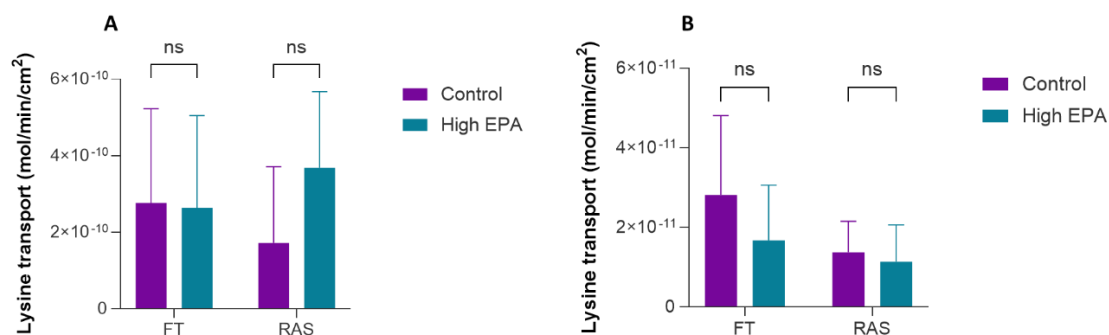


Figur 54 Tarmens barrierefunksjon vurdert som transepitelial elektrisk motstand (TER) i proksimal (A) og distal (B) tarm, og diffusjonshastighet (Papp) for mannitol i proksimal (C) og distal tarm (D).

Ingen effekter ble observert for noen av de vurderte tarmtransportmekanismene i noen av tarmregionene (Figur 55 A-D og Figur 56 A-B).



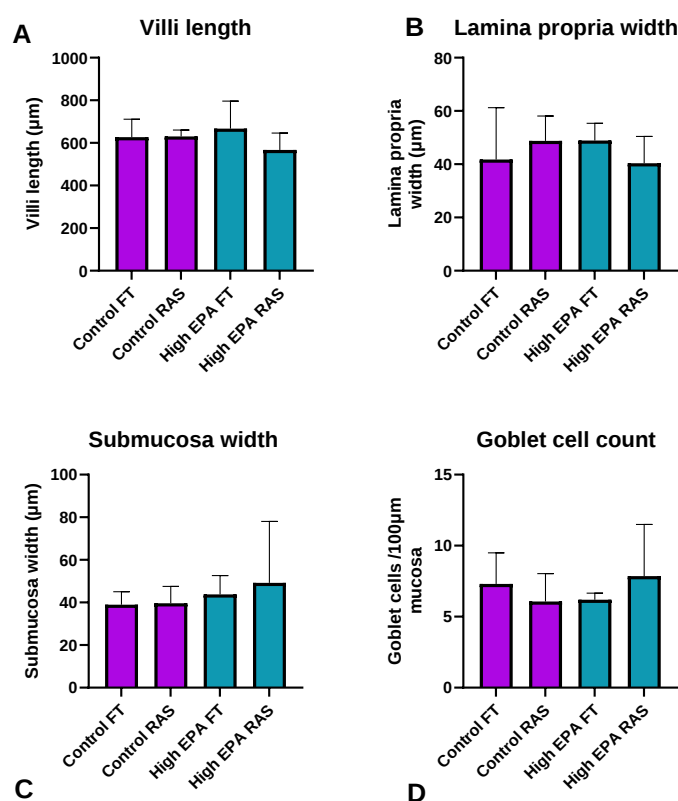
Figur 55 Tarmens barrierefunksjon vurdert som TEP (mV) i proksimal (A) og distal (B) tarm, og SCC i proksimal (C) og distal tarm (D).



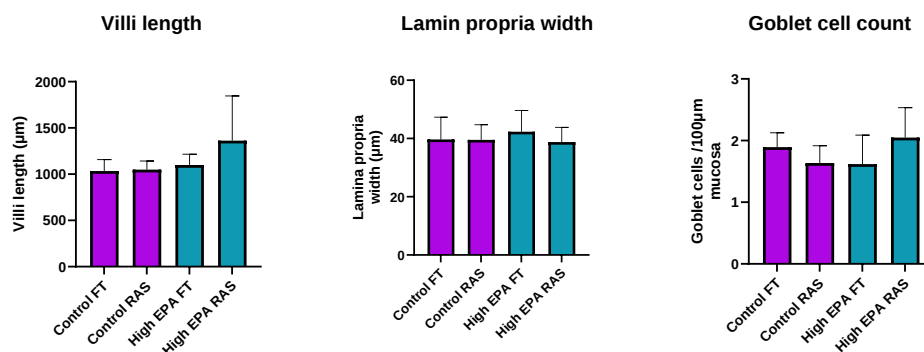
Figur 56 L-lysine transport i proximal (A) og distal tarm (B)

Tarmmorfologi

Det ble ikke observert noen forskjeller i tarmmorfologi vurdert ut fra slimhinnefoldlengde (Figur 57A), bredde på lamina propria (Figur 57B), bredde på submucosa (Figur 57C) eller antall gobletceller per 100 μ m epitel (Figur 57D) i den proksimale tarmen.



Figur 57 Morfometriske resultater for den proksimale tarmen. Ingen forskjeller ble observert i tarmmorfologi vurdert som slimhinnefoldlengde (A) (bredde på lamina propria (B), mucosa bredde (C) eller antall gobletceller per 100 μ m epitel (Figur 57D) i den proksimale tarmen.



Figur 58 Morfometriske resultater for den distale tarmen. Ingen forskjeller ble observert i tarmmorfologi vurdert som bredde på lamina propria) eller antall gobletceller per 100 µm epitel i den distale tarmen.

Diskusjon barrierefunksjon i tarm: EPA+-gruppen viste negative effekter på tarmens barrierefunksjon i resirkuleringsanlegg (RAS), men ikke i FT. I RAS førte EPA+ til redusert barrierefunksjon mot ioner i den distale tarmen og mot molekyler i den proksimale tarmen. Den distale tarmen hos sjøvannstilpasset fisk er essensiell for væskeopptak, og økt transepitelial elektrisk motstand (TER) observeres vanligvis i denne regionen etter overgang til sjøvann (Sundell og Sundh, 2012). Denne TER-økningen er avgjørende for å skape en høyosmotisk effekt som trekker væske fra tarmlumen til blodsiden. Følgelig kan væskeopptaket være negativt påvirket i EPA+-gruppen i RAS.

Det ble ikke observert dietteffekter på tarmens transport av ioner eller aminosyren L-lysin, og hverken diett eller produksjonssystem påvirket tarmmorfologien. Interessant nok ble det observert økt permeabilitet for molekyler selektivt hos RAS-fisk, men ikke hos fisk i FT. Mekanismene bak disse observasjonene er ukjente og overraskende, ettersom EPA vanligvis reduserer pro-inflammatoriske cytokiner hos vertebrater og beskytter tarmen mot inflammasjonsindusert barrierenedsettelse (Sundell og Sundh, 2012). Signifikant høyere prosentandel av n-6 fettsyrene 20:4n-6 (arakidonsyre, ARA) og 20:3n-6 ble funnet i proksimal tarm i EPA+-gruppene. I lever ble det observert høyere produksjon av proinflammatoriske eikosanoider i RAS-fisk sammenlignet med FT-fisk. Dette kan skyldes økt frigjøring av ARA som frie fettsyrer fra fosfolipider, som deretter kan brukes til eikosanoiddannelse. Det er mulig at lignende prosesser forekommer i den distale tarmen, men dette krever ytterligere studier for å bekrefte.

5.5.4 Oppsummering hovedfunn RAS/FT

- **Tilvekst:** Laksen i FT-systemet hadde signifikant høyere tilvekst, sluttvekt og kondisjonsfaktor sammenlignet med laksen i RAS.
- **Fordøyelighet av mineraler:** Ingen signifikant effekt av produksjonssystem på fordøyelighet av Zn og P.
- **Stressmarkører:** Kortisol, 5β-hydrokortisol og kortison var signifikant høyere i feces til fisk i RAS enn i FT.
- **Nyrefunksjon:** Tendens til høyere ureakonsentrasjon i serum hos RAS-fisk. Økt EPA-innhold i dietten førte til redusert ureakonsentrasjon i serum, særlig i FT-systemet.
- **Serum:** ASAT og ALAT var høyere i fisk i FT-systemet enn i RAS, med lavere verdier ved økt EPA-nivå i dietten.
- **Leukotriener og prostaglandiner:** Høyere konsentrasjon av LTB₄ og LTB₅ i lever til fisk i RAS enn i lever til FT fisk.
- **Antioksidanter:** Carnosol var høyere, mens carnosic acid var lavere i lever til fisk i RAS enn i FT.

Gjeller

- **Total lipidfraksjon:** Høyere prosentandel av palmitinsyre (16:0) og arakidonsyre (ARA, 20:4n-6) og ratio ARA/EPA i gjeller fra fisk i RAS enn i FT.
- **Fosfolipider:** Redusert ARA i PE og PI hos fisk i RAS sammenlignet med FT, kan indikere frigivelse av ARA fra PE og PI til frie fettsyrer for syntese av pro-inflammatoriske eikosanoider.
- **PC/PE-ratio:** Høyere i RAS enn i FT.

Skinn

- **Dermis tykkelse:** Fisk i RAS har tykkere dermis enn fisk i FT.
- **Barrierefunksjon:** Økt permeabilitet for molekyler (mannose) i RAS i EPA+ gruppen

Tarm

- **TER i proksimal tarm:** Ingen signifikante effekter.
- **TER i distal tarm:** Redusert i RAS i EPA+ gruppen.
- **Papp for mannitol:** Økt i proksimal tarm og redusert i distal tarm hos fisk i RAS i EPA+ gruppen.

5.5.5 Referanser A1

- Apines, M.J.S., Satoh, S., Kiron, V., Watanabe, T., Fujita, S., 2003. Bioavailability and tissue distribution of amino acidchelated trace elements in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries science* 69(4), 722-730.
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R., 1996. Effect of temperature on cadmium and zinc uptake by the midge larvae *Chironomus riparius*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 502-511.
- Berdyshev, Evgeny. "Skin Lipid Barrier: Structure, Function and Metabolism." *Allergy, Asthma & Immunology Research* 16, no. 5 (2024): 445.
- Biehler, E., Hoffmann, L., Krause, E., Bohn, T., 2011. Divalent Minerals Decrease Micellarization and Uptake of Carotenoids and Digestion Products into Caco-2 Cells 1 2. *J. Nutr.* 141, 1769–1776. <https://doi.org/10.3945/jn.111.143388>
- Bou, M. et al. *British Journal of Nutrition* 117, (2017).
- Chuck T Chen, Sophie Haven, Lea Lecaj, Mark Borgstrom, Mohammad Torabi, John Paul SanGiovanni, Joseph R Hibbeln, Brain PUFA Concentrations Are Differentially Affected by Interactions of Diet, Sex, Brain Regions, and Phospholipid Pools in Mice, *The Journal of Nutrition*, Volume 150, Issue 12, 2020, Pages 3123-3132
- Garman, J. H., Mulroney, S., Manigrasso, M., Flynn, E., & Maric, C. (2009). Omega-3 fatty acid rich diet prevents diabetic renal disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296(2), F306-F316.
- Denstadli, V., Vegusdal, A., Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A., Berge, G., Holm, H., Hillestad, M., Ruyter, B., 2004. Lipid absorption in different segments of the gastrointestinal tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 240(1-4), 385-398.
- . Droke, E.A., Briske-Anderson, M., Lukaski, H.C., 2003. Fatty acids alter monolayer integrity, paracellular transport, and iron uptake and transport in Caco-2 cells. *Biol. Trace Elem. Res.* 95, 219–232. <https://doi.org/10.1385/bter:95:3:219>
- Fang, H., Sissener, N.H., Sæle, Ø., Sigholt, T., Philip, A.J.P., 2024. The Interaction Between Dietary Fat Level, n-3 LC-PUFA, and Zinc on Their Postprandial Absorption Kinetics in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition* 2024(1), 6173690
- Folch, J. et al. *J Biol Chem* 226, (1957).

- Geppert, F., Liu, D., Eerten-Jansen, M. van, Weidner, E., Buisman, C., Heijne, A. ter, 2016. Bioelectrochemical Power-to-Gas: State of the Art and Future Perspectives. *Trends Biotechnol.* 34, 879–894. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.08.010>
- Gomez, N.N., et al., Zn-limited diet modifies the expression of the rate-regulatory enzymes involved in phosphatidylcholine and cholesterol synthesis. *British journal of nutrition*, 2006. 96(6): p. 1038-1046.
- Glover, C.N., Hogstrand, C., 2002. In vivo characterisation of intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 205(1), 141-150.
- Hambidge, M., 2003. Biomarkers of trace mineral intake and status. *The Journal of nutrition* 133(3), 948S-955S.
- He, Y., Zhao, T., Lv, W.-H., Tan, X.-Y., Song, Y.-F., Song, C.-C., Zhong, C.-C., Luo, Z., 2023. Interactive effects of dietary zinc and water temperature on growth performance, Zn transport, heat shock response and lipid metabolism in the livers of juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 562, 738795.
- Han, Y., Chen, Z., Zhao, H., Zha, Z., Ke, W., Wang, Y., Ge, Z., 2018. Oxygen-independent combined photothermal/photodynamic therapy delivered by tumor acidity-responsive polymeric micelles. *J. Control. Release* 284, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.012>
- Julshamn, K., Maage, A., Norli, H.S., Grobecker, K.H., Jorhem, L., Fecher, P., Collaborators:, Hentschel, A., Hinojosa, I.M. de la, Viehweger, L., Mindak, W.R., Lindholm, K., Holm, K., Olsson, B., Engman, J., Habernegg, R., Hammer, D., Lewis, J., Wielen, J. van der, Hovind, H., Vadset, M., 2007. Determination of Arsenic, Cadmium, Mercury, and Lead by Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry in Foods after Pressure Digestion: NMKL Interlaboratory Study. *J. AOAC Int.* 90, 844–856. <https://doi.org/10.1093/jaoac/90.3.844>
- Jia-Lang Zheng, Zhi Luo, Wei Hu, Cai-Xia Liu, Qi-Liang Chen, Qing-Ling Zhu, Yuan Gong, Different effects of dietary Zn deficiency and excess on lipid metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, *Aquaculture*, Volume 435, 2015, Pages 10-17,
- Kawano, A., Haiduk, C., Schirmer, K., Hanner, R., Lee, L.E.J., Dixon, B., Bols, N.C., 2011. Development of a rainbow trout intestinal epithelial cell line and its response to lipopolysaccharide. *Aquac. Nutr.* 17, e241–e252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00757.x>
- Karlsen, C., et al., In vivo and in vitro assessment of Atlantic salmon skin exposed to hydrogen peroxide. *Aquaculture*, 2021. 540: p. 736660.
- Koo, S.I., Henderson, D., Algilani, K., Norvell, J., 1985. Effect of marginal zinc deficiency on the morphological characteristics of intestinal nascent chylomicrons and distribution of soluble apoproteins of lymph chylomicrons. *The American journal of clinical nutrition* 42(4), 671-680.
- Lee, C., Koo, S., Norvell, J., 1986. Effect of marginal zinc deficiency on the apoprotein (APO) B concentration of lymph chylomicrons. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.:(United States)* 4
- Lutfi Royo, E. et al., (2022).
- Mason, M. E. et al. *Analytical Chemistry* 36, (1964).
- Minghetti, M., Drieschner, C., Bramaz, N., Schug, H., Schirmer, K., 2017. A fish intestinal epithelial barrier model established from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cell line, RTgutGC. *Cell Biol. Toxicol.* 33, 539–555. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9385-x>
- Ma, S., Wang, W.-X., 2023. Physiological trade-off of marine fish under Zn deficient and excess conditions. *Science of The Total Environment* 901, 166187.
- Nøstbakken, O.J., Goksøyr, A., Martin, S.A.M., Cash, P., Torstensen, B.E., 2012. Marine n-3 fatty acids alter the proteomic response to methylmercury in Atlantic salmon kidney (ASK) cells. *Aquat. Toxicol.* 106, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.10.008>
- Ohashi W, Fukada T. Contribution of Zinc and Zinc Transporters in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *J Immunol Res.* 2019 Mar 10;2019:8396878. doi: 10.1155/2019/8396878. PMID: 30984791; PMCID: PMC6431494
- Prabhu, P.A.J., Schrama, J., Mariojous, C., Godin, S., Fontagné-Dicharry, S., Geurden, I., Surget, A., Bouyssière, B., Kaushik, S., 2014. Post-prandial changes in plasma mineral levels in rainbow

- trout fed a complete plant ingredient based diet and the effect of supplemental di-calcium phosphate. *Aquaculture* 430, 34-43.
- Prabhu, P.A.J., Stewart, T., Silva, M., Amlund, H., Ørnsrud, R., Lock, E.-J., Waagbo, R., Hogstrand, C., 2018. Zinc uptake in fish intestinal epithelial model RTgutGC: Impact of media ion composition and methionine chelation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 50, 377-383.
- Ruyter, B., et al. "Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of temperature and dietary soybean oil." *Aquaculture* 252.2-4 (2006): 441-452.
- Røsjø, C., Nordrum, S., Olli, J., Krogdahl, Å., Ruyter, B., Holm, H., 2000. Lipid digestibility and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed medium-chain triglycerides. *Aquaculture* 190(1-2), 65-76.
- Rolfs, A., Bonkovsky, H.L., Kohlroser, J.G., McNeal, K., Sharma, A., Berger, U.V., Hediger, M.A., 2002. Intestinal expression of genes involved in iron absorption in humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 282, G598–G607. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00371.2001>
- Savolainen, L.C., Gatlin III, D.M., 2010. Evaluation of sulfur amino acid and zinc supplements to soybean-meal-based diets for hybrid striped bass. *Aquaculture* 307(3-4), 260-265.
- Sanden, Monica, et al. "Minor lipid metabolic perturbations in the liver of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) caused by suboptimal dietary content of nutrients from fish oil." *Fish physiology and biochemistry* 42 (2016): 1463-1480.
- Sissener, N. H., et al. "Temperature modulates liver lipid accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed low dietary levels of long-chain n-3 fatty acids." *Aquaculture Nutrition* 23.4 (2017): 865-878.
- Sveen, L., et al., Deep neural network analysis-a paradigm shift for histological examination of health and welfare of farmed fish. *Aquaculture*, 2021. 532: p. 736024.
- Sundh, H. and K.S. Sundell, Environmental impacts on fish mucosa, in *Mucosal health in aquaculture*. 2015, Elsevier. p. 171-197.
- Sundell, K.S. and H. Sundh, Intestinal fluid absorption in anadromous salmonids: importance of tight junctions and aquaporins. *Frontiers in physiology*, 2012. 3: p. 388.
- Sundell, K., et al., Low Omega-3 levels in the diet disturbs intestinal barrier and transporting functions of atlantic salmon freshwater and seawater smolts. *Frontiers in Physiology*, 2022. 13: p. 883621.
- Torrissen M, Ytteborg E, Svensen H, Stoknes I, Nilsson A, Østbye TK, Berge GM, Bou M, Ruyter B. Investigation of the functions of n-3 very-long-chain PUFAs in skin using in vivo Atlantic salmon and in vitro human and fish skin models. *British Journal of Nutrition*. 2023 Dec;130(11):1915-31.
- Ueda, S., Manabe, Y., Kubo, N., Morino, N., Yuasa, H., Shiotsu, M., ... & Kambe, T. (2022). Early secretory pathway-resident Zn transporter proteins contribute to cellular sphingolipid metabolism through activation of sphingomyelin phosphodiesterase 1. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 322(5), C948-C959.
- Wang X, Valenzano MC, Mercado JM, Zurbach EP, Mullin JM. Zinc supplementation modifies tight junctions and alters barrier function of CACO-2 human intestinal epithelial layers. *Dig Dis Sci*. 2013 Jan;58(1):77-87. doi: 10.1007/s10620-012-2328-8.

5.6 AP 2.1.-2.3. Mettet fett og samspill med kolesterol (HI ansvarlig i samarbeid med Skretting AI)

Medforfattere: Nini H. Sissener, Grethe Rosenlund, Thomas Larsson, Bjørg Kristine Hundal, Haohang Fang, Øystein Sæle, Antony Philip, Ingunn Stubhaug.

*Mesteparten av dataene i dette kapittelet er under publisering, og artikkelen er tilgjengelig som pre-print (ikke ferdig fagfelle-vurdert) her: «Saturated Fat and Cholesterol in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.)*

Feeds are Important for Fish Performance, Fillet Quality and Colour by Nini Hedberg Sissener, G. Rosenlund, Thomas Larsson, Øystein Sæle, B. Ruyter, Antony Jesu Prabhu Philip, I. Stubhaug: SSRN»

Relevante figurer og tabeller er tatt direkte fra denne artikkelen og referert til som Sissener et al (2025).

Det har også blitt publisert en artikkel fra dette forsøket som omhandler et tidsserie-uttak etter fôring med fokus på absorpsjon av fettløselige komponenter, fordøyelighet av fettsyrer og mineraler og retensjon av mineraler som påvirket av SFA og CHOL (Fang et al., 2025). De mest interessante funnene er gjengitt i denne rapporten, mens artikkelen i sin helhet er vedlagt, sånn at man finner alle detaljer der.

5.6.1 Forsøksdesign

Målsetting: Produsere laks med ulike nivåer av mettet fett og kolesterol i kroppen

Task 2.2 Videreføring av to ekstremgrupper for evaluering av filetkvalitet (HI ansvarlig, samarbeid Skretting). Dette ble økt til 4 grupper etter dialog med referansegruppen og ekstra bevilling fra FHF for å dekke ekstra analyser, samt egenbidrag fra Skretting AI for å dekke utvidelse av antall fôr og kar/fisk i fôringsforsøk).

Målsetting: To fôringsgrupper videreføres i forsøk opp til ca. 3 kg for å kunne evaluere effekt av mettede fettsyrer i dietten på filetkvalitet.

Task 2.3 Analyser AP2 (HI ansvarlig, samarbeid Skretting, GU, Nofima)

Målsetting: Fôringsforsøk med laks i sjøvann gir økt kunnskap om hvordan mettede fettsyrer og kolesterol i fôret påvirker helse, ytelse, kvalitet og lipid og mineralsammensetning.

Introduksjon

Fôr til oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) har endret seg betydelig de siste 20 årene, med redusert innhold av fiskeolje og økt bruk av planteoljer. Dette har ført til lavere nivåer av langkjedede omega-3 fettsyrer (n-3 LC-PUFA) og høyere nivåer av fettsyrer det er mye av i planteoljer, som 18:1n-9 og 18:2n-6. Disse endringene har vært grundig studert, men en konsekvens av redusert fiskeolje som har fått mindre oppmerksomhet er reduksjonen av mettet fett (SFA) og kolesterol (CHOL) i fôret.

Laks er fra naturen tilpasset en diett som inneholder relativt høye nivåer av SFA og CHOL. Selv om disse ikke anses som essensielle næringsstoffer, er det usikkert om laks kan produsere tilstrekkelig mengde selv når innholdet i fôret er svært lavt. Tidligere forskning har vist at lavt CHOL-nivå i plantebaserte dietter fører til oppregulering av kolesterolsyntese i leveren. Tilsvarende kan lave nivåer av SFA føre til økt endogen produksjon, noe som kan påvirke energibruk og vekst.

Et kommersielt laksefôr basert på fiskeolje inneholder normalt 22-28 % av fettsyrene som SFA, mens dagens kommersielle norske vekstfôr i snitt inneholder 16,6 % (15,1-19,4 %). SFA-nivået i cellemembraner holdes relativt konstant, men i filet, hvor nøytrale lipider dominerer, vil lavt SFA-nivå i fôret gjenspeiles i lavere nivåer i fileten. Studier har vist at dette kan påvirke både filetkvalitet og farge.

Målet med denne studien var å undersøke om det finnes et minimumsnivå av SFA i fôret som er nødvendig for å opprettholde god fiskeytelse og filetkvalitet, samt undersøke mulige interaksjoner mellom diettinnholdet av SFA og CHOL.

5.6.2 Metodikk

Diettene ble produsert ved Skretting Aquaculture Innovation (AI) sin pilotfabrikk (Stavanger, Norge). Fem dietter ble formulert til å inneholde henholdsvis 10, 15, 20, 25 og 30 % av totale fettsyrer (FA) som mettede fettsyrer (SFA) og ble navngitt SFA10, SFA15 osv. i henhold til deres SFA-innhold (Tabell 32). I tillegg ble ekstra batcher av SFA10- og SFA25-diettene produsert med tilsatt kolesterol (CHOL)

(Carbogen Amcis, Nederland), noe som resulterte i totalt syv dietter. Disse diettene ble kalt SFA10C og SFA25C. Forsøksdesignet inkluderte dermed både en regresjon for økende nivåer av SFA i dietten og et faktorielt design med høyt/lavt SFA og høyt/lavt CHOL.

Tabell 32 Formulering og analyse av forsøksfôrene, inkludert 4 mm pellets brukt fra august til desember 2021, 6 mm pellets brukt fra desember 2021 til mars 2022, og 9 mm pellets brukt fra mars 2022 til juni 2022. Tabell tatt fra Sissener et al (2025).

	SFA10	SFA10C	SFA15	SFA20	SFA25	SFA25C	SFA30
Ingredienser (g kg⁻¹), 4 mm pellets							
Soya protein konsentrat	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0	300,0
Hvetegluten	166,0	166,0	166,0	166,0	166,0	166,0	166,0
Rapsolje	164,9	164,9	152,0	123,0	93,9	93,9	65,1
Erteprotein konsentrat	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0	72,0
Hvete	69,0	67,0	69,0	69,0	69,0	67,0	69,0
Fiskemel	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Vitamin- og mineral premix	47,5	47,5	47,5	47,5	47,5	47,5	47,5
Camelinaolje	41,0	41,0	27,1	24,3	21,5	21,5	18,7
Solsikkemel	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Fababønner (dehulled)	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Guar mel	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Croda olje	15,5	15,5	-	-	-	-	-
Veramaris olje	11,9	11,9	30,7	30,7	30,7	30,7	30,7
Palmeolje	-	-	23,5	55,4	87,1	87,1	118,8
Yttrium premix	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Vann	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Astaxanthin	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Kolesterol	-	2,2	-	-	-	2,2	-
Analyserte verdier av utvalgte næringsstoffer, 4 mm pellets							
Kolesterol, mg kg⁻¹	509	2307	242	226	234	2384	217
Σ SFA, % av TFA	10,3	10,4	14,0	19,3	24,0	23,7	28,3
16:0, % av TFA	6,5	6,6	10,1	14,9	19,2	19,0	23,2
18:0, % av TFA	2,2	2,2	2,2	2,6	3,0	3,0	3,3
Σ MUFA, % av TFA	50,4	50,2	48,6	46,0	43,4	43,6	41,2
18:1n-9, % av TFA	42,9	42,9	42,6	40,8	38,9	39,1	37,4
Σ n-6, % av TFA	19,9	20,1	19,0	17,8	16,6	16,7	15,7
18:2n-6, % av TFA	19,0	19,2	18,1	16,9	15,8	15,9	14,9
20:4n-6, % av TFA	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Σ n-3, % av TFA	18,3	18,2	17,0	15,6	14,3	14,3	13,1
18:3n-3, % av TFA	10,3	10,3	8,6	7,2	5,9	6,0	4,7
EPA, % av TFA	2,0	2,0	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
DHA, % av TFA	5,2	5,2	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
EPA + DHA, % av TFA	7,2	7,1	7,7	7,7	7,8	7,7	7,7
n-6/n-3	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2
Fett, g kg ⁻¹	268	271	274	274	277	275	274
Protein, g kg ⁻¹	452	459	453	461	461	459	444
Aske, g kg ⁻¹	46	44	45	45	47	44	45

	SFA10	SFA10C	SFA15	SFA20	SFA25	SFA25C	SFA30
Vanninnhold, g kg ⁻¹	73	67	71	67	67	73	74
Ingrediens (g kg⁻¹), 6 mm pellets							
Soya protein konsentrat	280,0	280,0	-	-	280,0	280,0	-
Hvetegluten	168,2	168,2	-	-	90,0	90,0	-
Rapsolje	120,0	120,0	-	-	120,0	120,0	-
Erteprotein konsentrat	-	-	-	-	98,6	98,6	-
Hvete	60,1	60,1	-	-	37,9	37,9	-
Fiskemel	60,0	57,8	-	-	60,0	57,9	-
Vitamin- og mineral premix	52,3	52,3	-	-	52,3	52,3	-
Camelinaolje	50,4	50,4	-	-	50,4	50,4	-
Solsikkemel	50,0	50,0	-	-	50,0	50,0	-
Fababønner (dehulled)	50,0	50,0	-	-	50,0	50,0	-
Guar mel	46,7	46,7	-	-	46,7	46,7	-
Croda olje	20,0	20,0	-	-	20,0	20,0	-
Veramaris olje	17,8	17,8	-	-	31,3	31,3	-
Palmeolje	11,8	11,8	-	-	-	-	-
Yttrium premix	11,3	11,3	-	-	11,3	11,3	-
Vann	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	-
Astaxanthin	0,5	0,5	-	-	0,5	0,5	-
Kolesterol	-	2,2	-	-	-	2,2	-
Analyserte verdier av utvalgte næringsstoffer, 6 mm pellets							
Kolesterol, mg kg⁻¹	370	2116	-	-	296	2174	-
Σ SFA, % av TFA	10,5	10,4	-	-	23,7	24,2	-
16:0, % av TFA	6,6	6,5	-	-	18,9	19,3	-
18:0, % av TFA	2,2	2,2	-	-	3,0	3,0	-
Σ MUFA, % av TFA	49,7	49,6	-	-	43,6	43,1	-
18:1n-9, % av TFA	41,4	41,4	-	-	38,0	37,6	-
Σ n-6, % av TFA	19,5	19,6	-	-	16,3	16,1	-
18:2n-6, % av TFA	18,6	18,7	-	-	15,5	15,3	-
20:4n-6, % av TFA	0,4	0,4	-	-	0,2	0,2	-
Σ n-3, % av TFA	19,0	19,2	-	-	15,2	15,1	-
18:3n-3, % av TFA	11,1	11,3	-	-	6,9	6,7	-
EPA, % av TFA	2,2	2,2	-	-	2,6	2,6	-
DHA, % av TFA	4,9	4,9	-	-	4,7	4,8	-
EPA +DHA, % av TFA	7,1	7,0	-	-	7,3	7,4	-
n-6/n-3	1,0	1,0	-	-	1,1	1,1	-
Fett, g kg ⁻¹	292	290	-	-	294	296	-
Protein, g kg ⁻¹	421	418	-	-	410	413	-
Aske, g kg ⁻¹	44	44	-	-	45	44	-
Vanninnhold, g kg ⁻¹	68	69	-	-	73	70	-
Ingredienser (g kg⁻¹), 9 mm pellets							
Soya protein konsentrat	258,3	258,3	-	-	258,3	258,3	-
Hvetegluten	203,2	203,2	-	-	78,6	78,6	-

	SFA10	SFA10C	SFA15	SFA20	SFA25	SFA25C	SFA30
Rapsolje	144,9	144,9	-	-	144,9	144,9	-
Erteprotein konsentrat	-	-	-	-	131,3	131,3	-
Hvete	71,2	69	-	-	71,2	69	-
Fiskemel	65	65	-	-	55,4	55,4	-
Vitamin- og mineral premix	60	60	-	-	60	60	-
Camelinaolje	44,5	44,5	-	-	44,5	44,5	-
Solsikkelig	50	50	-	-	50	50	-
Fababønner (dehulled)	40	40	-	-	40	40	-
Guar mel	26,7	26,7	-	-	39,2	39,2	-
Croda olje	20	20	-	-	20	20	-
Veramaris olje	9,8	9,8	-	-	-	-	-
Palmeolje	5	5	-	-	5	5	-
Yttrium premix	1	1	-	-	1	1	-
Vann	0,5	0,5	-	-	0,5	0,5	-
Astaxanthin	-	2,2	-	-	-	2,2	-
Analyserte verdier av utvalgte næringsstoffer, 9 mm pellets							
Kolesterol, mg kg⁻¹	419	2142	-	-	321	2279	-
Σ SFA, % of TFA	10,3	10,4	-	-	25,8	26,4	-
16:0, % av TFA	6,7	6,7	-	-	20,9	21,5	-
18:0, % av TFA	2,1	2,1	-	-	3,1	3,1	-
Σ MUFA, % av TFA	50,6	50,4	-	-	41,7	41,2	-
18:1n-9, % av TFA	42,7	42,4	-	-	36,0	35,7	-
Σ n-6, % av TFA	19,0	19,0	-	-	15,6	15,4	-
18:2n-6, % av TFA	18,0	17,9	-	-	14,6	14,4	-
20:4n-6, % av TFA	0,3	0,3	-	-	0,3	0,3	-
Σ n-3, % av TFA	18,9	19,0	-	-	15,3	15,4	-
18:3n-3, % av TFA	11,0	11,0	-	-	7,1	7,1	-
EPA, % av TFA	1,9	1,9	-	-	2,0	2,0	-
DHA, % av TFA	5,2	5,3	-	-	5,4	5,5	-
EPA + DHA, % av TFA	7,1	7,2	-	-	7,4	7,5	-
n-6/n-3	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0	-
Fett, g kg ⁻¹	327	331	-	-	336	331	-
Protein, g kg ⁻¹	391	393	-	-	384	381	-
Aske, g kg ⁻¹	44	43	-	-	42	45	-
Vanninnhold, g kg ⁻¹	65	67	-	-	66	68	-

SFA; Mettede fettsyrer (FA), TFA; totale fettsyrer, EPA; eikosapentaensyre, DHA; dokosaheksensyre, MUFA; enumettede fettsyrer.

Fôrene ble produsert hovedsakelig med kommersielt relevante ingredienser. Ettersom fiskeolje inneholder en betydelig mengde SFA, ble det ikke brukt fiskeolje, og EPA og DHA ble i stedet tilført gjennom Veramaris-algeolje (Veramaris®, AX Delft, Nederland) samt noe Croda-olje (marint konsentrat av EPA og DHA, Incromega™ E1050, Croda Pharma, UK) for SFA10-fôrene. Veramaris-oljen inneholdt en liten mengde SFA, noe som betydde at SFA-nivået ikke kunne reduseres helt til 10 % ved bruk av denne oljen som eneste kilde til EPA og DHA. SFA-gradienten i diettene ble oppnådd ved

gradvis å erstatte palmeolje (som har høyt SFA-innhold) med en kombinasjon av rapsolje og camelinaolje.

Hvetemel ble fjernet fra dietter med tilsatt kolesterol, men ellers var proteinblandingen lik i alle dietter, og alle fôrene inneholdt 5 % fiskemel av den totale formuleringen. Fôrene ble formulert for å tilfredsstille alle kjente ernæringsbehov hos Atlantisk laks. Yttriumoksid ble tilsatt som en inert markør for beregning av fordøyelighet av næringsstoffer i fôret. Den komplette fôrformuleringen er vist i Tabell 32.

Tre fôr-batcher ble produsert, ettersom pelletstørrelsen måtte økes etter hvert som fisken vokste: 4 mm pellets for alle syv dietter, samt 6 mm og 9 mm pellets for de fire diettene som ble brukt i andre fase av forsøket (SFA10, SFA10C, SFA25 og SFA25C). Sammensetningen for 6 mm og 9 mm fôrene var tilsvarende 4 mm fôrene, men med en liten reduksjon i proteininnhold og en økning i fettinnhold, i tråd med vanlig praksis i kommersielle fôr, ettersom proteinbehovet avtar når fisken blir større.

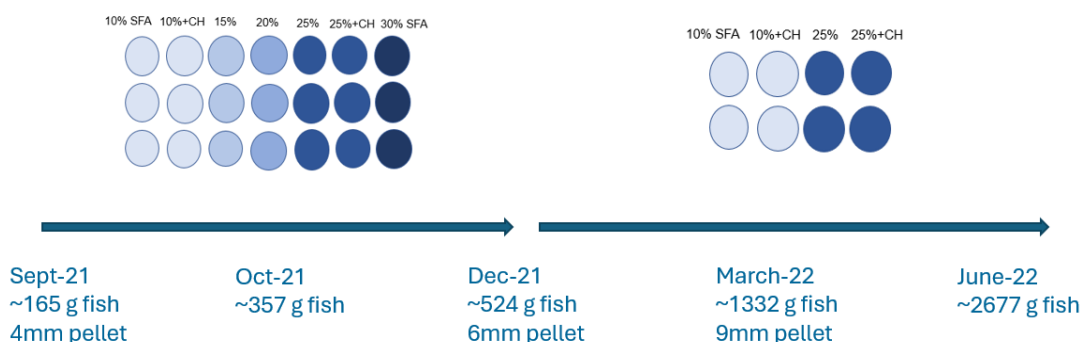
Sammensetningen av makronæringsstoffer var svært lik mellom alle diettene innen hver pellet-batch (Tabell 32). De faktiske verdiene for SFA i de ulike diettene var nær de formulerte nivåene og ga et spenn på 10–28 % SFA av totale fettsyrer. Kolesterolinnholdet var <500 mg/kg i alle dietter med lavt CHOL-innhold og >2100 mg/kg i dietter med høyt CHOL-innhold. For diettene uten tilsatt kolesterol var CHOL-nivået konsekvent litt høyere i SFA10-dietten, sannsynligvis på grunn av en liten mengde kolesterol til stede i Croda-oljen som ble brukt. EPA- og DHA-nivåene var like på tvers av diettene innen hver pellet-batch, mens det var en svak gradient i både totalt n-6, totalt n-3 (på grunn av en gradient i 18:3n-3) og totalt enumettede fettsyrer (MUFA), i motsatt retning av SFA.

Fiskeforsøk

Forsøket ble utført ved Skretting Al Lerang Forskningsstasjon (Strand, Norge) i samsvar med retningslinjene fra den norske statens komité for forsøksdyr. Nasjonale mattrygghetsmyndigheter godkjente protokollen (identifikasjonsnummer: FOTS ID 15387). Fiskegruppen som ble brukt bestod av hunnlaks av atlantisk laks (Benchmark Genetics, Stofnfiskur, Island, befruktet 26.03.2020), vaksinert med Alpha Ject micro 6 ca. tre måneder før forsøket.

Forsøket var delt inn i to faser. I første fase ble fisken fôret med syv forskjellige eksperimentelle dietter, mens i andre fase ble fire dietter benyttet. I september 2021 ble fisken akklimatisert i 14 dager i sirkulære tanker (Ø 1 m, 450 L), der de ble fôret med et kommersielt Skretting-fôr (Spirit Supreme Plus 75/70A, 3 mm pellets). Etter to ukers akklimatisering ble all fisk veid og sortert 16. september. De syv eksperimentelle diettene ble gitt fra 18. september til 15./16. desember i triplikate kar (Figur 59), med 90 fisk per kar ved oppstart av forsøket. Karene hadde gjennomstrømmende sjøvann ved 12 °C, og fisken ble eksponert for kontinuerlig lys (24 t) gjennom hele forsøket.

Experimental time line:



Figur 59 Oversikt over det eksperimentelle oppsettet. Forsøket startet i september 2021, med 7 dietter (5 nivåer av SFA, og to av disse også med tilsatt CHOL) gitt til triplikate kar. Fiskene ble veid i oktober for å vurdere vekst, før omfattende prøvetaking fra alle diettgrupper i desember. Etter denne prøvetakingen ble kun fire diettgrupper videreført (SFA10, SFA10C, SFA25, SFA25C) i duplikate kar og føret med 6 mm pellets. I mars 2022 ble alle fisk veid, og pelletstørrelsen ble endret fra 6 mm til 9 mm. Den siste prøvetakingen ble gjennomført i juni 2022, etter totalt 9 måneder med fôring. Fra Sissener et al, 2025.

Fisken ble føret til metthet, med en estimert overfôring på 10 % for å sikre at vekstpotensialet til fôrene ble fullt utnyttet, ved bruk av automatiske fôringssystemer (Hølland Teknologi AS, Sandnes, Norge). Fôringen ble utført tre ganger daglig, med måltider som varte i to timer (07:30-09:30, 12:00-14:00, 18:00-20:00). Innsamling av eventuelt ikke spist fôr ble gjort 30 minutter etter at hvert måltid var ferdig (for det tredje måltidet i 1 m-karene ble dette gjort dagen etter) for å overvåke fôropptaket. Standard driftsrutiner ved forskningsstasjonen ble fulgt.

I den andre delen av forsøket, hvor kun fire diettgrupper (SFA10, SFA10C, SFA25, SFA25C) ble testet, ble gjenværende fisk fra første fase merket med pit-tag (RFID Solutions AS, Stavanger, Norge) 16. desember (etter prøvetaking). Forsøket ble deretter flyttet til større sirkulære kar (Ø 3 m, 7000 L), der hvert kar startet med 102 fisk og endte med 79 fisk. Av disse var 58 fisk fra de opprinnelige diettgruppene som er rapportert i denne studien, mens de resterende 44 fiskene per kar kom fra andre diettgrupper og ble kun holdt i karene for å opprettholde optimal tetthet gjennom forsøket.

De fire ulike diettene ble gitt i duplikate kar i denne fasen. Fôringen ble utført som tidligere beskrevet, men med to måltider per dag (07:30-09:30 og 12:00-14:00). 6 mm pellets ble brukt fra desember til 15. mars, og 9 mm pellets fra mars til juni.

Prøvetaking

Ved oppstart av forsøket ble all fisk veid (164,7 g, SD 20,5). Etter omtrent 7 uker med fôring (9. november) ble all fisk veid på nytt for å beregne fôr- og vekstparametere. Hovedprøvetakingen ble utført etter 3 måneder med fôring (15.–16. desember) for alle syv diettgrupper, og etter 9 måneder med fôring (15.–16. juni) for de fire diettgruppene som ble brukt i andre del av forsøket. I mars, da pelletstørrelsen ble endret, ble all fisk veid for å evaluere fôr- og vekstparametere. I tillegg ble det tatt ut hele fisker og homogenisert i forbindelse med veiingen 9. november. Det ble også gjennomført et tidsuttak, med uttak av plasma og tarm fra fisk i SFA10, SFA10C, SFA25 og SFA25-gruppene etter 48 t faste, og deretter på ulike tidspunkt fra 1,5 til 36 t etter fôring, beskrevet i detalj i Fang et al. (2025).

Den prøvetatte fisken ble avlivet med en overdose av bedøvelsesmiddel (Tricaine Pharmaq, 0,2 g/l). Før prøvetaking ble fisken sultet i 24 timer. Under prøvetakingen i desember ble all fisk veid, og gaffellengde ble målt (144–150 fisk per diettgruppe). Homogenater av samleprøver fra muskel (Norsk kvalitetskontroll, NQC) ble laget med muskel fra 6 fisk per kar, for analyse av fettsyrer, totalt lipid, kolesterol

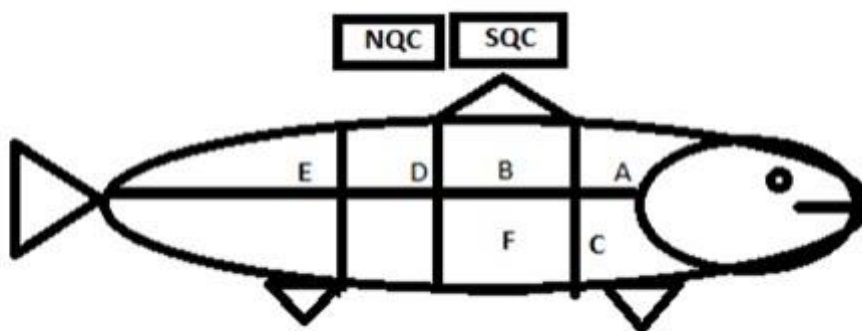
og astaxantin. Sløyd vekt ble registrert for 6 fisk per kar og brukt til å beregne slakteutbytte (vekt av sløyd fisk i % av total vekt). Homogeniserte prøver av hele fisk ble laget fra 5 fisk per kar (samleprøver).

Fisken som ble brukt i andre del av forsøket (desember–juni) ble individuelt veid også i mars (da pelletstørrelsen ble endret fra 6 mm til 9 mm) og i juni (ved sluttuttak). På grunn av PIT-merking ble disse dataene også brukt til å beregne vektøkning og veksthastighet for hver enkelt fisk. Fisk med en veksthastighet på <40 % av gjennomsnittlig veksthastighet i populasjonen ble ekskludert; dette gjaldt to fisk i perioden desember–mars (gruppene SFA10C og SFA25C) og tre fisk i perioden mars–juni (gruppene SFA10, SFA25, SFA25C).

Ved sluttuttaket i juni ble kun fisk som hadde fått samme diett fra forsøksstart (september–juni) tatt prøver av til videre analyser og evaluering. I juni ble NQC (venstre side) fra 20 individuelle fisk prøvetatt per tank og homogenisert individuelt. For vurdering av væsketap ble tre filetstykker (50 g $\pm$ 10 g) skåret ut like foran NQC-området. Disse ble veid og plassert i en forhåndsveid ziplock-pose med absorberende pute. Filetstykkene ble holdt på is under prøvetakingen av hvert kar og deretter frosset ved -20 °C.

Digital SalmoFan™ (Salmon App versjon 2.1.1, DSM-Firmenich, Sveits) ble brukt til å måle pigmentering i 20 fisk per tank (40 per diettgruppe), og ga en skår mellom 20 (lyserød) og 34 (mørkerød). Hver filet ble skannet 6 ganger (ulike steder innenfor NQC), og gjennomsnittet av skanningene ble brukt som verdien for den individuelle fileten.

Videre ble filetenes farge målt med Minolta Chroma Meter (CR-400 Minolta, Konica Minolta Sensing Inc., Japan) på seks steder på fileten (merket A-F, se Figur 60), for 20 fisk per tank (40 per diettgruppe, samme fisk som brukt for SalmoFan). Dette ga L*, a* og b*-verdier, der L* representerer lyshet (høyere L*-verdi betyr lysere farge), a* representerer rødhets (høyere a*-verdi betyr rødere farge), og b* representerer gulhet (høyere b*-verdi betyr mer gul farge).



Figur 60 Filetseksjoner for måling med Minolta Chromo Meter

Fôranalyser

Fôranalyser ble utført ved Skretting AI Laboratory (Stavanger, Norge). Totalt nitrogen ble bestemt ved bruk av Kjeldahl-metoden, og råprotein ble beregnet som $N \times 6,25$ (NMKL, 2003). Totalt fett ble målt ved NMR (NMKL, 2014). Fuktighet ble målt gravimetrisk etter tørking ved 103 °C i 24 timer (NMKL, 1991), og aske ble målt etter forbrenning av prøven ved 550 °C i 16–18 timer (NMKL, 1991). Fettsyreanalyse ble utført etter metylering av fettsyrer i metanolisk HCl og ekstraksjon i heksan (Grahls-Nielsen og Barnung, 1985). Fettsyresammensetningen ble bestemt etter separasjon av metylestere i en gasskromatograf (Scion 436 GC med CP-8400 autosamler, Scion Instruments, Livingstone, UK). Kolesterol ble analysert ved HPLC-metoden av Masterlab (Boxmeer, Nederland).

Filet og helfisk; proksimat analyser, fettsyrer (FA), kolesterol og astaxantin

Protein ble beregnet som $N \times 6,25$. Totalt fett i filet ble målt gravimetrisk etter syrehydrolyse og ekstraksjon med dietyleter, mens fettsyrer ble analysert ved GLC (gas liquid chromatography) (Lie og Lambertsen, 1991). Tørrstoff og aske ble målt gravimetrisk etter tørking ved 104 °C i 24 timer og forbrenning ved 550 °C i 16–18 timer. For fettsyreanalyse ble lipider ekstrahert ifølge Folch-metoden (Folch et al., 1957). Astaxantin i fileten ble analysert ved en akkreditert normalfase HPLC-metode med deteksjon ved 470 nm (Ørnsrud et al., 2004).

Væsketap og fasthet av filet

Etter å ha vært fryst i ~2 måneder ble filetsnittene tint over natten ved 12 °C. Etter tining ble prøvene tørket kort med en absorberende pad før både filetskykket og posen med pad ble veid. Prøvene ble deretter frosset igjen og sendt til Nofima for testing av fasthet av filet. Instrumentell teksturanalyse for fasthet av fileten ble utført ved bruk av Texture Analyzer TA.XTplus100C (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) med en 30 kg lastcelle og en sylindereformet probe (ø 0,5", type P/0.5).

Beregninger

Spesifikk vekstrate (SGR) % = $[\ln(\text{sluttvekt}) - \ln(\text{startvekt})] \times 100/\text{dager}$

Kondisjonsfaktor (K) = $(bw/fl^3) \times 100$ (bw = kroppsvekt, fl = fork length/ gaffellengde)

Fôrutnyttelse (FCR) = $\text{totalt fôrinntak}/(\text{sluttbiomasse} - \text{startbiomasse})$

Næringsstoffretensjon = $[(\text{sluttbiomasse} \times \text{sluttkonsentrasjon av næringsstoff}) - (\text{startbiomasse} \times \text{startkonsentrasjon av næringsstoff})] \times 100/(\text{Totalt fôrinntak} \times \text{konsentrasjon av næringsstoff i fôr})$.

Statistikk

Statistisk analyse ble utført ved bruk av programvaren Statistica (Versjon 13; Statsoft, Tulsa, OK, USA). One-way ANOVA med Tukey's HSD som post-hoc test ble brukt for sammenligning mellom alle diettgrupper, mens toveis ANOVA ble brukt for å undersøke effekten av høyt/lavt SFA og høyt/lavt CHOL. P-verdier < 0,05 ble ansett som statistisk signifikante, men litt høyere p-verdier diskuteres som trender der disse anses som biologisk relevante.

5.6.3 Resultat og diskusjon A2 mettet fett og kolesterol: Vekst, fôrinntak, retensjon, fettsyresammensetning

Vekst

I løpet av de første 7 ukene av forsøket var det en (ikke statistisk signifikant) tendens til at lavt SFA i kombinasjon med lavt CHOL førte til redusert fôropptak og vekst (Tabell 33). Fôrutnyttelsesgrad (FCR) var ikke signifikant forskjellig mellom gruppene, men det var en ikke-signifikant tendens til forbedret FCR med tilsatt CHOL, mens SFA10-gruppen hadde det numerisk høyeste FCR. For individuelle vekter på dette tidspunktet hadde SFA10-gruppen signifikant lavere vekter enn alle andre diettgrupper, og toveis ANOVA viste en sterkt signifikant interaksjonseffekt mellom SFA og CHOL, samt en effekt av CHOL. Et lignende mønster ble observert for kondisjonsfaktor (CF), med lavere CF i SFA10-gruppen sammenlignet med de fleste andre grupper, og signifikante effekter av CHOL og interaksjonen SFA*CHOL. Det ble ikke observert signifikante forskjeller i lengde.

Tabell 33 Fiskens ytelse i løpet av de første tre månedene av forsøket (september – desember), hvor alle 7 dietter ble gitt til triplikate kar med atlantisk laks. SGR, fôrinntak og FCR er oppgitt per kar (n=3) og separert for de to periodene fra september–november og november–desember. Superskript bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom individuelle diettgrupper, påvist ved enveis ANOVA, mens de tre kolonnene til høyre viser resultatene fra toveis ANOVA med høy/lav SFA og høy/lav CHOL som kategoriske faktorer (kun data fra gruppene SFA10, SFA10C, SFA25 og SFA25C er inkludert). SGR, fôrinntak og FCR er beregnet per tank (n=3 per diettgruppe). November: vekt, lengde og CF er basert på data fra 163–165 fisk per diettgruppe. Desember: vekt, lengde og CF er basert på data fra 144–150 fisk per diettgruppe. Utbytte (vekt av sløyd fisk i % av totalvekt) er basert på data fra 6 fisk per kar (18 fisk per diettgruppe).

	SFA10	SFA10C	SFA15	SFA20	SFA25	SFA25C	SFA30	ANOVA SFA	ANOVA CHOL	Inter- action
Initial weight (Sept 16th)										
Weight, g	163,8 ± 20,5	166,2 ± 19,6	165,2 ± 20,1	164,2 ± 21,5	163,8 ± 20,2	165,7 ± 21,1	163,7 ± 20,3	n.s.	n.s.	n.s.
November 9th (after 50 feeding days, ~7 weeks)										
Weight, g	332,5 ± 43,3 ^a	364,4 ± 50,3 ^b	365,3 ± 53,2 ^b	354,7 ± 48,9 ^b	364,0 ± 49,8 ^b	362,5 ± 53,3 ^b	357,2 ± 44,2 ^b	n.s.	p=0,0005	p=0,0008
SGR	1,43 ± 0,04	1,58 ± 0,12	1,60 ± 0,15	1,54 ± 0,05	1,60 ± 0,13	1,58 ± 0,02	1,57 ± 0,05	n.s., p=0,13	n.s.	n.s., p=0,14
Length	30,6 ± 3,8	31,1 ± 1,4	31,1 ± 1,5	30,6 ± 1,4	30,9 ± 1,6	30,9 ± 1,5	30,8 ± 1,3	n.s.	n.s.	n.s.
CF	1,18 ± 0,12 ^a	1,22 ± 0,14 ^{ab}	1,21 ± 0,06 ^b	1,24 ± 0,16 ^b	1,24 ± 0,16 ^b	1,22 ± 0,08 ^{ab}	1,22 ± 0,09 ^b	n.s.	p=0,02	p=0,04
Feed intake	1,15 ± 0,02	1,22 ± 0,08	1,23 ± 0,06	1,19 ± 0,02	1,25 ± 0,05	1,22 ± 0,02	1,24 ± 0,04	n.s., p=0,10	n.s.	n.s., p=0,11
FCR	0,81 ± 0,01	0,77 ± 0,01	0,77 ± 0,03	0,77 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,77 ± 0,00	0,79 ± 0,00	n.s.	n.s., p=0,11	n.s.
December 15th-16th (total 83-84 feeding days, ~12 weeks)										
Weight, g	487,9 ± 63,4 ^a	528,7 ± 86,5 ^{bc}	537,9 ± 81,5 ^{bc}	525,6 ± 76,2 ^{bc}	543,0 ± 76,1 ^c	533,1 ± 76,9 ^{bc}	512,7 ± 62,6 ^{ab}	p<0,0001	p=0,01	p<0,0001
SGR	1,15 ± 0,02	1,10 ± 0,09	1,16 ± 0,08	1,19 ± 0,04	1,22 ± 0,05	1,15 ± 0,05	1,10 ± 0,04	n.s., p=0,12	n.s.	n.s.
Length	33,8 ± 1,6 ^a	34,3 ± 1,7 ^{ab}	34,5 ± 1,6 ^b	34,1 ± 1,6 ^{ab}	34,4 ± 1,6 ^b	34,5 ± 2,6 ^b	34,3 ± 2,5 ^{ab}	p=0,0007	p=0,03	n.s.
CF	1,26 ± 0,09 ^a	1,31 ± 0,20 ^b	1,31 ± 0,07 ^b	1,32 ± 0,10 ^b	1,32 ± 0,08 ^b	1,29 ± 0,07 ^{ab}	1,28 ± 0,13 ^{ab}	n.s., p=0,06	n.s.	p<0,0001
Yield%	88,8 ± 0,7 ^a	88,5 ± 1,1 ^a	89,5 ± 1,1 ^{ab}	89,4 ± 1,0 ^{ab}	88,6 ± 1,0 ^a	88,5 ± 0,6 ^a	90,1 ± 1,3 ^b	n.s.	n.s.	n.s.
Feed intake	1,05 ± 0,03	1,01 ± 0,08	1,06 ± 0,06	1,07 ± 0,03	1,12 ± 0,04	1,07 ± 0,02	1,05 ± 0,04	n.s., p=0,053	n.s.	n.s.
FCR	0,91 ± 0,02	0,92 ± 0,03	0,92 ± 0,01	0,91 ± 0,03	0,92 ± 0,02	0,93 ± 0,02	0,95 ± 0,02	n.s.	n.s.	n.s.

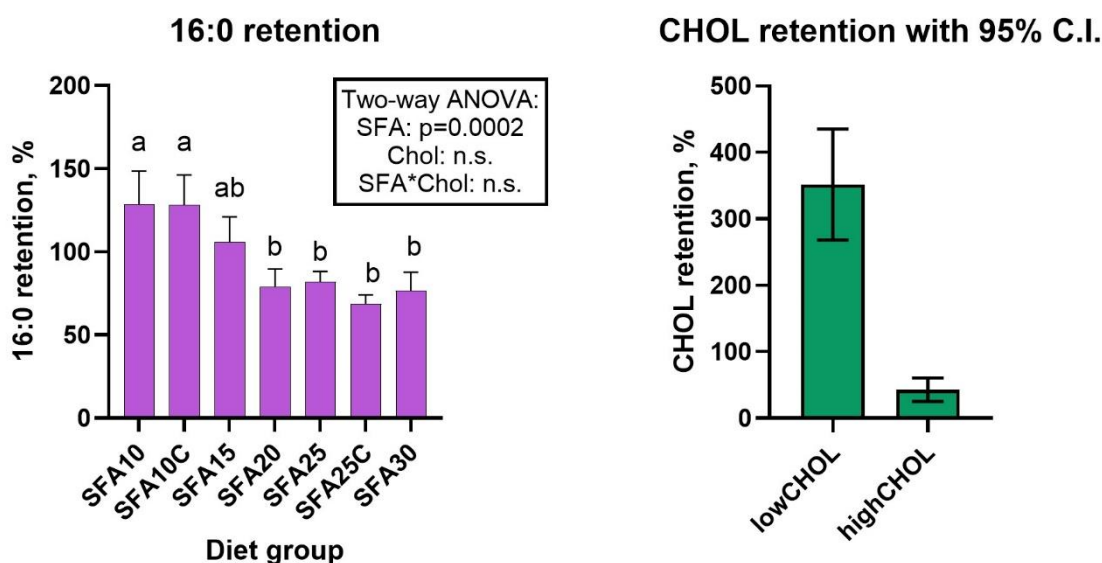
Initial weight: 164,7 g. Unit feed intake = %/day. SGR; Specific growth rate, RGI; Relative growth index, CF; condition factor, FCR; feed conversion ratio. Tabell fra Sissener et al, 2025.

Ved sluttuttaket av alle syv diettgruppene (desember, etter 12 ukers fôring), ble det observert en tendens til redusert fôropptak og redusert veksthastighet ved lavt SFA (p=0,053), uten noen indikasjon på interaksjon med CHOL. FCR var ikke signifikant forskjellig mellom gruppene. Fiskens vekt på dette tidspunktet ble signifikant påvirket av både diettens SFA-innhold, CHOL-innhold og interaksjonen mellom disse (Tabell 33). Begge faktorene reduserte sluttvektene når de var lave i diettene, mens kombinasjonen av lavt SFA og lavt CHOL hadde størst negativ innvirkning på fiskevekten.

Ser man på alle de syv diettgruppene, hadde de fleste gruppene signifikant høyere vekter enn SFA10-gruppen, med unntak av SFA30, som hadde en mellomposisjon. SFA30 hadde også signifikant lavere vekter enn den best presterende gruppen, SFA25. Lengden var ikke signifikant forskjellig mellom

gruppene, mens CF var signifikant lavere i SFA10-gruppen enn i de fleste andre grupper, noe som også resulterte i signifikante effekter av CHOL og SFA*CHOL i toveis ANOVA. Slakteutbytte ("guttet weight" i % av totalvekt) ble ikke påvirket av hovedfaktorene SFA eller CHOL, men ved sammenligning av enkeltgrupper hadde SFA30-gruppen signifikant bedre slakteutbytte enn flere av de andre diettgruppene.

Den tilsynelatende retensjonen av SFA-palmitinsyre (16:0) økte med synkende SFA i fôret (Figur 61), med omtrent 130 % i SFA10-gruppene (95 % konfidensintervall: 111–146 % for disse to gruppene), ~106 % i SFA15-gruppen, og tilsynelatende stabil rundt 69–82 % for de andre gruppene (SFA20–30). Dette støtter hypotesen om endogen produksjon av 16:0 i gruppene med lavt SFA, siden verdier over 100 % ikke kan være tilført gjennom dietten alene.



Figur 61 Retensjon av 16:0 og kolesterol. Tilsynelatende retensjon (økning av næringsstoff i % av mengden inntatt næringsstoff) i fôringsperioden fra november – desember for den mettede fettsyren 16:0 og kolesterol (CHOL). Retensjon av 16:0 vises for alle diettgrupper (gjennomsnitt og standardavvik), med bokstaver som indikerer forskjeller påvist ved enveis ANOVA, og resultater fra toveis ANOVA vist i boksen. For CHOL sammenlignes de fem diettgruppene uten tilsatt CHOL (lowCHOL) og de to gruppene med tilsatt CHOL (highCHOL), hvor figuren viser gjennomsnitt og 95 % konfidensintervall. Figur fra Sissener et al, 2025.

Gjennomsnittlig retensjon av CHOL i gruppene uten tilsatt CHOL var 352 %, sammenlignet med 43 % i gruppene med tilsatt CHOL. 95 %-konfidensintervallene viser tydelige forskjeller mellom gruppene med høyt og lavt CHOL, og at gruppen med lavt CHOL ligger godt over 100 %, noe som indikerer høy endogen produksjon.

I løpet av de siste 6 månedene av forsøket ble signifikante effekter observert for de fleste vekstparametere (Tabell 34). Mens vekstdata for all fisk i desember er gitt i Tabell 33, er vektene i desember for fiskene som inngikk i andre fase av forsøket også inkludert i Tabell 34, for å kunne følge deres videre utvikling. Ved starten av andre fase (desember) var vektene signifikant redusert både av lavt SFA, lavt CHOL og deres interaksjon, noe som betydde at fisk fôret med lave nivåer av begge faktorene (SFA10) var de minste.

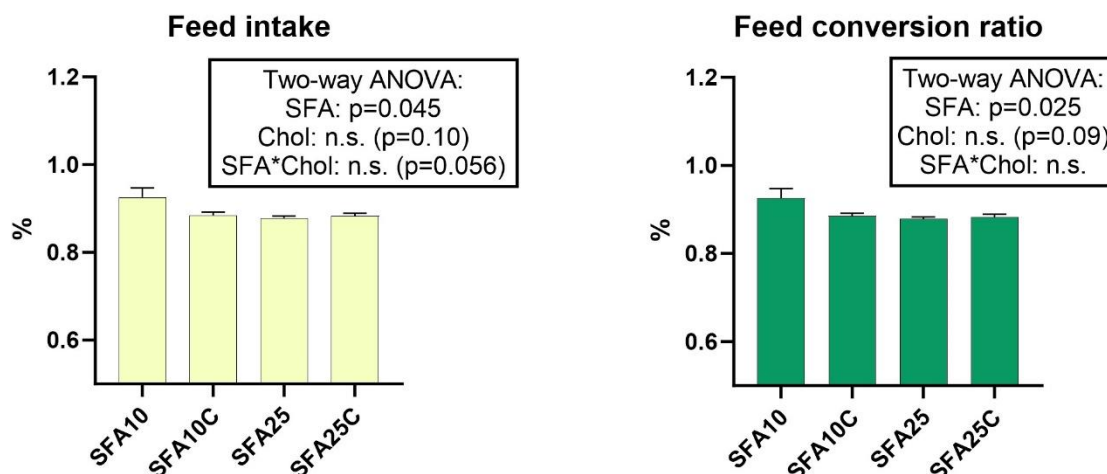
Tabell 34 Ytelsen til atlantisk laks føret med fire dietter med høy/lav SFA og CHOL i et faktorielt forsøksdesign, desember – juni. Resultatene er oppgitt som gjennomsnitt og standardavvik, samt statistiske resultater fra en toveis ANOVA med høy/lav SFA og høy/lav CHOL som kategoriske faktorer. Vektdata (desember, mars og juni) er basert på alle fisk i denne delen av forsøket (110–116 fisk per diettgruppe), og SGR samt vektøkning i % er også beregnet for hver enkelt fisk individuelt (på grunn av PIT-merker). RGI, fôrinntak og FCR er oppgitt for hele perioden fra desember – juni og er beregnet per tank (n=2 per diettgruppe). Lengde, CF og slakteutbytte i juni er basert på 40 fisk per diettgruppe.

	SFA10	SFA10C	SFA25	SFA25C	ANOVA SFA	ANOVA Chol	Interaction
Weight, Dec, g	486 ± 64	526 ± 82	539 ± 80	529 ± 72	p<0,0001	p=0,03	p=0,0003
SGR, Dec-March	1,10 ± 0,14	1,02 ± 0,16	1,04 ± 0,15	1,09 ± 0,14	n.s.	n.s., p=0,17	p<0,0001
Gain %, Dec-March	170 ± 32	150 ± 34	155 ± 31	165 ± 31	n.s.	n.s., p=0,13	p<0,0001
Weight, March, g	1315 ± 236	1313 ± 240	1364 ± 229	1401 ± 221	p=0,002	n.s.	n.s.
SGR, March-June	0,72 ± 0,13	0,76 ± 0,15	0,76 ± 0,15	0,77 ± 0,11	p=0,03	n.s., p=0,07	n.s.
Gain %, March-June	97 ± 23	104 ± 28	105 ± 26	106 ± 21	p=0,04	n.s., p=0,08	n.s., p=0,12
Weight, June, g	2563 ± 434	2650 ± 522	2774 ± 505	2842 ± 460	p<0,0001	n.s., p=0,09	n.s.
Length, June, cm	57,6 ± 6,4	55,8 ± 2,0	56,9 ± 2,5	57,9 ± 4,6	n.s.	n.s.	n.s., p=0,06
CF, June	1,46 ± 0,28	1,59 ± 0,10	1,57 ± 0,08	1,53 ± 0,20	n.s.	n.s.	p=0,006
Yield %, June	87,2 ± 1,3	87,3 ± 5,2	88,2 ± 1,3	87,8 ± 1,2	n.s., p=0,13	n.s.	n.s.

SGR; Specific growth rate, CF; condition factor. Yield = gutted weight as % of total weight. Tabell fra Sissener et al, 2025.

I perioden desember-mars ble det observert en viss kompensierende vekst i denne gruppen (SFA10), noe som resulterte i høyere spesifikk vekstrate (SGR) og vektøkning (signifikant effekt av SFA*CHOL). Likevel var vektene i mars signifikant lavere for gruppene med lavt SFA sammenlignet med gruppene med høyt SFA. Fra mars til juni ble redusert vekst observert ved lavt diett-SFA, og sluttvektene var signifikant lavere i gruppene med lavt SFA. Når det gjelder CHOL, var effektene på vekst mindre tydelige enn for SFA, med tendenser eller signifikante effekter på enkelte tidspunkter, hovedsakelig som interaksjonseffekter med SFA, men uten et konsekvent mønster.

Ved sluttuttaket var det en tendens (p=0,09) til økt sluttvekt hos fisk som fikk tilsatt CHOL, med en lignende tendens til forbedret vekst i perioden frem til slutten av forsøket. For CF var det en svært signifikant interaksjonseffekt mellom SFA og CHOL, der fisk med lave nivåer av begge faktorene hadde lavere CF. Den reduserte veksten ved lavt SFA skjedde til tross for økt fôrinntak i disse gruppene, noe som også førte til økt FCR (Figur 62).



Figur 62 Fôrinntak (enhet: % av kroppsvekt/dag) og fôrutnyttelsesgrad (FCR) i den andre fasen av forsøket fra desember – juni. Data er presentert som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik. De fire diettgruppene er SFA10; som inneholder 10 % mettet fett (SFA) som andel av totale fettsyrer, SFA10C; 10 % SFA med tilsatt kolesterol (CHOL), SFA25; 25 % SFA og SFA25C; 25 % SFA med tilsatt CHOL. Figur fra Sissener et al, 2025.

Filetanalyser

I desember var det ingen forskjeller mellom diettgruppene i fettinnhold, totalt fettsyreinnhold eller kolesterolnivå i fileten (Tabell 35). Det var imidlertid store forskjeller i fettsyreprofilen i fileten. Bortsett fra DHA var gruppene med lavt SFA og høyt SFA generelt forskjellige i de fleste fettsyrer, noe som reflekterte forskjellene i diettene. Total SFA i fileten varierte fra 12,5 til 23,8 % av totale fettsyrer (TFA), sammenlignet med 10,5 til 28,3 % i fôrene. Dette gjenspeilte fôrene, men med noen modifikasjoner. De tre gruppene med lavest SFA i fôr hadde høyere relative nivåer i fileten enn i fôret, mens det motsatte var tilfellet for de fire gruppene med høyest SFA i fôr. Andre fettsyreklasser i fileten lignet tett på diettkomposisjonen, mens DHA skilte seg ut ved å ha høyere nivåer i filetene enn i fôrene i alle diettgrupper, med høyest nivå observert i SFA30-gruppen. Diett-CHOL påvirket nivåene av 18:2n-6, 20:4n-6, total n-6 og 18:3n-3 i fileten, som alle var noe høyere med tilsatt CHOL.

Tabell 35 Resultater for fettsyreprofil i muskel (% av totale fettsyrer), totale fettsyrer, fett, kolesterol og astaxantin etter 3 måneder med fôring av de 7 eksperimentelle diettene (desember). Analysert på sammenslåtte prøver per kar (n=3 per diettgruppe), der hver samleprøve består av NQC fra 6 fisk. Superskript bokstaver indikerer signifikante forskjeller mellom individuelle diettgrupper, påvist ved enveis ANOVA, mens de tre kolonnene til høyre viser resultatene fra toveis ANOVA med høy/lav SFA og høy/lav CHOL som kategoriske faktorer (kun data fra gruppene SFA10, SFA10C, SFA25 og SFA25C er inkludert). Alle verdier er oppgitt som gjennomsnitt ± standardavvik (SD). Tabell fra Sissener et al., 2025.

	SFA 10	SFA 10C	SFA 15	SFA 20	SFA 25	SFA 25C	SFA 30	SFA	CHOL	Inter- action
16:0	8,6 ± 0,0 ^a	8,5 ± 0,2 ^a	10,9 ± 0,3 ^b	13,9 ± 0,1 ^c	16,4 ± 0,1 ^d	16,5 ± 0,2 ^d	18,9 ± 0,1 ^e	p<0,0001	n.s.	n.s.
18:0	2,7 ± 0,0 ^a	2,7 ± 0,1 ^a	2,8 ± 0,1 ^a	3,1 ± 0,0 ^b	3,3 ± 0,0 ^c	3,3 ± 0,1 ^c	3,4 ± 0,1 ^c	p<0,0001	n.s.	n.s.
sum SFA	12,7 ± 0,1 ^a	12,5 ± 0,3 ^a	15,2 ± 0,1 ^b	18,3 ± 0,2 ^c	21,1 ± 0,1 ^d	21,2 ± 0,2 ^d	23,8 ± 0,2 ^e	p<0,0001	n.s.	n.s.
18:1n-9	40,3 ± 0,1 ^{ab}	40,5 ± 0,5 ^{ab}	40,7 ± 0,2 ^a	39,9 ± 0,2 ^{bc}	38,8 ± 0,2 ^c	38,7 ± 0,1 ^c	37,7 ± 0,1 ^d	p<0,0001	n.s.	n.s.
sum MUFA	49,4 ± 0,1 ^a	49,3 ± 0,4 ^a	48,5 ± 0,1 ^b	47,2 ± 0,2 ^c	45,9 ± 0,1 ^d	45,9 ± 0,1 ^d	44,4 ± 0,1 ^e	p<0,0001	n.s.	n.s.
18:2n-6	16,0 ± 0,1 ^a	16,2 ± 0,1 ^a	15,3 ± 0,1 ^b	14,7 ± 0,2 ^c	13,9 ± 0,1 ^d	14,0 ± 0,1 ^d	13,4 ± 0,2 ^e	p<0,0001	p=0,04	n.s.
20:4n-6	0,9 ± 0,0 ^{ab}	1,0 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,1 ^{bc}	0,8 ± 0,0 ^{bc}	0,8 ± 0,0 ^c	0,8 ± 0,0 ^{bc}	0,7 ± 0,8 ^c	p<0,0001	p=0,004	n.s.
Sum n-6	18,9 ± 0,1 ^a	19,2 ± 0,1 ^a	18,2 ± 0,1 ^b	17,5 ± 0,2 ^c	16,7 ± 0,1 ^d	16,7 ± 0,1 ^d	16,0 ± 0,2 ^e	p<0,0001	p=0,001	p=0,01
18:3n-3	7,6 ± 0,1 ^b	7,9 ± 0,1 ^a	6,5 ± 0,1 ^c	5,7 ± 0,1 ^d	4,8 ± 0,1 ^e	4,9 ± 0,0 ^e	4,0 ± 0,1 ^f	p<0,0001	p=0,04	n.s.
20:5n-3 (EPA)	1,7 ± 0,0 ^a	1,7 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,1 ^{ab}	1,8 ± 0,0 ^{ab}	1,9 ± 0,1 ^b	1,9 ± 0,1 ^{ab}	p=0,01	n.s., p=0,08	n.s., p=0,08
22:6n-3 (DHA)	6,5 ± 0,0 ^{ab}	6,4 ± 0,3 ^a	6,5 ± 0,1 ^a	6,5 ± 0,2 ^a	6,6 ± 0,2 ^{ab}	6,5 ± 0,1 ^a	7,0 ± 0,1 ^b	n.s.	n.s.	n.s.
EPA+DH A	8,2 ± 0,1 ^a	8,0 ± 0,5 ^a	8,4 ± 0,1 ^{ab}	8,4 ± 0,1 ^{ab}	8,5 ± 0,2 ^{ab}	8,4 ± 0,1 ^{ab}	8,9 ± 0,1 ^b	n.s., p=0,07	n.s.	n.s.
Sum n-3	17,8 ± 0,0 ^a	17,8 ± 0,4 ^a	16,7 ± 0,2 ^b	15,8 ± 0,1 ^c	15,0 ± 0,2 ^d	14,9 ± 0,1 ^d	14,0 ± 0,2 ^d	p<0,0001	n.s.	n.s.
n-6/n-3	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	n.s.	n.s.	n.s.
Total FA g kg ⁻¹	92,2 ± 1,3	94,2 ± 13,5	97,7 ± 5,6	94,3 ± 1,2	95,4 ± 2,4	97,9 ± 3,5	89,9 ± 4,5	n.s.	n.s.	n.s.
Crude lipid, g kg ⁻¹	105 ± 0	107 ± 14	106 ± 5	108 ± 3	110 ± 2	112 ± 6	101 ± 4	n.s.	n.s.	n.s.
Chol, mg kg ⁻¹	344 ± 97	361 ± 71	340 ± 26	414 ± 43	368 ± 87	374 ± 24	326 ± 6	n.s.	n.s.	n.s.
Asta, mg kg ⁻¹	1,35 ± 0,07 ^{ab}	1,80 ± 0,26 ^a	1,27 ± 0,06 ^b	1,50 ± 0,17 ^{ab}	1,50 ± 0,10 ^{ab}	1,67 ± 0,06 ^{ab}	1,40 ± 0,17 ^{ab}	n.s.	p=0,01	n.s. (p=0,18)

Ved slutten av forsøket ble lignende resultater observert for fettsyresammensetningen i fileten (Tabell 36). De fleste fettsyrer i fileten ble sterkt påvirket av høyt/lavt SFA, men de fleste forskjellene reflekterte diettkomposisjonen. Total SFA i fileten var igjen høyere enn i fôrene for lav-SFA-gruppene, og lavere enn i fôrene for høy-SFA-gruppene. DHA var høyere i høy-SFA-gruppene, uten en klar forklaring i diett-nivåene.

Tabell 36 Fettsyresammensetning i muskel, næringsinnhold og kolesterol ved slutten av forsøket (juni). Data er presentert som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik (SD). For fettsyrer, protein og tørrstoff er prøver fra 5 individuelle fisk per kar analysert, mens prøver fra 10 individuelle fisk per kar ble analysert for kolesterol, og 20 individuelle fisk per kar ble analysert for fett. De statistiske resultatene er basert på toveis ANOVA med høy/lav SFA og høy/lav CHOL som kategoriske faktorer. Tabell fra Sissener et al., 2025.

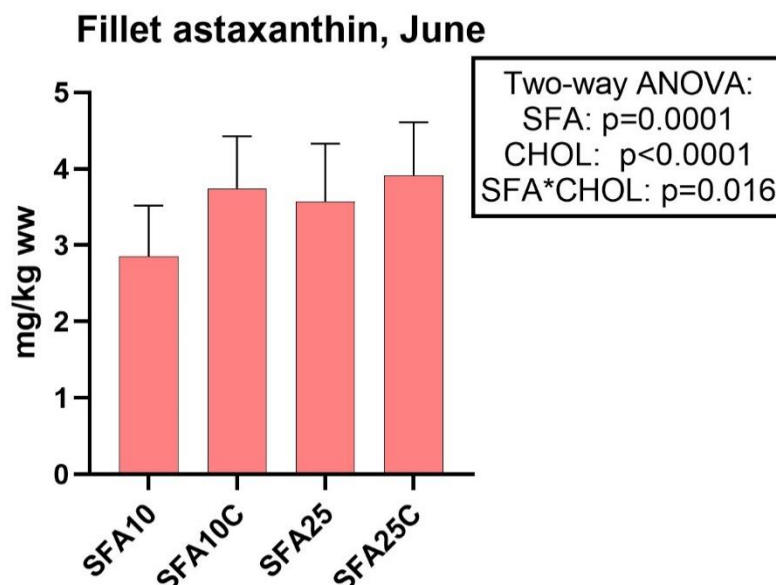
	SFA10	SFA10C	SFA25	SFA25C	ANOVA-SFA	ANOVA-chol	Inter-action
16:0	7,9 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,4	p<0,0001	p=0,001	p<0,0001
18:0	2,5 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,2	p<0,0001	n.s.	n.s.
Sum SFA	11,4 $\pm$ 0,3	11,2 $\pm$ 0,2	21,8 $\pm$ 0,3	22,6 $\pm$ 0,4	p<0,0001	p=0,003	p<0,0001
18:1n-9	42,0 $\pm$ 0,4	42,1 $\pm$ 0,2	38,5 $\pm$ 0,4	38,0 $\pm$ 0,4	p<0,0001	n.s.	p=0,01
Sum MUFA	50,5 $\pm$ 0,5	50,5 $\pm$ 0,4	45,3 $\pm$ 0,4	44,8 $\pm$ 0,4	p<0,0001	n.s.	n.s.
18:2n-6	16,1 $\pm$ 0,2	16,4 $\pm$ 0,2	13,7 $\pm$ 0,1	13,5 $\pm$ 0,2	p<0,0001	n.s.	p=0,0002
20:4n-6	1,2 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,0	p<0,0001	p=0,03	n.s.
Sum n-6	19,4 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,1	16,6 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 0,2	p<0,0001	n.s.	p=0,0004
18:3n-3	8,9 $\pm$ 0,2	9,1 $\pm$ 0,2	5,8 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,2	p<0,0001	n.s.	p=0,03
20:5n-3 (EPA)	1,5 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	p=0,001	n.s.	p=0,02
22:6n-3 (DHA)	5,8 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,2	6,2 $\pm$ 0,2	p<0,0001	n.s.	n.s.
EPA+DHA	7,3 $\pm$ 0,4	7,3 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,2	7,8 $\pm$ 0,2	p<0,0001	n.s.	n.s.
Sum n-3	17,8 $\pm$ 0,5	17,9 $\pm$ 0,4	15,3 $\pm$ 0,3	15,1 $\pm$ 0,3	p<0,0001	n.s.	n.s.
n-6/n-3	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 0,3	n.s.	n.s.	n.s.
Total FA, g kg ⁻¹	154,2 $\pm$ 33,3	145,0 $\pm$ 19,3	150,5 $\pm$ 23,6	154,5 $\pm$ 18,2	n.s.	n.s.	n.s.
Protein, g kg ⁻¹	200 $\pm$ 12	203 $\pm$ 5	209 $\pm$ 6	199 $\pm$ 7	n.s.	n.s.	p=0,02
Lipid, g kg ⁻¹	157 $\pm$ 29	154 $\pm$ 18	159 $\pm$ 21	157 $\pm$ 20	n.s.	n.s.	n.s.
Dry matter, g kg ⁻¹	369 $\pm$ 25	365 $\pm$ 12	374 $\pm$ 17	373 $\pm$ 18	n.s.	n.s.	n.s.
Chol, mg kg ⁻¹	456 $\pm$ 205	437 $\pm$ 161	440 $\pm$ 99	431 $\pm$ 132	n.s.	n.s.	n.s.

Kolesterolkonsentrasjonen i filet økte fra desember til juni, men det var fortsatt ingen signifikante forskjeller mellom diettgruppene (Tabell 35). Den mye høyere variasjonen i kolesterolnivåer i juni sammenlignet med desember skyldes sannsynligvis at individuelle prøver ble analysert i stedet for samleprøver.

Filéproteinkonsentrasjonen ble ikke påvirket av SFA eller CHOL individuelt, men det var en signifikant interaksjonseffekt, der høyeste proteinnivåer ble sett i fisk fôret med lavt SFA med tilsatt CHOL og høyt SFA uten tilsatt CHOL.

Filetfarge

Astaxantininnholdet i fileten ble påvirket av fôrets CHOL-nivå i desember (Tabell 35) og av både SFA og CHOL i interaksjon i juni (Figur 63). Toveis ANOVA viste en sterkere hovedeffekt av CHOL sammenlignet med SFA, men disse resultatene må tolkes med forsiktighet når interaksjonseffekten også er signifikant, da hovedeffektene da ikke er uavhengige. Faktisk viste en toveis ANOVA etterfulgt av en post-hoc sammenligning at kun SFA10-gruppen hadde signifikant lavere astaxantininnhold enn alle andre grupper, noe som indikerer at både CHOL og SFA må være lave samtidig for å forårsake denne effekten.



Figur 63 Astaxantin i filet i juni. Data er basert på 20 individuelle fisk per kar (40 per dietgruppe) og presenteres som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik (SD). De statistiske resultatene er hentet fra toveis ANOVA med høy/lav SFA og høy/lav CHOL som kategoriske faktorer. De fire diettgruppene er SFA10; som inneholder 10 % mettet fett (SFA) som andel av totale fettsyrer, SFA10C; 10 % SFA med tilsatt kolesterol (CHOL), SFA25; 25 % SFA og SFA25C; 25 % SFA med tilsatt CHOL. Figur fra Sissener et al., 2025.

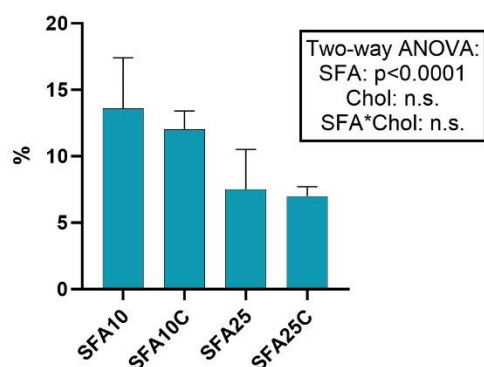
Det ble forsøkt å inkludere fiskestørrelse og fettinnhold i filet i den statistiske modellen for å se om disse faktorene kunne forklare noen av forskjellene, men ingen av dem hadde signifikant påvirkning. Astaxantindataene ble ytterligere støttet av resultater fra både Digital SalmoFan™ og A-verdien målt med Minolta. Digital SalmoFan™ viste svært signifikante effekter av både SFA, CHOL og en interaksjonseffekt. Både lavt SFA og lavt CHOL reduserte skåren, med den sterkeste effekten observert når begge faktorene var lave samtidig.

Minolta ble brukt til å måle L^{*}-, a^{*}- og b^{*}-verdiene (indikatorer for lyshet, rødhet og gulhet) på seks ulike seksjoner av fileten. Resultatene fra seksjon D, som tilsvarer NQC, lyshet (L-verdi) var ikke signifikant forskjellig mellom gruppene, mens rødhet (a^{*}-verdi) og gulhet (b^{*}-verdi) økte med økende diett-SFA og CHOL. Resultatene fra de andre fem seksjonene var lignende (ikke vist i detalj), men de fleste seksjonene (B, C, E, F) viste en signifikant effekt av SFA og en signifikant interaksjons-effekt for L-verdien, hvor SFA10-dietgruppen skilte seg ut med de høyeste verdiene. Samlet sett var filetene fra SFA10-gruppen lysere i fargen, med mindre rødhet og gulhet, mens filetene fra SFA25C-gruppen var i motsatt ende av spekteret. SFA10C- og SFA25-gruppene var relativt like hverandre og mer lik SFA25C-gruppen enn SFA10-gruppen, som skilte seg mest ut fra de andre.

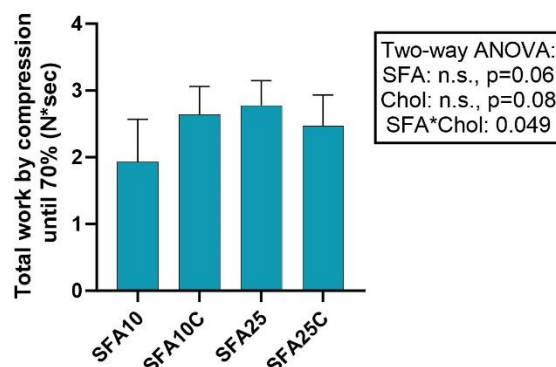
Filetkvalitet

Væsketap etter frysing og tining ble signifikant påvirket av SFA, med høyere væsketap i filetene fra gruppene med lavt SFA (Figur 64), mens CHOL ikke hadde noen effekt. Filetens fasthet, målt som kraften som kreves for å bryte overflaten av fileten, viste en signifikant interaksjonseffekt mellom diettens SFA- og CHOL-innhold. Begge faktorene måtte være lave (SFA10-dietten) for at fileten skulle bli merkbart mykere (Figur 64).

Liquid loss after freezing and thawing



Muscle firmness, distal measurement



Figur 64 Væsketap og fasthet av filet. Data er presentert som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik (SD). De statistiske resultatene er hentet fra toveis ANOVA med høy/lav SFA og høy/lav CHOL som kategoriske faktorer. De fire diettgruppene er SFA10; som inneholder 10 % mettet fett (SFA) som andel av totale fettsyrer, SFA10C; 10 % SFA med tilsatt kolesterol (CHOL), SFA25; 25 % SFA og SFA25C; 25 % SFA med tilsatt CHOL. Figur fra Sissener et al., 2025.

Hovedfunn fra A2.1 tidsserie

Hovedfunnene fra tidsserien var at andel mettede fettsyrer i fôret ikke påvirket analyserte markører relatert til transport av triacylglycerol (TAG) i tarm, men økt kolesterol i fôret hadde en tendens til å øke postprandialt plasmainnhold av astaxantin. I tillegg førte økt SFA-nivå i fôret til en signifikant økning i postprandiale plasmanivåer av CHO, low-density lipoprotein (LDL) og totalt protein. Økt CHO-nivå i fôret økte også de postprandiale plasmanivåene av CHO, high-density lipoprotein (HDL) og LDL. De fullstendige resultatene finnes i vedlagte artikkel (Fang et al., 2025).

Mineraler – fordøyelighet og status i helkropp

Økt innhold av mettede fettsyrer i fôret økte signifikant helkroppsinholdet av selen og jern hos atlantisk laks. Derimot ble helkroppsstatusen for sink verken påvirket av diettens SFA- eller CHO-nivå. Tabell 37 viser mineralanalyser av fôret, og tabell 38 viser fordøyelighet og konsentrasjon av mineraler i helkropp etter 12 ukers fôring, mens fullstendige resultatene finnes i vedlagte artikkel (Fang et al., 2025).

Tabell 37 Analyserte mineraler i forsøksfôrene. Fra Fang et al. (2025).

	SFA10	SFA25	SFA10C	SFA25C
Analyzed dietary minerals (wet matter, mg kg⁻¹)				
Zn	202,1	211,9	203,5	199,1
Se	0,47	0,50	0,47	0,45
Mn	50,2	54,4	51,1	50,5
Fe	187,6	193,9	195,4	213,7
Cu	11,5	11,4	12,0	11,2
Y	65,8	66,3	68,1	65,9

Zn, Zinc; Mn, manganese; Fe, iron; Cu, copper; Se, selenium; Y, Yttrium

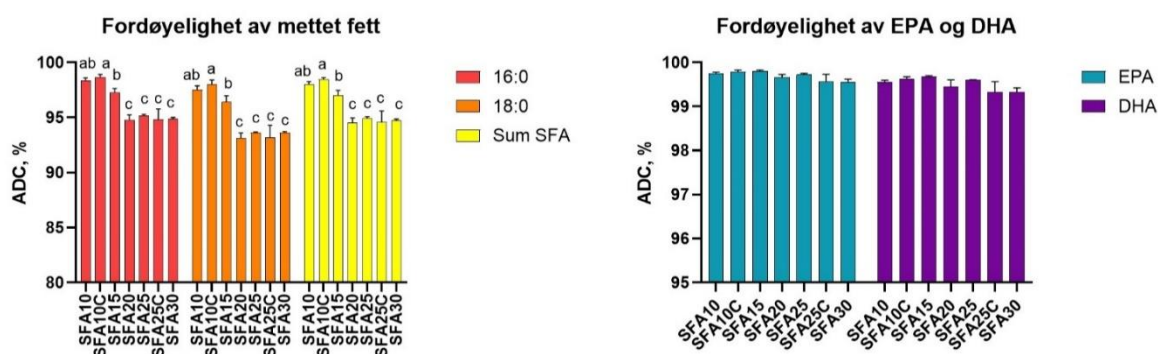
Tabell 38 Tilsynelatende fordøyelighet (apparent digestibility coefficient, ADC) av mineraler, og mineraler i helkropp etter 12 ukers fôring. Fra Fang et al. (2025).

	LSLC	HSLC	LSHC	HS HC	p value		
					S × C effect	SFA effect	CHO effect
ADC (% , After 50-days feeding)							
Zn	26,4±2,9	29,6±1,0	26,7±3,9	25,2±1,8	0,17	0,22	0,61
Se	59,3±3,2	63,7±1,7	60,8±2,6	59,0±4,1	0,11	0,39	0,46
Mn	4,3±7,8	9,2±0,3	6,4±6,3	3,0±4,2	0,22	0,53	0,82
Fe	0,0±14,1	-3,7±2,2	-4,2±6,3	6,6±1,8	0,15	0,53	0,46
Cu	11,3±4,8	9,4±4,3	13,0±4,9	7,3±3,6	0,48	0,95	0,17
Whole-body minerals (mg kg⁻¹, After 3-months feeding)							
Zn	28,3±2,6	28,8±1,0	27,2±1,7	31,8±4,6	0,27	0,18	0,61
Se	0,17±0,00	0,18±0,00	0,16±0,01	0,18±0,01	0,19	0,01	0,02
Mn	2,0±0,5	1,8±0,1	1,5±0,3	1,9±0,3	0,17	0,56	0,49
Fe	8,8±0,2	9,9±0,3	8,6±0,3	9,2±0,5	0,39	0,01	0,08
Cu	1,3±0,1	1,4±0,1	1,2±0,1	1,3±0,1	0,81	0,10	0,24

ADC (%) = (1- (selected nutrient in Feces (%) * yttrium in Feed (%)) / (selected nutrient in Feed (%) * Yttrium in Feces(%))) *100;
p values were performed by two-way ANOVA among four experimental groups; values=mean ± SD (n = 3); CHO: cholesterol;
SFA: saturated fatty acid; C × S: CHO × SFA; Zn, zinc; Mn, manganese; Fe, iron; Cu, copper; Se, selenium.

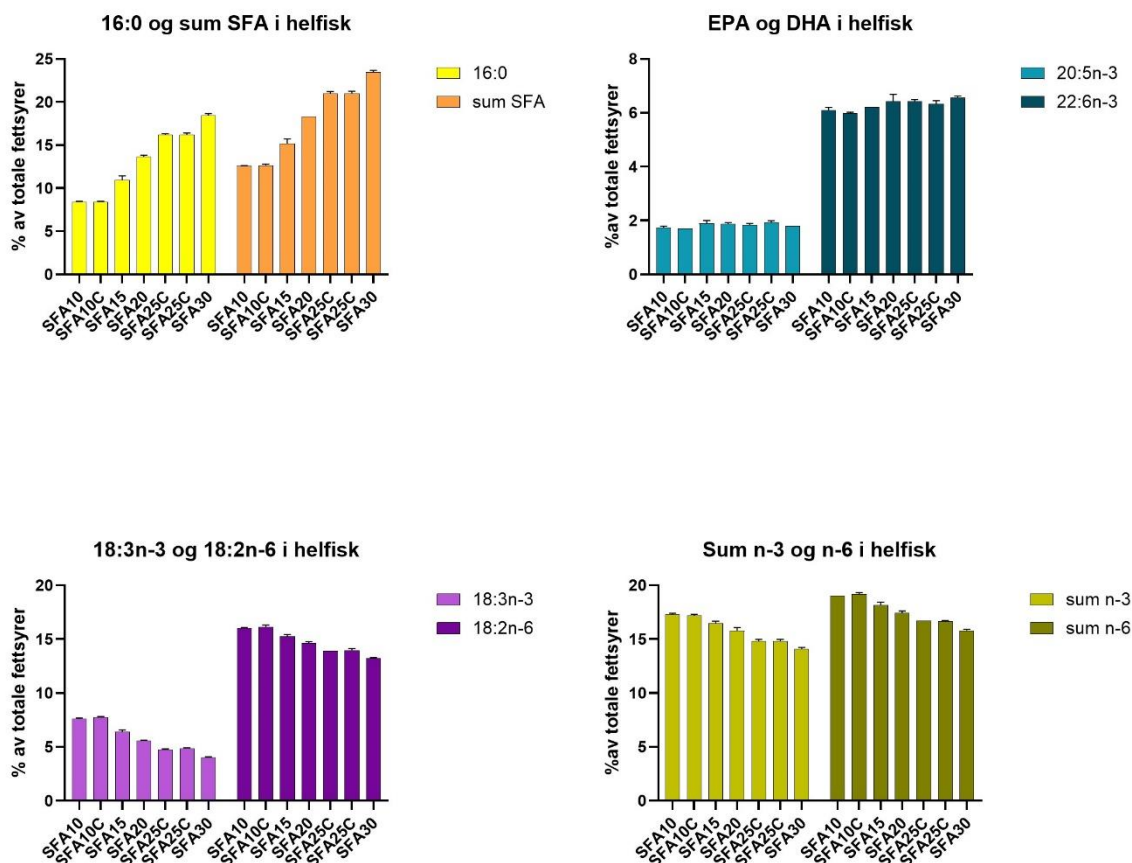
Fettsyredata

Fordøyelighet av fettsyrer er publisert i detalj Fang et al. (2025). Totalt sett var det meget god fettsyrefordøyelighet i dette forsøket, men fordøyeligheten av mettede fettsyrer hadde en tydelig gradient i forhold til SFA-innhold i fôr (Figur 65). Ulikt nivå av CHOL i fôret påvirket ikke fordøyelighet av fettsyrer.



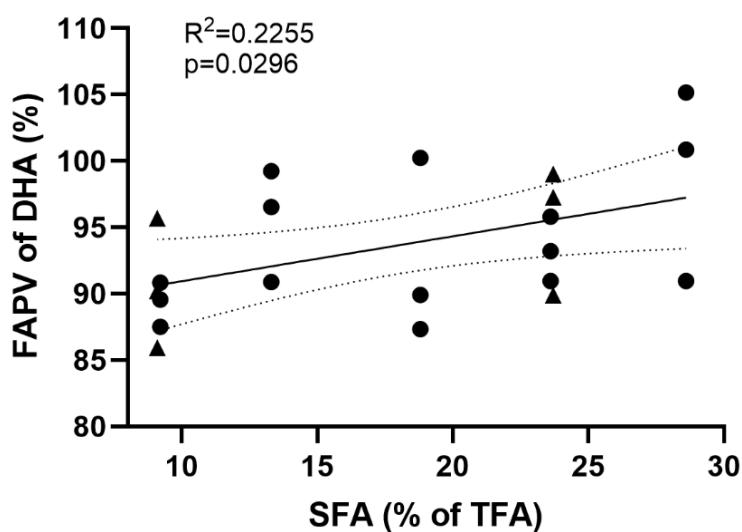
Figur 65 Fordøyelighet av mettede fettsyrer (16:0, 18:0 og sum mettede fettsyrer) og av EPA og DHA. Statistisk signifikante forskjeller er vist med ulike bokstaver.

I tillegg til fettsyreprofil i muskel (som er beskrevet sammen med andre filetanalyser i delkapittel 3.2), analyserte vi fettsyrer i helfisk (ved start, i oktober og desember) som også ble brukt til beregning av retensjon, røde blodceller (rbc, i desember og juni), polare og nøytrale lipider i lever (desember og juni), tarm (desember) og hjerte (juni). Fettsyreprofil i helfisk etter 12 ukers fôring (Figur 66), sammensvarer godt med forskjellene i fettsyreprofil i de respektive fôrene, uten noen tydelig effekt av CHOL.



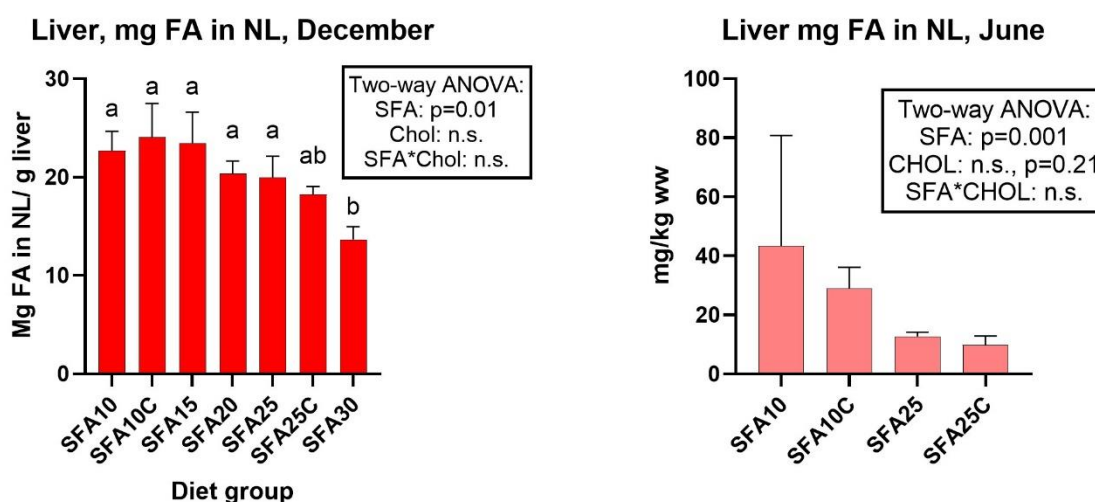
Figur 66 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i helfisk etter 12 ukers fôring (desember) med de 7 ulike forsøksfôrene

Retensjonen av DHA i fiskens helkropp i løpet av første forsøksperiode (September -Desember), økte lineært med økende innhold av SFA i fôret (Figur 67).

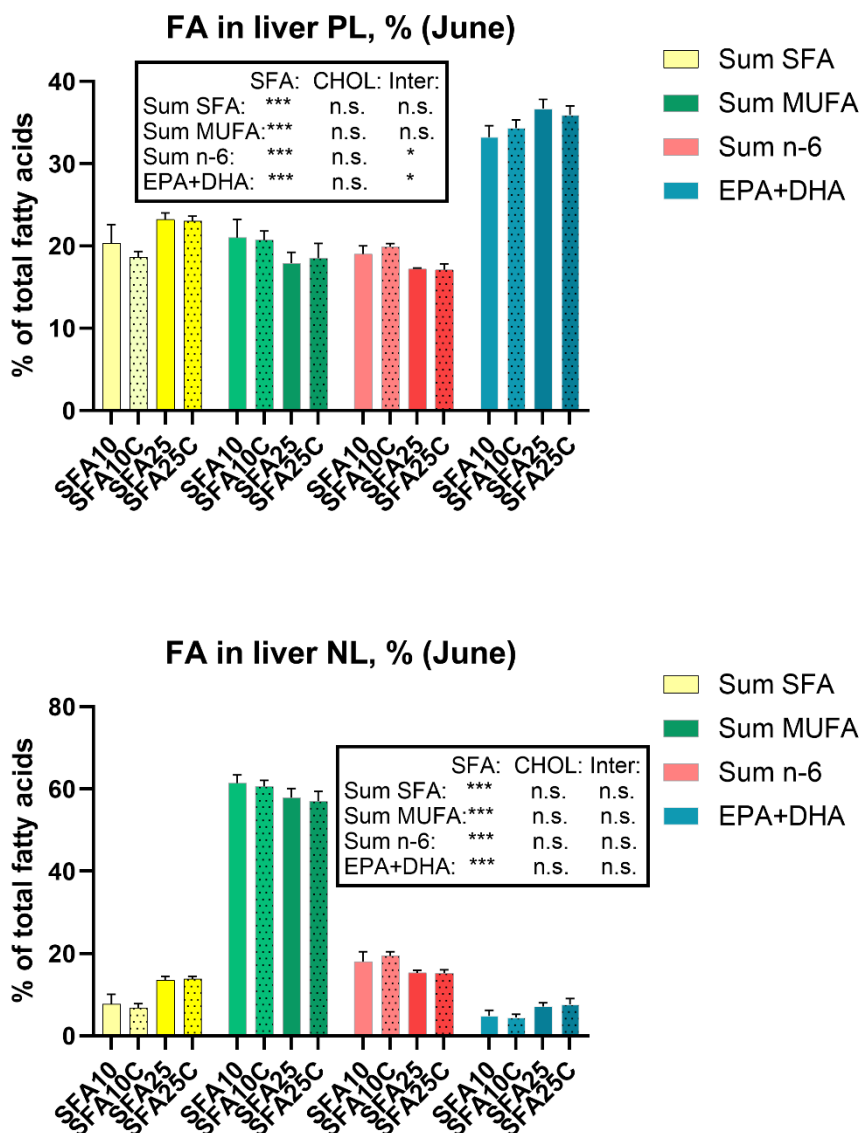


Figur 67 DHA retensjon og lineær regresjon mot fôrets nivå av SFA. Ett datapunkt per kar, runde punkter viser diettene med ulikt innhold av SFA, mens de trekantede punktene viser dietter som også er tilsatt kolesterol (kolesterol hadde ingen effekt på DHA-retensjonen).

Total mengde fettsyrer (mg/g) i nøytrale lipider i ulike vev kan ses som et mål på mengde lagringsfett eller fettakkumulering i vevene. For tarm og hjerte var det ingen forskjeller mellom diettgruppene (data ikke vist), mens for lever var det en tydelig gradient i forhold til diettinnhold av SFA på uttaket i desember, samt en tydelig forskjell mellom høy- og lav SFA gruppene i juni (Figur 68). CHOL hadde ingen tilsynelatende innvirkning på fett i lever i desember, mens i juni var det (i tillegg til en tydelig negativ effekt av lavt mettet fett) spesielt gruppen som hadde fått både lav SFA og lav CHOL som skilte seg ut med høye fettnivåer i lever.



Figur 68 Lagringsfett (mg/g fettsyrer i nøytrale lipider) i lever, i laks fôret med de 7 ulike diettene i 12 uker (desember, til venstre) og fisk gitt de fire fôrene med høy/lav CHOL og høy/lav SFA fram til juni (til høyre). Bokstaven viser resultat fra enveis ANOVA (kun utført på data fra desember), mens boksene viser resultat fra toveis ANOVA med SFA og CHOL som de to faktorene.



Figur 69 Overordnet fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i polare lipider (PL, cellemembraner, øverste figur) og nøytrale lipider (NL, lagringsfett, nederste figur) i lever hos Atlantisk laks gitt de 4 forsøksfôrene fram til ca. 2,5 kg. Diettgrupper med 10 % SFA har lysere farge på barer i figur, og 25 % SFA mørkere farge, mens diettgrupper med tilsatt kolesterol har prikkete barer. Tabellene på hver figur viser resultater fra toveis ANOVA (med de to faktorene SFA og CHOL, samt interaksjon mellom disse).

Fettsyresammensetningen i henholdsvis polare (PL) og nøytrale (NL) lipider i lever ble sterkt påvirket av fettsyresammensetningen i fôrene. Både den mettede fettsyren 16:0 og DHA har viktige strukturelle roller i cellemembraner, og er dermed sterkt selektivt inkorporert i PL. Imidlertid SFA10-gruppene 3-4 prosentpoeng lavere i total SFA i PL i lever enn SFA25-gruppene. Forskjeller i MUFA og n-6 fulgte forskjeller i fôrene, mens EPA+DHA lå signifikant høyere i SFA25 gruppene i forhold til SFA10-gruppene på tross av ca. like nivåer i alle fôr. Kolesterol i seg selv påvirket ikke fettsyresammensetningen, men for både n-6 og EPA+DHA var det en samspillseffekt mellom SFA og kolesterol. Nøytrale lipider (NL) hadde som ventet en helt annen sammensetning enn PL, dominert av enumettet fett, men også her så man de samme tydelige forskjellene mellom SFA10 og SFA25 gruppene, inkludert høyere EPA+DHA i sistnevnte.

Diskusjon: Siden SFA og CHOL ikke er essensielle næringsstoffer, har reduksjon av disse i laksefôr fått begrenset oppmerksomhet. Denne studien er unik ved å undersøke langtidsvirkninger på vekst, filet kvalitet og farge hos atlantisk laks som får svært lave nivåer av disse næringsstoffene, men likevel realistiske for fremtidige fôrformuleringer.

Samlet sett hadde lavt SFA-innhold i dietten en negativ effekt på fiskens vekst. I starten av forsøket så denne effekten ut til å være relatert til en (ikke-signifikant) reduksjon i fôrintaket hos SFA10-gruppen. Imidlertid vedvarte den negative effekten på vekst gjennom hele forsøket, selv når fôrintaket var høyere i lav-SFA-gruppene i andre fase av forsøket. Dette førte også til at lavt SFA hadde en negativ innvirkning på fôrutnyttelsen. Blant de mange fôringsforsøkene hvor fiskeolje har blitt erstattet med ulike planteoljer i fôr til atlantisk laks, har den generelle konklusjonen vært at det ikke påvirker veksten, forutsatt at diettene inneholder tilstrekkelig EPA og DHA. Mens noen studier har vist en negativ effekt av høyt SFA-innhold på vekst (Menoyo et al., 2003; Mock et al., 2021), spesielt hos fisk oppdrettet i kaldt vann (Karalazos et al., 2007), har tidligere studier ikke vist negative effekter på vekst ved å redusere SFA. Dette skyldes sannsynligvis at tidligere studier ikke har benyttet like lave nivåer av SFA over en så lang tidsperiode som vi gjorde i denne studien. I tidligere studier ble laksens vekst f.eks ikke påvirket av en rapsoljebasert diett med 11,9 % SFA over 17 uker (Bell et al., 2001) eller en linfrøoljebasert diett med 10,5 % SFA over 40 uker (Bell et al., 2004). Begge disse studiene ble gjennomført med varierende temperatur. Den nåværende studien ble imidlertid gjennomført ved en konstant temperatur på 12 °C for å unngå at forskjeller i fordøyelighet kompliserte tolkningen av resultatene. Likevel kan redusert fordøyelighet ha hatt en effekt på SFA30-gruppen, som viste en tendens til redusert vekst og økt slakteutbytte (mindre buk fett). Ved lavere temperaturer kunne resultatene ha vært mer gunstige for lav-SFA-dietter på grunn av redusert fordøyelighet av SFA ved høye nivåer i dietten (Ng et al., 2004; Sissener et al., 2017b). Derfor kan sesongtilpassede dietter med høyere SFA ved høyere vanntemperaturer være gunstige (Mock et al., 2021). Veksten ble sterkt påvirket hos yngel av regnbueørret som ble fôret med kun 1,3 % av totalfettsyrene som SFA (oleinsyre-metylester som hovedkilde til fett), men dette skyldtes sannsynligvis mangel på essensielle fettsyrer (Rinchard et al., 2007). Derfor er det nåværende resultatet av redusert ytelse hos A. laks som ble fôret med 10 % SFA over lang tid et nytt funn, men gyldigheten av dette kan avhenge av vanntemperaturen.

Økt FCR i lav-SFA-gruppene tyder på at fisken bruker energi på endogen produksjon av SFA, noe som førte til et høyere fôrintak og mindre effektiv fôrutnyttelse. Retensjonsdataene viste en betydelig økning av palmitinsyre (16:0) i helkropp hos fisk fôret med 10 % SFA sammenlignet med det som ble tilført gjennom dietten, noe som støtter hypotesen om endogen syntese. Selv om vi ikke har retensjonsdata for hele forsøksperioden, er det sannsynlig at behovet for endogen produksjon av palmitinsyre vedvarte eller økte etter hvert som vevsnivåene ble gradvis redusert. Tidligere studier har også indikert de novo produksjon av SFA i A. laks når inntaket fra fôret er lavt (Mock et al., 2021, Sissener et al., 2017b). Under optimale forhold vil produksjon av 1 g palmitinsyre (16:0) i leveren kreve 3,07 kcal (Carta et al., 2017), mens produksjon av 1 g CHOL vil kreve 2,86 kcal (Jones, 1997). Siden endogen produksjon av 16:0 både er litt mer energikrevende og betydelig mer må produseres i absolutte nivåer, gir det mening at lav SFA har størst innvirkning på fiskens vekst i det nåværende forsøket.

Når det gjelder CHOL, var den negative effekten på fiskens ytelse mindre tydelig enn for SFA og var hovedsakelig knyttet til en interaksjonseffekt med lavt SFA. Mengden CHOL i lav-CHOL fôrene var kanskje ikke lav nok til å forårsake signifikante effekter ved de fleste prøvetidspunktene. Potensielt var CHOL-nivåene på grensen av hva laksen kunne håndtere, derav bare trender på vekst og FCR. Hos pattedyr fremmes de novo syntese av CHOL av SFA i kostholdet (Gu og Yin, 2020; Lin et al., 1992), noe som kan forklare hvorfor negative effekter av lavt kosthold CHOL på ytelse først sees som interaksjons-effekter med lavt kosthold SFA. Ingen effekter av fôr på CHOL-nivåer i muskel indikerer at endogen syntese var tilstrekkelig til å opprettholde vevsnivåer.

Når det gjelder tidligere studier på tilsatt CHOL og fiskeytelse, kan den positive effekten sett i noen studier tilskrives den hypokolesterolemiske effekten av antinæringsstoffer til stede i planteпротеinkilder som ikke er tilstrekkelig raffinerte (Deng et al., 2014). Imidlertid, hos juvenile piggvar som ble matet avfettet fiskemel som hovedproteinkilde, var endogen kolesterolsyntese ikke tilstrekkelig for optimal vekst, som ble forbedret ved å tilsette kolesterol til dietten (Zhu et al., 2014). Flere av studiene som er utført på laks er gjort med høyere CHOL enn nåværende norske kommersielle fôr i basalformuleringen og rapporterte ingen effekter på ytelse av CHOL-tilsetning utover dette (Bjerkeng et al., 1999; Ignatz et al., 2022; Kortner et al., 2014). Av studier utført med lavere nivåer, påvirket ikke CHOL som varierte fra 867–3153 mg kg⁻¹ fôr (Sissener et al., 2017a) eller 700 til 4450 mg kg⁻¹ fôr (Krogdahl et al., 2020) veksten hos laks. Imidlertid har kosthold CHOL-nivåer lavere enn dette, som kan oppstå når andre ingredienser enn FM og FO brukes til å dekke n-3 LC-PUFA-behov, ikke blitt testet i laks. Positiv effekt av tilsatt CHOL ble sett på vekst i regnbueørret, når nivåene var <100 mg/kg vs ~1200 mg/kg fôr (Hong et al., 2024), noe som støtter at lavere nivåer enn brukt i det nåværende forsøket kunne gi tydeligere negativ effekt på fiskeytelse.

Fettsyreprofilen i fileten ble tydelig påvirket av diettene, med en markant forskjell i SFA-innhold mellom gruppene med høy og lav SFA. Totalt SFA i fileten i lav-SFA-gruppene avtok gjennom forsøket, fra ~12,6 % i desember til ~11,3 % i juni. Tidligere studier har rapportert høyere SFA-nivåer i fileten enn det som ble funnet i denne studien, noe som kan skyldes en kombinasjon av studiens varighet og fiskens størrelse ved slutten av forsøket.

DHA-innholdet i fileten var signifikant lavere i lav-SFA-gruppene (~5,8 % av totale fettsyrer) enn i høy-SFA-gruppene (~6,2–6,3 %). Selv om forskjellene i diettene også gikk i samme retning, var de ikke store nok til å forklare forskjellen alene. En "omega-3 spareeffekt" av SFA har blitt foreslått i andre fiskearter (Turchini et al., 2011) og laks (Codabaccus et al., 2012), og en datasyntesestudie som brukte data fra laksefisk gitt ulike lipidkilder fant at DHA i muskel var positivt korrelert med SFA i fôr (Colombo et al., 2018). Den foreslåtte mekanismen er relatert til bruk av SFA for oksidasjon, som sparer n-3 FA fra denne skjebnen (Codabaccus et al., 2012; Turchini et al., 2011), men kan også være relatert til redusert fordøyelighet av SFA i fôr med mye SFA, noe som fører til at en høyere andel av FA som tas opp vil være n-3. Når man tar i betraktning at fôrintaket var høyere i gruppene med lav SFA, noe som betyr at det totale inntaket av DHA også ville vært høyere, ser våre data ut til å støtte en positiv effekt av kosthold SFA på DHA-avsetning i laks. Dette støttes også av den positive lineære regresjonen vi så for SFA i fôr mot DHA retensjon i helfisk i den første perioden av forsøket.

Forskjellen i SFA-innhold i fileten er trolig hovedårsaken til forskjellene i væsketap etter frysing og tining, grunnet forskjeller i smeltepunkt. Tidligere studier har vist at høyere SFA-nivåer er assosiert med lavere væsketap (Lutfi et al., 2023; Rørå et al., 2003). I kontrast til væsketap, som kun ble påvirket av SFA, var fileten fasthet redusert i kombinasjonen av lavt SFA og lavt CHOL, noe som indikerer at CHOL-tilskudd bør vurderes i dietter med <500 mg/kg CHOL.

Filetfargen var tydelig påvirket av både lavt SFA og lavt CHOL, spesielt når begge var lave samtidig. Selv om astaxantin- og SalmoFan-skår begge viste signifikante interaksjonseffekter, viste Minolta-målinger svært signifikante effekter av både SFA og CHOL, noe som tyder på at begge faktorene er viktige for pigmenteringen. Som en hydrofob forbindelse kan absorpsjon av astaxantin i tarmen påvirkes av andre lipidmolekyler. Flere studier har vist at fiskeoljebaserte dietter gir høyere filetpigmentering sammenlignet med planteoljebaserte dietter (Regost et al., 2004; Rørå et al., 2005; Sissener et al., 2016), men de eksakte lipidkomponentene som forårsaker denne effekten er ikke fullt ut identifisert. Tidligere studier har vist at CHOL kan ha en positiv effekt på astaxantinabsorpsjon (Chimsung et al., 2014; Jin et al., 2024), noe som stemmer med funnene i denne studien.

Akkumuleringer av lipider i både tarmen og leveren har blitt observert hos laksefisk som har fått høye nivåer av oljer som rapsolje, linolje eller soyabønneolje, men ikke palmeolje eller fjørfeolje, som begge inneholder høyere nivåer av mettet fett (Bell et al., 2001, Bell et al., 2002, Olsen et al., 2003, Menoyo et al., 2005, Ruyter et al., 2006). Dette samsvarer med data fra dette forsøket, som gir en tydelig korrelasjon mellom lavt SFA i fôr og økt fettlagring i lever. Imidlertid må man alltid ha i bakhodet at det ikke er mulig å endre kun en klasse av fettsyrer i fôret, slik at økende SFA samtidig betydde at MUFA, total n-6 og total n-3 (ikke EPA og DHA som var konstante) gikk i motsatt retning. Fett i hele kroppen har vært uendret eller endret i mye mindre grad enn i leveren (Xu et al., 2020), noe som kan indikere problemer i lipidtransporten. Transport av lipider i fiskekroppen skjer i lipoproteiner, hvor hovedkomponenten på den ytre overflaten er fosfatidylkolin (PC), bestående av en kolinhodegruppe og to fettsyrer, vanligvis med den mettede fettsyren 16:0 i sn-1 posisjon (Sargent et al., 2002). Vi har tidligere vist at PC er essensielt i sebrafisklarver for å bygge lipoproteiner (Sæle et al., 2018), og det har nylig blitt vist at tilsetning av kolin i et plantebasert kosthold er essensielt for transport av lipider ut av tarmepitelet i laks (Hansen et al., 2020). Imidlertid har et eventuelt behov for SFA i denne sammenhengen ikke blitt undersøkt.

5.6.4 Hovedfunn mettet fett og kolesterol A2.1-3

Samlet sett viser denne studien at 10 % SFA av totale fettsyrer er utilstrekkelig for optimal vekst og filetkvalitet hos atlantisk laks ved 12 °C, sammenlignet med 24 % SFA. Basert på første fase av forsøket, hvor fem nivåer av SFA ble testet, bør minimum 15 % SFA anbefales for å unngå negativ innvirkning på vekst, men vi mangler data for å gi en minimumsanbefaling for filetkvalitet.

Dataene viser endogen produksjon av både SFA (16:0) og CHOL ved lave fôrkonsentrasjoner, noe som kan forklare effektene på fiskens ytelse. I tillegg indikerer dataene at tilsats av CHOL i noen grad kan kompensere for lavt SFA. Lavt SFA forårsaker høyt væsketap i fileten etter frysing og tining, mens lavt SFA og lavt CHOL i kombinasjon reduserer filetenes fasthet og farge. Dette indikerer at CHOL bør tilsettes til basisdietter som har <500 mg/kg CHOL.

5.6.5 Referanser AP 2

- Alfnes, F., Guttormsen, A.G., Steine, G., Kolstad, K., 2006. Consumers' Willingness to Pay for the Color of Salmon: A Choice Experiment with Real Economic Incentives. *American Journal of Agricultural Economics* 88(4), 1050-1061. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1467-8276.2006.00915.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-8276.2006.00915.x)
- AOAC, 1995. AOAC Official Methods of Analysis, Method 992.15: Crude Protein in Meat and Meat Products, Combustion Method, 16th edn., Arlington, VA, USA.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., McGhee, F., Dick, J.R., Porter, A., Smullen, R.P., Sargent, J.R., 2002. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *J Nutr* 132, 220-230.
- Bell, J.G., Henderson, R.J., Tocher, D.R., Sargent, J.R., 2004. Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: Modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. *Lipids* 39(3), 223-232. <https://doi.org/10.1007/s11745-004-1223-5>
- Bell, J.G., McEvoy, J., Tocher, D.R., McGhee, F., Campbell, P.J., Sargent, J.R., 2001. Replacement of fish oil with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J Nutr* 131(5), 1535-1543.
- Betancor, M.B., Sprague, M., Usher, S., Sayanova, O., Campbell, P.J., Napier, J.A., Tocher, D.R., 2015. A nutritionally-enhanced oil from transgenic *Camelina sativa* effectively replaces fish oil as a source of eicosapentaenoic acid for fish. *Scientific Reports* 5, 8104. <https://doi.org/10.1038/srep08104>
- <http://www.nature.com/articles/srep08104#supplementary-information>

- Bjerkeng, Storebakken, Wathne, 1999. Cholesterol and short-chain fatty acids in diets for Atlantic salmon *Salmo salar* (L.): effects on growth, organ indices, macronutrient digestibility, and fatty acid composition. *Aquaculture Nutrition* 5(3), 181-191. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1999.00103.x>
- Bou, M., Todorčević, M., Torgersen, J., Škugor, S., Navarro, I., Ruyter, B., 2016. De novo lipogenesis in Atlantic salmon adipocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1860(1, Part A), 86-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.022>
- Carta, G., Murru, E., Banni, S., Manca, C., 2017. Palmitic Acid: Physiological Role, Metabolism and Nutritional Implications. *Frontiers in Physiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00902>
- Chan, S.S., Roth, B., Jessen, F., Jakobsen, A.N., Lerfall, J., 2022. Water holding properties of Atlantic salmon. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 21(1), 477-498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12871>
- Chimsung, N., Tantikitti, C., Milley, J.E., Verlhac-Trichet, V., Lall, S.P., 2014. Effects of various dietary factors on astaxanthin absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Research* 45(10), 1611-1620. <https://doi.org/10.1111/are.12108>
- Codabaccus, B.M., Carter, C.G., Bridle, A.R., Nichols, P.D., 2012. The “n–3 LC-PUFA sparing effect” of modified dietary n–3 LC-PUFA content and DHA to EPA ratio in Atlantic salmon smolt. *Aquaculture* 356-357, 135-140. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.024>
- Colombo, S.M., Parrish, C.C., Wijekoon, M.P.A., 2018. Optimizing long chain-polyunsaturated fatty acid synthesis in salmonids by balancing dietary inputs. *PLOS ONE* 13(10), e0205347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205347>
- Courtot, E., Musson, D., Stratford, C., Blyth, D., Bourne, N.A., Rombenso, A.N., Simon, C.J., Wu, X., M. Wade, N., 2022. Dietary fatty acid composition affects the apparent digestibility of algal carotenoids in diets for Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Research* 53(6), 2343-2353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/are.15753>
- Deng, J., Zhang, X., Long, X., Tao, L., Wang, Z., Niu, G., Kang, B., 2014. Effects of dietary cholesterol supplementation on growth and cholesterol metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with cottonseed meal or rapeseed meal. *Fish Physiology and Biochemistry* 40(6), 1827-1838. <https://doi.org/10.1007/s10695-014-9971-2>
- Fang, H., Sissener, N.H., Prabhu Philip, A.J., Rosenlund, G., Stubhaug, I., Sæle, Ø., 2025. Interaction between dietary saturated fatty acids and cholesterol on mineral and fatty acid availability and postprandial lipids absorption kinetics in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 742250. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2025.742250>
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226.
- Glencross, B.D., Bachis, E., Betancor, M.B., Calder, P., Liland, N., Newton, R., Ruyter, B., 2024. Omega-3 Futures in Aquaculture: Exploring the Supply and Demands for Long-Chain Omega-3 Essential Fatty Acids by Aquaculture Species. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 1-50. <https://doi.org/10.1080/23308249.2024.2388563>
- Goto, S., Kogure, K., Abe, K., Kimata, Y., Kitahama, K., Yamashita, E., Terada, H., 2001. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1512(2), 251-258. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(01\)00326-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2736(01)00326-1)
- Grahl-Nielsen, O., Barnung, T., 1985. Variations in the fatty acid profile of marine animals caused by environmental and developmental changes. *Marine Environmental Research* 17(2), 218-221. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90090-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90090-X)
- Gu, Y., Yin, J., 2020. Saturated fatty acids promote cholesterol biosynthesis: Effects and mechanisms. *Obesity Medicine* 18, 100201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.obmed.2020.100201>

- Hatlen, B., Larsson, T., Østbye, T.-K., Romarheim, O.H., Rubio, L.M., Ruyter, B., 2022. Improved fillet quality in harvest-size Atlantic salmon fed high n-3 canola oil as a DHA-source. *Aquaculture* 560, 738555. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738555>
- Hong, J., Bledsoe, J.W., Overturf, K.E., Hardy, R.W., Small, B.C., 2024. Balancing dietary plant-based lipids and cholesterol to increase fillet omega-3 deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed a diet without animal ingredients. *Aquaculture* 578, 740029. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740029>
- Ignatz, E.H., Sandrelli, R.M., Tibbetts, S.M., Colombo, S.M., Zanuzzo, F.S., Loveless, A.M., Parrish, C.C., Rise, M.L., Gamperl, A.K., 2022. Influence of Supplemental Dietary Cholesterol on Growth Performance, Indices of Stress, Fillet Pigmentation, and Upper Thermal Tolerance of Female Triploid Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition* 2022(1), 6336060. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2022/6336060>
- Jin, Y., Li, K., Vik, J.O., Hillestad, M., Olsen, R.E., 2024. Effect of Dietary Cholesterol, Phytosterol, and Docosahexaenoic Acid on Astaxanthin Absorption and Retention in Rainbow Trout. *Aquaculture Nutrition* 2024(1), 8265746. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2024/8265746>
- Jobling, M., 2004. Are modifications in tissue fatty acid profiles following a change in diet the result of dilution?: Test of a simple dilution model. *Aquaculture* 232(1), 551-562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.07.001>
- Jones, P.J., 1997. Regulation of cholesterol biosynthesis by diet in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66(2), 438-446. <https://doi.org/10.1093/ajcn/66.2.438>
- Jyonouchi, H., Hill, R.J., Tomita, Y., Good, R.A., 1991. Studies of immunomodulating actions of carotenoids. I. Effects of β -carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in in vitro culture system. *Nutrition and Cancer* 16(2), 93-105. <https://doi.org/10.1080/01635589109514148>
- Karalazos, V., Bendiksen, E.Å., Dick, J.R., Bell, J.G., 2007. Effects of dietary protein, and fat level and rapeseed oil on growth and tissue fatty acid composition and metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared at low water temperatures. *Aquaculture Nutrition* 13(4), 256-265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00471.x>
- Kortner, T.M., Björkhem, I., Krasnov, A., Timmerhaus, G., Krogdahl, Å., 2014. Dietary cholesterol supplementation to a plant-based diet suppresses the complete pathway of cholesterol synthesis and induces bile acid production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition* 111(12), 2089-2103. <https://doi.org/doi:10.1017/S0007114514000373>
- Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R.K., Sweetman, J., 2016. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 451, 47-57. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.027>
- Krogdahl, Å., Hansen, A.K.G., Kortner, T.M., Björkhem, I., Krasnov, A., Berge, G.M., Denstadli, V., 2020. Choline and phosphatidylcholine, but not methionine, cysteine, taurine and taurocholate, eliminate excessive gut mucosal lipid accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 528, 735552. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735552>
- Leaver, M.J., Villeneuve, L.A.N., Obach, L., Jensen, L., Bron, J.E., Tocher, D.R., Taggart, J.B., 2008. Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetable oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9(299).
- Leyton, T.P., Marín, S., Castillo, S., Sánchez, R., Collipal, R., Madrid, J., Farías, A., 2024. Long-term substitution of fish oil with alternative sources in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Performance, health, and consumer appeal. *Aquaculture* 590, 741073. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.741073>
- Lie, Ø., Lambertsen, G., 1991. Fatty-acid composition of glycerophospholipids in 7 tissues of cod (*Gadus morhua*), determined by combined high-performance liquid-chromatography and gas-chromatography. *J Chromatogr Biomed appl* 565, 119-129.

- Lin, E.C.K., Fernandez, M.L., McNamara, D.J., 1992. Dietary Fat Type and Cholesterol Quantity Interact to Affect Cholesterol Metabolism in Guinea Pigs. *The Journal of Nutrition* 122(10), 2019-2029. <https://doi.org/10.1093/jn/122.10.2019> %J The Journal of Nutrition
- Lutfi, E., Berge, G.M., Bæverfjord, G., Sigholt, T., Bou, M., Larsson, T., Mørkøre, T., Evensen, Ø., Sissener, N.H., Rosenlund, G., Sveen, L., Østbye, T.-K., Ruyter, B., 2023. Increasing dietary levels of the n-3 long-chain PUFA, EPA and DHA, improves the growth, welfare, robustness and fillet quality of Atlantic salmon in sea cages. *British Journal of Nutrition* (129.1), 10-28. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000642>
- Laakso, P., 2005. Analysis of sterols from various food matrices. *Eur J Lipid Sci Technol* 107, 402-410.
- Menoyo, D., Lopez-Bote, C.J., Bautista, J.M., Obach, A., 2003. Growth, digestibility and fatty acid utilization in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. *Aquaculture* 225(1), 295-307. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00297-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00297-7)
- Mock, T.S., Francis, D.S., Jago, M.K., Miles, P.C., Glencross, B.D., Smullen, R.P., Keast, R.S.J., Turchini, G.M., 2021. Seasonal effects on growth and product quality in Atlantic salmon fed diets containing terrestrial oils as assessed by a long-term, on-farm growth trial. *Aquaculture Nutrition* 27(2), 477-490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/anu.13200>
- Ng, W.-K., Sigholt, T., Gordon Bell, J., 2004. The influence of environmental temperature on the apparent nutrient and fatty acid digestibility in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed finishing diets containing different blends of fish oil, rapeseed oil and palm oil. *Aquaculture Research* 35(13), 1228-1237. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01131.x>
- NMKL, 2014. Fat determination in fish, fish feed and fish meal by low field nuclear magnetic resonance (LF-NMR). 199.
- Ohgami, K., Shiratori, K., Kotake, S., Nishida, T., Mizuki, N., Yazawa, K., Ohno, S., 2003. Effects of Astaxanthin on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation In Vitro and In Vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(6), 2694-2701. <https://doi.org/10.1167/iov.02-0822>
- 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(3-4), 804-812. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.013>
- 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 Research International* 37(3), 259-271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2003.12.003>
- Rinchard, J., Czesny, S., Dabrowski, K., 2007. Influence of lipid class and fatty acid deficiency on survival, growth, and fatty acid composition in rainbow trout juveniles. *Aquaculture* 264(1), 363-371. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.024>
- Rosenlund, G., Torstensen, B.E., Stubhaug, I., Usman, N., Sissener, N.H., 2016. Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *J Nutr Sci* 5, e19, 1-13.
- Ruyter, B., Bou, M., Berge, G.M., Mørkøre, T., Sissener, N.H., Sanden, M., Lutfi, E., Romarheim, O.-H., Krasnov, A., Østbye, T.-K., 2022. A dose-response study with omega-3 rich canola oil as a novel source of docosahexaenoic acid (DHA) in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater; effects on performance, tissue fatty acid composition, and fillet quality. *Aquaculture* 561, 738733. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738733>
- Ruyter, B., Sissener, N.H., Østbye, T.-K., Simon, C.J., Krasnov, A., Bou, M., Sanden, M., Nichols, P.D., Lutfi, E., Berge, G.M., 2019. n-3 Canola oil effectively replaces fish oil as a new safe dietary source of DHA in feed for juvenile Atlantic salmon. *British Journal of Nutrition* 122(12), 1329-1345. <https://doi.org/10.1017/S0007114519002356>
- Rørå, A.M.B., Regost, C., Lampe, J., 2003. Liquid holding capacity, texture and fatty acid profile of smoked fillets of Atlantic salmon fed diets containing fish oil or soybean oil. *Food Research International* 36(3), 231-239. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00141-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00141-2)

- Rørå, A.M.B., Ruyter, B., Skorve, J., Berge, R.K., Slinning, K.-E., 2005. Influence of high content of dietary soybean oil on quality of large fresh, smoked and frozen Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International* 13(3), 217-231. <https://doi.org/10.1007/s10499-004-1074-0>
- Santigosa, E., Constant, D., Prudence, D., Wahli, T., Verlhac-Trichet, V., 2020. A novel marine algal oil containing both EPA and DHA is an effective source of omega-3 fatty acids for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of the World Aquaculture Society* 51(3), 649-665. <https://doi.org/10.1111/jwas.12699>
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids, third edition, in: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), *Fish Nutrition*. Academic Press, London, pp. 182-259.
- Sele, V., M.Silva, A. Philip, K. Hamre, K. Skjærven, M. Espe, N. Liland, K. K. Lie, M. Berntssen, Lundebye, A.-K., 2023. Program for overvåking av fiskefôr - Årsrapport for prøver innsamlet i 2022, in: n (Ed.). Havforskningsinstituttet.
- Sigholt, T., Berge, G.M., Ruyter, B., Åsgård, T., 2008. Graded levels of palm oil in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*), at three different temperatures, *International Symposium in Fish Nutrition and Feeding*, p. 1, Florianópolis, Brasil.
- Sissener, N.H., 2018. Are we what we eat? Changes to the feed fatty acid composition of farmed salmon and its effects through the food chain. *J Exp Biol* 221(Suppl 1). <https://doi.org/10.1242/jeb.161521>
- Sissener, N.H., Liland, N.S., Holen, E., Stubhaug, I., Torstensen, B.E., Rosenlund, G., 2017a. Phytosterols are not involved in the development of fatty liver in plant oil fed Atlantic salmon (*Salmo salar*) at high or low water temperature. *Aquaculture* 480, 123-124
- Sissener, N.H., Sanden, M., Torstensen, B.E., Waagbø, R., Stubhaug, I., Rosenlund, G., 2017b. High dietary 18:2n-6/18:3n-3 ratio does not inhibit elongation and desaturation of 18:3n-3 to EPA and DHA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition* 23(5), 899-909. <https://doi.org/10.1111/anu.12457>
- Sissener, N.H., Waagbø, R., Rosenlund, G., Tvenning, T., Susort, S., Lea, T.B., Oaland, Ø., Chen, L., Breck, O., 2016. Reduced n-3 long chain fatty acid levels in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) do not reduce growth, robustness or product quality through an entire full scale commercial production cycle in seawater. *Aquaculture* 464, 236-245.
- Tocher, D.R., Sprague, M., Han, L., Sayanova, O., Norambuena, F., Napier, J.A., Betancor, M.B., 2024. Inclusion of oil from transgenic *Camelina sativa* in feed effectively supplies EPA and DHA to Atlantic salmon (*Salmo salar*) grown to market size in seawater pens. *Food Chemistry* 456, 139414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139414>
- Torstensen, B.E., Froyland, L., Ornsrud, R., Lie, O., 2004. Tailoring of a cardioprotective muscle fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils. *Food Chemistry* 87(4), 567-580.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., Ørnsrud, R., Lie, Ø., 2004. Tailoring of a cardioprotective muscle fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils. *Food Chem* 87(4), 567-580.
- Torstensen, B.E., Lie, Ø., Frøyland, L., 2000. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)—effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids* 35, 653-664.
- Turchini, G.M., Francis, D.S., Senadheera, S.P.S.D., Thanuthong, T., De Silva, S.S., 2011. Fish oil replacement with different vegetable oils in Murray cod: Evidence of an “omega-3 sparing effect” by other dietary fatty acids. *Aquaculture* 315(3), 250-259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.016>
- Wang, Z., Qiao, F., Zhang, W.-B., Parisi, G., Du, Z.-Y., Zhang, M.-L., 2024. The flesh texture of teleost fish: Characteristics and interventional strategies. *Reviews in Aquaculture* 16(1), 508-535. <https://doi.org/10.1111/raq.12849>
- Waagbø, R., Berntssen, M.H.G., Danielsen, T., Helberg, H., Kleppa, A.L., Berg Lea, T., Rosenlund, G., Tvenning, L., 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. *Aquaculture Nutrition*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/anu.12010>
- Ytrestøl, T., Alvestad, R., Dessen, J.-E., Hatlen, B., Albrektsen, S., Ruyter, B., Larsson, T., 2024. Kunnskapskartlegging pigmentering i laks. Nofima, pp. 1-47.
- Ytrestøl, T., Bou, M., Dimitriou, C., Berge, G.M., Østbye, T.-K., Ruyter, B., 2023. Dietary Level of the Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA Influence the Flesh Pigmentation in Atlantic Salmon. *Aquaculture Nutrition* 2023(1), 5528942. <https://doi.org/10.1155/2023/5528942>
- Zhu, T., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Zhou, H., Liufu, Z., 2014. Feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) fed defatted fish meal diets with graded levels of cholesterol. *Aquaculture* 428-429, 290-296. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.027>
- Zhu, T., Mai, K., Xu, W., Ai, Q., 2018. Effect of dietary cholesterol and phospholipids on feed intake, growth performance and cholesterol metabolism in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture* 495, 443-451. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.002>
- Ørnsrud, R., Wargelius, A., Sæle, Ø., Pittman, K., Waagbø, R., 2004. Influence of egg vitamin A status and egg incubation temperature on subsequent development of the early vertebral column in Atlantic salmon fry. *J. Fish Biol.* 64, 399-417.
- Aas, T.S., Åsgård, T., Ytrestøl, T., 2022. Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2020. *Aquaculture Reports* 26, 101316. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101316>

5.7 AP3. Effekt av ulike diett nivåer av fett, fettsyrer og Zn på vekst, helse og filetkvalitet til A. laks i merder i sjø (Ansvarlig: Nofima i samarbeid med HI)

Medforfattere: B. Ruyter, N.H. Sissener, T. Larsson, T.K. Østbye, M. Bou, T. Sigholt, Øystein Evensen, Kristina Maria Solvang, Tore Seternes, Esmail Lutfi, H. Fang, A. Philip, Ø. Sæle og G.M. Berge

Sammensetningen av fôret til laksen er i kontinuerlig endring, bla. er fett nivået økt og nivåene av omega-3 fettsyrene EPA og DHA redusert i løpet av de siste 20 år. I tillegg er det vist at både nivåene av omega-3 fettsyrer og fett nivået kan påvirke utnyttelsen av mineraler som sink.

Formålet med dette forsøket var å øke kunnskapen om hvordan ulike fett-, omega-3 fettsyrer- og sink nivåer i fôret til laks i merder i sjø påvirker vekst, helse, fettsyreretensjon og muskelkvalitet.

Task 3.1.

Målsetting: Gjennomføre fôringsforsøk med laks i merder i sjø (fra 1,5 kg til slaktestørrelse på 5 kg) med ulike fett nivå, omega-3-nivå og sink i fôrene og registrere tilvekst og overlevelse, samt bidra med prøvemateriale til Task 3.2. og 3.3.

Task 3.2.

Målsetting: Øke kunnskapen om hvordan fett nivå og omega-3-fettsyrer og sink i fôret samspiller og påvirker velferd, helse og muskelkvalitet.

Task 3.3.

Målsetting: Øke kunnskapen om hvordan fett nivå og sink i fôret samspiller og påvirker opptak og deponering av mineraler i kroppen og betydning for laksens helse, ytelse og kvalitet.

5.7.1 Forsøksdesign

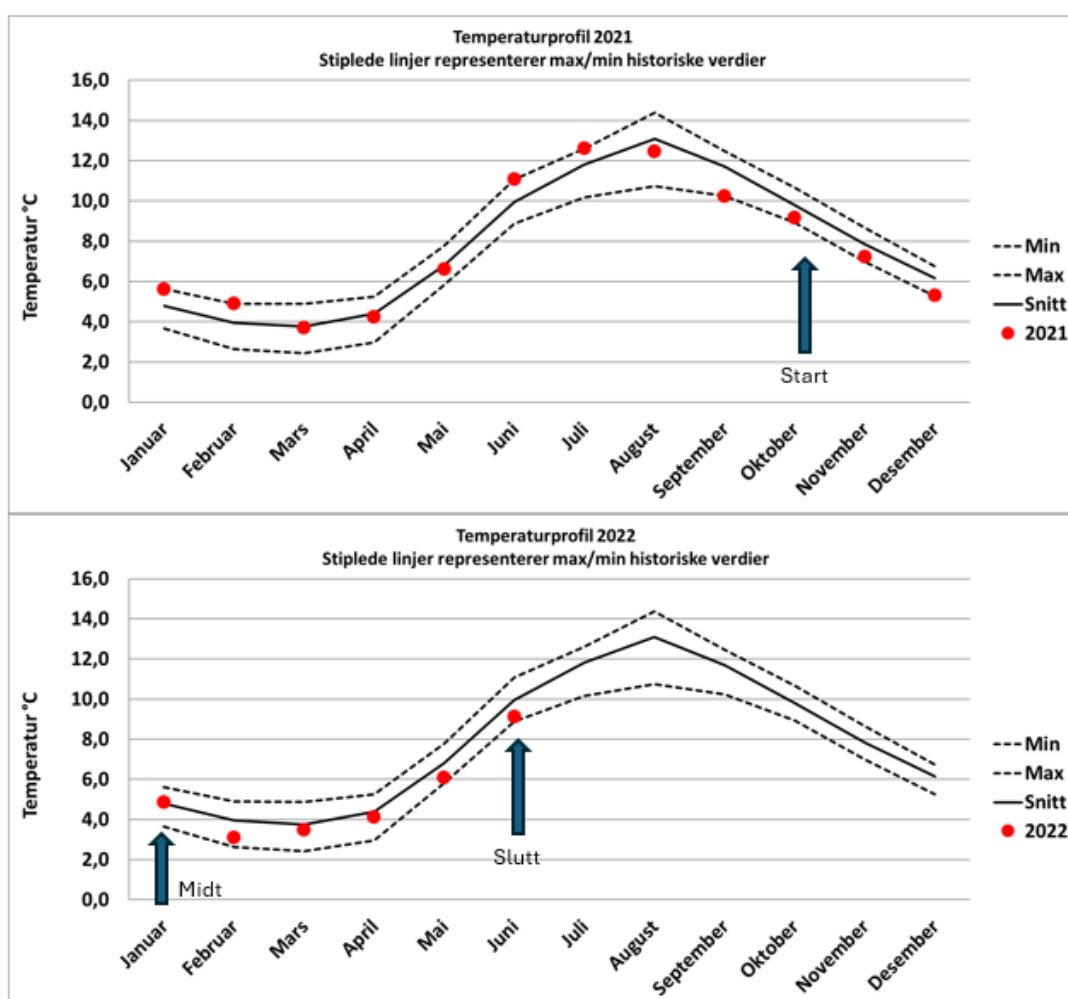
Fiskeforsøk, dietter og prøvetaking

Atlantehavslaks fra MOWI (Glomfjord, Meløy), med en gjennomsnittsvekt på 1,5 kg ble overført til Gildeskål Forskningsstasjon (GIFAS). Fram til forsøksstart ble fisken akklimatisert ved GIFAS og føret kommersielt BioMar fôr fram til en størrelse på 1,67 kg. Deretter ble forsøksfisken tilfeldig fordelt i 15 merder, 125 m³ merder (5x5x5m), med 110 fisk per merd. Fødingsforsøket ble gjennomført fra 4. oktober 2021 til 4. juni 2022 (Figur 70).



Figur 70 Oversikt over forsøk med Atlantisk laks

Figur 71 gir en oversikt over sjøvannstemperaturen gjennom hele forsøksperioden fra oktober 2021 til juni 2022. Vanntemperaturen var ca. 8 °C ved oppstart av forsøket i oktober, ca. 5 °C ved midtuttaket i januar 2022 og nådde laveste vanntemperatur i februar med ca. 3 °C. Temperaturen steg gradvis utover våren til ca. 9 °C ved sluttuttaket i juni 2022.



Figur 71 Temperatur kurver i løpet av forsøket

Laksen ble føret fem eksperimentelle dietter med ulike nivåer av fett, Zn og omega-3 fettsyrene EPA+DHA; Høyfett-HøyZn (HFHZ), Høyfett-LavZn (HFLZ), Lavfett-HøyZn (LFHZ), Lavfett-LavZn (LFLZ) og Høyfett-HøyZn-HøyOmega-3 (HFΩHZ). Laks ble føret ad-libitum en gang per dag (høst og vinter) eller to ganger per dag (vår). To forskjellige pelletstørrelser (6 og 9 mm) med økende fettnivå ble produsert. Tabell 39-Tabell 40 viser diettformulering og kjemisk sammensetning for de to batchene med fôr.

Mineralsammensetning og fettsyresammensetningen av diettene i % av totale fettsyrer og i mg/g fôr vises i Tabell 40-Tabell 44. Kommersiell fôr til norsk laks i merder i sjø inneholder vanligvis 35–39 % fett. Fettnivået i forsøksfôrene varierte fra 32–33 % i LF gruppene til 34–38 % i HF gruppene, som viser at HF fôrene inneholdt kommersielt relevante nivåer av fett, mens LF gruppen lå litt lavere på fett enn det som er vanlig kommersielt. I tillegg er maksgrensen for Zn i laksefôr satt til 180 mg Zn kg⁻¹ av EU, mens 120 mg Zn kg⁻¹ regnes som suboptimalt nivå i plantebaserte fôr til laks. I dette forsøket lå HZ gruppene på ca. 180–200 mg/Kg Zn og LF gruppene på ca. 120–130 mg/Kg i periode I og ca. 180 mg/Kg i HZ og 100 mg/Kg i LZ gruppene i periode II. Dette betyr at nivået av Zn i dietten i LZ gruppene i periode II lå litt under estimert og på et suboptimalt nivå i dietten. Fettinnholdet i føret ble justert ved å variere nivåene av fiskeolje og rapsolje. Hvetegluten, guarmeal og hvete ble brukt for å balansere fett/protein ratio. Zn-nivåene i føret ble justert ved å tilsette sink-sulfat i ulike doser.

Tabell 39 Diettformulering og kjemisk sammensetning av forsøksfôr

Ingrediens (%)	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ
Periode I (fra 1,6 kg – 2,5 kg)					
Fiskemel	8,30	8,30	8,30	8,30	8,30
Soya protein konsentrat (SPC)	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Hvetegluten	10,27	10,27	17,50	17,50	10,27
Guarmel	11,00	11,00	7,24	7,24	11,00
Hvete	13,32	13,36	12,54	12,54	12,57
Fiskeolje ¹	9,11	9,11	8,29	8,29	15,75
Rapsolje, crude	22,19	22,18	20,08	20,08	15,59
Lecithin	0,53	0,53	0,54	0,54	0,55
Mono-calcium phosphate	2,12	2,12	2,38	2,40	2,64
Zink sulphate, 36 %	0,04	0,02	0,04	0,02	0,04
Vitamin og mineral premix	0,71	0,71	0,76	0,76	0,71
Teknisk «feed additives»	0,55	0,55	0,50	0,50	0,55
Krystallinske aminosyrer	1,40	1,40	1,32	1,32	1,48
Lucantin pink CWD 10 %, BASF	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Cholesterol	0,05	0,05	0,05	0,05	/
Vann	0,38	0,37	0,41	0,41	0,51
Sum	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Analysert kjemisk sammensetning (%),					
Moisture	6,3	7,8	7,1	6,8	7,3
Protein	34,8	34,5	38,3	38,5	34,9
Fett	34,7	34,2	31,5	32,3	34,3
Aske	5,1	4,9	5,1	5,0	5,4
Periode II (fra 2,5 kg – 4,5 kg)					
Fiskemel	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00

Ingrediens (%)	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
Soya protein konsentrat (SPC)	24,41	24,46	11,75	11,45	24,60
Hvetegluten	4,58	4,54	16,00	16,00	4,43
Erte protein	/	/	6,00	6,00	/
Guarmel	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Hvete (milling quality)	11,76	11,76	12,50	12,90	11,89
Fiskeolje ²	11,22	11,22	9,48	9,48	19,76
Rapsolje, crude	24,03	24,03	20,02	20,02	15,31
Lecithin, dry	0,37	0,37	0,35	0,35	0,40
Vitamin og mineral premix	0,65	0,65	0,62	0,62	0,65
Zink sulphate, 36 %	0,04	0,02	0,04	0,02	0,04
Mono-ammonium phosphate	0,89	0,89	0,94	0,94	0,89
krystallinske aminosyrer	0,59	0,58	1,20	1,22	0,58
Teknisk «feed additives»	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63
Lucantin Pink CWD 10 %, BASF	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Vann	0,77	0,79	0,41	0,31	0,76
Sum	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Analysert kjemisk sammensetning (%),					
Moisture	6,8	6,9	7,6	8,0	7,2
Protein	33,9	33,2	38,5	38,9	32,6
Fett	38,2	38,1	33,6	32,5	38,1
Aske	4,2	4,1	3,6	32,5	38,1
Estimert EPA + DHA og Zn i forsøksfôr periode I og II					
EPA+DHA % in total fatty acids	6	6	6	6	10
E6 Zinc total, mg/kg	180	120	180	120	180

Fiskeolje 1: inneholder 20 % EPA + DHA; Fiskeolje 2: blanding av to typer fiskeolje og inneholder 20 % and 28 % EPA + DHA; Teknisk «feed additives: antioxidants and fat sealers»

Nivåene av EPA+DHA var ca. 6,6 % av totale fettsyrer i alle dietter unntatt i høy omega-3 gruppen hvor EPA+DHA var ca. 11 % av totale fettsyrer i begge perioder. Total mengde EPA og DHA i mg/g var litt lavere i LF gruppene enn HF gruppene, grunnet det lavere fettnivået i dietten.

Tabell 40 Mineralsammensetning av diettene

Innhold (%)	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
Fase I (fra 1,6 kg – 2,5 kg)					
Analysert					
Zn (mg kg ⁻¹)	204,9	126,6	191,7	129,1	184,3
Fe (mg kg ⁻¹)	204,2	211,1	211,7	218,1	245,3
Mn (mg kg ⁻¹)	46,2	52,7	60,8	54,6	59,8
Cu (mg kg ⁻¹)	6,3	6,0	6,5	6,5	7,0
Se (mg kg ⁻¹)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
P (g kg ⁻¹)	8,6	8,4	8,8	9,0	9,4
Ca (g kg ⁻¹)	7,4	7,3	7,7	7,9	8,3
K (g kg ⁻¹)	7,5	7,3	6,9	6,8	7,1
Mg (g kg ⁻¹)	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Na (g kg ⁻¹)	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2
Fase II (Fra 2,5 kg – 4,5 kg)					
Analysert					
Zn (mg kg ⁻¹)	188,2	101,8	181,9	101,6	180,8
Fe (mg kg ⁻¹)	116,9	118,2	130,6	116,5	120,3
Mn (mg kg ⁻¹)	28,5	26,2	25,1	25,9	25,6
Cu (mg kg ⁻¹)	4,6	4,6	4,4	4,4	4,6
Se (mg kg ⁻¹)	0,8	0,7	0,8	0,8	0,7
P (g kg ⁻¹)	7,3	7,2	7,6	7,0	7,1
Ca (g kg ⁻¹)	4,4	4,3	4,0	4,3	4,3
K (g kg ⁻¹)	9,6	9,4	7,0	6,9	9,2
Mg (g kg ⁻¹)	1,8	1,8	1,5	1,5	1,8
Na (g kg ⁻¹)	1,4	1,2	1,4	1,5	1,2

Zn, zinc; P, phosphorus; Ca, calcium; K, potassium; Mg, magnesium; Na, sodium; Fe, iron; Mn, manganese; Cu, copper; Se, selenium; ALA: linolenic acid; LA: linoleic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; ARA: arachidonic acid.

Tabell 41-Tabell 44 viser relative (% av totale fettsyrer) og kvantitative verdier (mg fettsyre/gram fôr) for de ulike diettgruppene. Det var ca. 22 mg/g EPA+DHA i HF gruppene og ca. 20 mg/g i LF gruppene og ca. 40 mg/g i Høy omega-3 gruppen i periode II, mens prosenten av EPA+DHA var ca. 6,6 % i alle diettgrupper bortsett fra HøyΩ-3 gruppen som hadde ca. 11 % EPA+DHA av totale fettsyrer i fôret. Det var 17 % n-6 fettsyrer av totale fettsyrer i alle diettgrupper unntatt HFQHZ, hvor n-6 fettsyrene utgjorde ca. 13 % av totale fettsyrer. N-3/n-6 ratioen var 0,7-0,8 i alle diettgrupper unntatt i HFQHZ hvor den var ca. 1,3.

Tabell 41 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i de eksperimentelle diettene brukt i Periode 1 (oktober 2021 – januar 2022)

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ
14:0	1,59	1,53	1,59	1,65	2,49
16:0	9,01	8,94	9,08	9,22	11,27
18:0	2,85	2,80	2,81	2,81	2,88
20:0	0,60	0,59	0,58	0,57	0,53
22:0	2,58	2,57	2,52	2,50	3,99
Σ SFA ¹	17,07	16,90	16,96	17,15	21,76
16:1 n-9	1,53	1,50	1,50	1,53	2,30
18:1 n-9	41,58	41,85	41,54	41,55	34,67
18:1 n-7	2,59	2,60	2,59	2,59	2,42
20:1 n-9	2,45	2,45	2,41	2,40	2,97
22:1 n-9	0,77	0,77	0,76	0,71	0,62
24:1 n-9	0,44	0,45	0,45	0,43	0,61
Σ MUFA ²	49,67	49,88	49,55	49,47	44,04
18:2 n-6	16,45	16,37	16,82	16,79	13,02
20:2 n-6	0,18	0,17	0,18	0,19	0,25
20:4 n-6	0,16	0,15	0,16	0,15	0,25
22:4 n-6	0,19	0,17	0,18	0,18	0,16
Σ N-6 ³	17,12	16,98	17,45	17,44	13,91
18:3 n-3	5,95	6,00	6,00	6,01	4,87
20:4 n-3	0,86	0,86	0,85	0,87	1,39
20:3 n-3	0,93	0,90	0,94	0,89	0,82
20:5 n-3	2,54	2,53	2,51	2,48	4,02
22:5 n-3	0,26	0,26	0,26	0,26	0,41
22:6 n-3	4,07	4,14	4,12	4,03	6,56
Σ N-3	14,61	14,69	14,66	14,53	18,08
EPA+DHA	6,61	6,67	6,62	6,51	10,59
Σ PUFA ⁴	31,73	31,68	32,11	31,97	31,99
n3/n6	0,85	0,87	0,84	0,83	1,30

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 24:0. ²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 16:1n-7, 20:1n-7. ³Inkluderer 16:2n-6, 18:3n-6. ⁴Inkluderer 16:2n-6, 18:3n-6

Tabell 42 Fettsyresammensetning (mg/g) i de eksperimentelle diettene brukt i Periode 1 (oktober 2021 – midten av januar 2022)

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	4,64	4,79	4,20	4,89	7,61
16:0	26,30	27,96	24,05	27,22	34,41
18:0	8,31	8,77	7,44	8,30	8,80
20:0	1,77	1,85	1,53	1,69	1,60
22:0	7,54	8,04	6,69	7,38	12,19
Σ SFA ¹	49,84	52,87	44,91	50,64	66,44
16:1 n-9	4,45	4,70	3,98	4,51	7,03
18:1 n-9	121,45	130,94	110,09	122,71	105,89
18:1 n-7	7,56	8,12	6,86	7,66	7,39
20:1 n-9	7,17	7,66	6,38	7,08	9,06
22:1 n-9	2,26	2,41	2,01	2,08	1,89
24:1 n-9	1,29	1,42	1,19	1,28	1,87
Σ MUFA ²	145,05	156,06	131,29	146,10	134,51
18:2 n-6	48,06	51,22	44,56	49,59	39,77
20:2 n-6	0,53	0,55	0,48	0,55	0,76
20:4 n-6	0,47	0,48	0,41	0,46	0,76
22:4 n-6	0,54	0,55	0,48	0,52	0,49
Σ N-6 ³	50,00	53,13	46,23	51,49	42,48
18:3 n-3	17,37	18,77	15,89	17,75	14,88
20:4 n-3	2,51	2,69	2,25	2,56	4,23
20:3 n-3	2,73	2,83	2,48	2,63	2,50
20:5 n-3	7,41	7,91	6,64	7,32	12,29
22:5 n-3	0,77	0,80	0,68	0,76	1,26
22:6 n-3	11,87	12,97	10,90	11,88	20,05
Σ N-3	42,66	45,97	38,85	42,90	55,21
EPA+DHA	19,28	20,88	17,55	19,20	32,33
Σ PUFA ⁴	92,65	99,10	85,09	94,39	97,69
n3/n6	0,85	0,87	0,84	0,83	1,30

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 24:0.

²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 16:1n-7, 20:1n-7.

³Inkluderer 16:2n-6, 18:3n-6.

⁴Inkluderer 16:2n-6, 18:3n-6

Tabell 43 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i de eksperimentelle diettene brukt i Periode 2 (midt-Januar 2022 – Juni 2022)

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	1,92	1,90	1,88	1,96	3,24
16:0	10,09	9,79	9,89	9,99	12,90
18:0	3,26	3,21	3,21	3,36	3,42
20:0	0,57	0,56	0,57	0,60	0,49
22:0	0,87	0,92	0,88	1,02	0,79
Σ SFA ¹	17,21	16,86	16,87	17,35	21,37
16:1 n-7	2,25	2,29	2,34	2,41	3,89
18:1 n-9	41,16	41,92	41,87	41,42	33,10
18:1 n-7	2,67	2,69	2,67	2,64	2,83
20:1 n-9	1,99	2,00	1,88	1,88	2,61
22:1 n-11	1,48	1,46	1,21	1,25	2,48
22:1 n-9	0,53	0,58	0,56	0,57	0,57
Σ MUFA ²	50,62	51,50	50,96	50,61	46,20
18:2 n-6	17,17	16,49	17,00	16,57	11,60
18:3 n-6	0,03	0,09	0,11	0,10	0,12
20:2 n-6	0,12	0,12	0,10	0,11	0,15
20:4 n-6	0,24	0,24	0,25	0,25	0,42
Σ N-6	17,56	16,94	17,47	17,04	12,30
18:3 n-3	5,01	5,03	4,99	4,91	3,61
20:4 n-3	0,18	0,18	0,16	0,15	0,28
20:5 n-3	3,87	3,95	4,20	4,31	6,95
22:5 n-3	0,47	0,48	0,53	0,57	0,87
22:6 n-3	2,56	2,56	2,45	2,53	4,43
Σ N-3	12,10	12,20	12,32	12,47	16,15
EPA+DHA	6,44	6,51	6,64	6,84	11,38
Σ PUFA	29,66	29,14	29,78	29,50	28,44
n3/n6	0,68	0,72	0,70	0,73	1,34

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 24:0. ²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1n-7, 20:1n-7, 22:1n-7, 24:1n-9.

Tabell 44 Fettsyresammensetning (mg/g) i de eksperimentelle diettene brukt i Periode 2 (midt-Januar 2022 – Juni 2022)

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	6,67	6,20	5,70	5,64	11,27
16:0	34,99	31,87	29,93	28,79	44,81
18:0	11,30	10,46	9,74	9,67	11,88
20:0	1,96	1,81	1,73	1,74	1,71
22:0	3,03	2,99	2,66	2,92	2,73
Σ SFA ¹	59,71	54,89	51,08	50,03	74,18
16:1 n-7	7,79	7,46	7,08	6,94	13,52
18:1 n-9	142,77	136,42	126,73	119,44	114,94
18:1 n-7	9,25	8,76	8,08	7,63	9,82
20:1 n-9	6,90	6,50	5,70	5,43	9,07
22:1 n-11	5,13	4,74	3,67	3,59	8,62
22:1 n-9	1,85	1,89	1,69	1,63	1,96
Σ MUFA ²	175,59	167,62	154,27	145,92	160,44
18:2 n-6	59,56	53,67	51,47	47,80	40,27
18:3 n-6	0,11	0,30	0,34	0,28	0,43
20:2 n-6	0,41	0,38	0,31	0,33	0,54
20:4 n-6	0,82	0,79	0,75	0,73	1,46
Σ N-6	60,90	55,14	52,88	49,14	42,70
18:3 n-3	17,38	16,39	15,11	14,17	12,55
20:4 n-3	0,64	0,57	0,48	0,43	0,96
20:5 n-3	13,44	12,85	12,70	12,42	24,14
22:5 n-3	1,62	1,56	1,59	1,64	3,03
22:6 n-3	8,89	8,35	7,40	7,28	15,39
Σ N-3	41,97	39,71	37,29	35,94	56,08
EPA+DHA	22,33	21,20	20,11	19,70	39,53
Σ PUFA	102,87	94,85	90,17	85,08	98,77
n3/n6	0,68	0,72	0,70	0,72	1,34

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 24:0. ²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1n-7, 20:1n-7, 22:1n-7, 24:1n-9.

5.7.2 Metodikk

Det ble tatt ut 10*3 fisk til helkroppsprøver ved oppstart av fôringsforsøket, og 5 fisk per merd til helkroppsanalyser når fisken hadde nådd 2,5 kg 11-12 januar 2022 og 5 fisk per merd til helkroppsanalyser ved avslutning av fôringsforsøket i juni 2022. Det ble laget helkroppshomogenat av tre samleprøver fra 10 fisk ved start og en samleprøve per merd fra de ulike diettgruppene ved 2,5 kg (før bytte til 9 mm fôr) og ved avslutning av fôringsforsøket. Helkroppshomogenatene ble produsert umiddelbart etter slakt og deretter frosset i triplikate beger ved -40 °C. Før overgang til 9mm fôr ble all forsøksfisk i de ulike diettgruppene bulkveid.

To prøvetakinger til spesialanalyser ble utført i denne studien: ved slutten av fase I (januar 2022) og slutten av fase II (juni 2022). Fisk ble føret før organ- og vevsprøvetaking for å ha tarmen i en føret tilstand. Imidlertid ble fisk for helkroppsprøvetaking tatt to dager etter den siste prøvetakingen, og de ble sultet i denne perioden for å sikre at magen var tom. Før hver prøvetaking ble fiskene fullstendig bedøvet. Videre ble blodprøver tatt ved bruk av heparinbehandlede vakuumsprøvetakinger og deretter sentrifugert for å få plasma (for sporelementer og lipidmetabolittanalyser, 6 individer fra hver merd, totalt 18 prøver

fra hver diettbehandling). I tillegg ble midttarmen raskt isolert fra fisken og lagret i RNAlater for genekspresjonsanalyse (4 individer fra hver merd, totalt 12 prøver fra hver diettbehandling). Videre ble forskjellige vev inkludert lever, hodenyre, muskel (norsk kvalitetssnitt, NKS), skinn og ryggvirvel (nær NKS, omtrent 2 cm i midtre del av ryggvirvlene) separert fra fisken for sporelementanalyse (samleprøver av 6 individer fra hver merd, totalt 3 prøver fra hver diettgruppe). Ryggvirvler ble også tatt for beintetthetsanalyse (BMD) (10 individer fra hver merd, totalt 30 prøver fra hver diettbehandling).

Ved avslutning av forsøket i juni 2022, ble det tatt ut 15 fisk per merd til biometriske målinger, kvalitetsanalyser og velferdsscoreanalyser. Prøver fra lever, skinn, midttarm, rygggrad, hjerte og norsk kvalitetssnitt (NKS) ble frosset ned ved -80°C . Videre ble prøver av lever, skinn, midttarm, baktarm og hjerte (inkludert atrium og ventrikkle) fiksert i 10 % fosfatbufret formalin og lagret ved 4°C . Prøver fra de samme vevene ble også tilsatt RNAlater (Qiagen Nordic, Norge). I tillegg ble fôrprøver fra alle fôrpartier frosset ved -40°C .

Formler

Fiskevekt ble registrert og vekstratene ble beregnet som følger, basert på gjennomsnittlige verdier per merd:

$$\text{Spesifikk vekstrate (SGR)} = (\ln W_1 - \ln W_0) / (t_1 - t_0) \times 100$$

$$\text{Termisk vekst koeffisient (TGC)} = (W_1^{1/3} - W_0^{1/3}) \times 1000 / d^{\circ};$$

hvor W_0 er startvekt (g) og W_1 er sluttvekt (g), henholdsvis t_1 og t_2 , og d° er summen av døgngreder. Fôrutnyttelse (FCR) er basert på registrert fôrinntak og biomasse økning per merd og beregnet som følger:

$$\text{FCR} = \text{fôr spist (g)} / \text{biomasse vektøkning (g)}$$

$$\text{Kondisjonsfaktor (CF)} = (\text{kroppsvikt (g)}) / (\text{fiskens gaffellengde (cm)})^3 \times 100$$

Fettsyreretensjon ble beregnet per merd i 2 fôringsperioder (Fase I og Fase II) i henhold til følgende generelle formel:

$$\text{Fettsyreretensjon} = [(FB \times N_1) - (IB \times N_0)] / (\text{fôrinntak} \times N_{\text{diett}}^{-1}) \times 100;$$

hvor FB og IB refererer til slutt (F) og start (I) biomasse og N er konsentrasjonen av fettsyrer i fisk (hvor 1 er slutt og 0 start prøvetaking dager) eller diett. Den endelige biomassen ble korrigert for antall døde i alle eksperimentelle perioder.

- Vektøkning (WG, %) = $100 \times (\text{sluttvekt} - \text{startvekt}) / \text{startvekt}$
- Mineralretensjon (%) = $100 \times (\text{sluttkroppsm mineral} \times \text{sluttkroppsvikt} - \text{startkroppsm mineral} \times \text{startkroppsvikt}) / (\text{mineral i fôr} \times \text{fôrinntak})$
- Δ helkropp (eller vev) mineral (%) = $100 \times (\text{slutt helkropp (eller vev) mineral} - \text{start helkropp (eller vev) mineral}) / \text{start helkropp (eller vev) mineral}$

Fettinnhold, fettsyresammensetning og kjemiske sammensetningsanalyser

Totallipid og fettsyresammensetning ble analysert i fôr, helkropp, muskel (NKS), lever, skinn, midttarm etter metoder beskrevet av og kjemisk sammensetning av helkropp ble analysert som beskrevet Folch et al. 1957 og Bao et al, 2017.

Kjemiske analyser

Analyser av fôr og helfisk ble utført etter homogenisering. Tørrstoff ble analysert ved tørking ved 105 °C til konstant vekt; protein ble analysert ved Kjeldahl-metoden ($N \times 6,25$); aske ble analysert gjennom muffelovn (550 °C); fettnivå ble analysert ved syrehydrolyse og ekstraksjon med dietyleter.

Før fettsyreanalyse ble totale lipider i fôret isolert ved Folch-løsning og deretter fullstendig tørket under N₂-gass. Videre ble lipider trans-metylerte over natten med 2'-2'-dimetoksypropan, metanolisk HCl og benzen ved romtemperatur. Metylestere ble isolert og analysert ved bruk av en gasskromatograf (Hewlett Packard 6890; HP) utstyrt med en split injektor, en SGE BPX70 kapillærkolonne (SGE Analytical Science) og en flammeionisasjonsdetektor. Temperaturene på injektoren og detektoren ble satt til 280 °C, med He2 som bæregass. Ovnstemperaturen ble økt fra 50 °C til 180 °C (10 °C/minutt), og videre økt til 240 °C (0,7 °C/minutt). Individuelle fettsyre-metylestere ble identifisert ved å sammenligne dem med tidligere karakteriserte standarder. Resultatene ble videre analysert ved bruk av HP ChemStation-programvare. Den absolutte mengden av fettsyrer ble beregnet ved bruk av C23:0 metylester som intern standard.

Mineraler og beintetthetsanalyse

Mineralinnhold i fôr, fisk og vev ble kvantifisert ved induktivt koblet plasma massespektrometri (ICP-MS). Kort fortalt ble prøvene (unntatt plasmaprøver) frysetørket og homogenisert før analyse. Videre ble prøvene (0,2 g tørr prøve med 0,5 ml deionisert vann eller 0,5 ml plasmaprøve) og 2 ml konsentrert HNO₃ fordøyd i Milestone UltraWave (Milestone Inc., USA). Før analyse av mineraler ved ICP-MS (Thermo Scientific, USA), ble fordøyde prøver fortynnet til 25 ml med deionisert vann. Deretter ble eluaten introdusert i nebulisatorrøret til ICP-MS, og mineraler ble analysert i kinetisk energidiskriminering (KED) reaksjonsmodus. For å korrigere for instrumentell drift under analysen ble en løsning av germanium og rhodium tilsatt online. ICP-MS ble innstilt før analyse ved bruk av en 1 ppb innstillingsløsning B (Thermo Fisher, i 2 % HNO₃ og 0,5 % HCl). Datainnsamling og -behandling ble utført ved bruk av Qtegra-programvare (Thermo Scientific). En ekstern kalibreringskurve som varierte fra 10 til 500 ng mL⁻¹ ble brukt for å kvantifisere mineralene.

Beintettheten (BMD) ble målt med en Skyscan 1275 mikro-CT-skanner (CS). Prøvene og fantomene ble skannet med et aluminiumfilter, en kilde-spenning og strøm på 50 kV og 200 µA, og en pikselstørrelse på 10 µm. Skanningene ble rekonstruert med nrecon-rekonstruksjonsprogramvare (nrecon, versjon 1.7.3), med en stråleharningskorreksjon på 55 og minimumsverdien av CS til bildekonvertering på 0,0000–0,08000. BMD ble funnet med CT-analyser (CTan, v 1.20.3.0). Skanningene av fantomene (0,25 g/cm³ og 0,75 g/cm³) ble brukt for kalibrering. BMD i prøven ble funnet ved å velge spesifikke deler av beinskanningene og finne gjennomsnittlig BMD i CTan.

Analyse av plasmalipider og lipoproteiner

Plasma lipider og lipoproteiner, inkludert triacylglyserol (TAG), kolesterol (CHO), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) og totalt protein (TP) ble målt ved bruk av en klinisk bioanalisator (Pentra C400 Horiba Medical, Montpellier, Frankrike).

Genekspresjonsanalyse

Total RNA ble isolert fra tarmvev ved bruk av Maxwell® HT simplyRNA Kit (Promega, USA) og Biomek® 4000 automatisert væskehåndterer (Beckman Coulter, USA). I tillegg ble RNA-kvalitet og -kvantitet evaluert ved Bioanalyzer (Agilent 2100) og spektrofotometeret (NanoDrop ND-1000) henholdsvis. Videre ble uttrykksnivåene av kandidatgener analysert ved to-trinns real-time PCR (RT-PCR). cDNA ble syntetisert ved hjelp av reagenser for invers transkripsjon (Thermo Fisher Scientific, USA). I tillegg ble RT-PCR for målgener utført ved bruk av SYBR GREEN PCR Master Mix (Roche-Norge, Norge) og kvantifisert på qPCR-instrumentet (Bio-Rad, USA). RT-PCR-programmet var som følger: 10 min

preinkubering ved 95 °C, etterfulgt av 40 sykluser på 95 °C i 30 s, 60 °C i 30 s, 72 °C i 30 s, og en smeltekurve. Etter stabil beregning av husgenene (β -aktin og EF-1 α), ble uttrykksnivåene av kandidatgener normalisert ved bruk av programvaren CFX Maestro (Bio-Rad, USA). Unntatt for β -aktin og EF-1 α (Olsvik et al., 2005), ble andre primere nylig designet gjennom NCBI's online verktøy for primerdesign (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?>). Ett-trinns RT-PCR (QIAGEN one step RT-PCR kit) ble brukt for å evaluere primerspesifisiteten.

Kandidatgener for qPCR inkluderte to referansegener (β -aktin og elongasjonsfaktor 1 alfa (EF-1 α)), elleve gener relatert til Zn-opptak og -transport (solute carrier family 39 member 4 (ZIP4), solute carrier family 39 member 14 (ZIP14), solute carrier family 39 member 5 (ZIP5), metallothionein A (MT A), metallothionein B (MT B), solute carrier family 30 member 4 (ZnT4), solute carrier family 30 member 5 (ZnT5), solute carrier family 30 member 6 (ZnT6), solute carrier family 30 member 7 (ZnT7), solute carrier family 30 member 1 (ZnT1), metal regulatory transcription factor 1 (MTF1)) og elleve gener relatert til lipidtransport og -metabolisme (Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), cluster of differentiation 36 (CD36), fatty acid transporter protein 4 (FATP4), fatty acid transporter protein 6 (FATP6), fatty acid-binding protein 2 (FABP2), diglyceride acyltransferase 1 (DGAT1), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), apolipoprotein B (APOB), carnitine O-palmitoyltransferase 1 (CPT1), monoacylglycerol O-acyltransferase 2 (MGAT2), apolipoprotein A-IV (APOA4)). Primere for disse genene er oppgitt i

Tabell 45.

Tabell 45 Primere benyttet for qPCR analyse

Gen	Primer sekvens (5'– 3')	Accession no. ^a	Effektivitet (%)	Production (bps)	Tm (°C)
β -actin	F: CCAAAGCCAACAGGGAGAA	BG933897	117,17	91	57,56
	R: AGGGACAACACTGCCTGGAT				61,14
EF- 1 α	F: TGCCCCTCCAGGATGTCTAC	AF321836	104,75	57	60,69
	R: CACGGCCCCACAGGTACTG				60,05
ZIP4	F: GAGCCTCCTAGTCCTCACACT	XM_045709302.1	143,17	158	60,34
	R: GTCATTTTGAGGAAATCGTGTATCA				57,93
ZIP14	F: ATCTCCTCCAGCCGGTAGTT	XM_045695336.1	129,72	147	60,03
	R: TCTTCCGACCCGAGTAGTGT				59,96
ZIP5	F: TGCCTGTATGCCCCAGAAAAT	XM_014136187.2	106,62	74	59,99
	R: ACAGTTGCTGAATGCCAAACA				59,24
MT A	F: TGCAAGGGCAAGACTTGTGA	NM_001123677.1	109,16	87	60,11
	R: ACGTCAGTCATAGGGAATGGAC				59,57
MT B	F: CTCTTGCAACTGCGGTGGAT	NM_001123669.1	107,53	76	60,96
	R: GCAGGGGCAGCAACTTTTC				60,01
ZnT4	F: TTATGGTGCCTGGCTATGCT	NM_001139905.1	107,53	97	59,15
	R: TTGCATGTGTTTTGCTGCCT				59,54
ZnT5	F: AGGTAGAGTCATGGTCGGCT	XM_014128822.2	115,54	139	60,03
	R: AGAAAGATGGAGCCGTAGCG				59,90
ZnT6	F: AATCCTGGTGTTCGGGATGC	NM_001139824.1	136,65	160	60,39
	R: CTTCAATTGCCACCCAAGAGC				59,47
ZnT7	F: TGGGCAAGAGTCCAAACATGA	XM_014216007.2	120,68	136	59,86
	R: GTGCAGTTCATCATGGCAGTG				60,14
ZnT1	F: GTATCCTGCTCTACACCACCTA	XM_014143981.2	95,97	148	58,44

Gen	Primer sekvens (5'– 3')	Accession no. ^a	Effektivitet (%)	Production (bps)	Tm (°C)
	R: CAGATGTGCAGTTCGTGGA				57,78
MTF1	F: AGTTTTTCCACAACAAAAGGGC	XM_014200437.2	10,88	169	58,39
	R: AGAGCTGTTGCTATGGTGGAC				60,07
NPC1L1	F: CCCGTCATGAGCCAGGATAC	XM_014171081.2	90,23	162	59,97
	R: GCATGGGGCAGACCTTTTTG				60,04
CD36	F: ACCCCCAGCAGTCACATTATT	XM_014153607.2	104,46	131	59,36
	R: GTATGTAGGTCCCAGCAGCA				59,17
FATP4	F: TCTGGAACACATGACAAGCC	XM_014125609	141,16	170	58,10
	R: GCGAACAAGTTGTGTCCTTCC				60,00
FATP6	F: ACAAACGCAACCCGCTCTA	XM_045693823.1	100,22	156	59,89
	R: CCACCGTCTCAGTGAACCAA				59,89
FABP2	F: GGATTATGCCTCGACTGCCA	BT048647	116,13	149	59,89
	R: GCCACTCTGGGGAATTGCTA				59,74
DGAT1	F: CGGTAACGGAATGGTGCGT	XM_014124329.1	106,19	148	60,74
	R: CAGCCTCTGACATCAATTGCCT				60,94
MTP	F: TGATCATTGTAAATGTGTGCCTTT	XM_014195517.2	106,50	124	58,24
	R: ACAGCTAGCAAGTTAGCCTC				57,32
APOB	F: TGGGCTTGACTGGCAAGATT	X81856	114,62	101	59,89
	R: TCCCTCATCTTGCGTTTCT				59,02
CPT1	F: TAAGAGGCCGTGGACCAATC	XM_045708590.1	101,55	195	59,46
	R: ATTGCGCTGAGCACATTGGA				60,96
MGAT2	F: CGAGTGCAAGCTCTGCAAGG	XM_014205344	105,37	75	61,91
	R: GAGGTCGGGCAAGATGAAGT				59,75
APOA4	F: TGAAGGTGTTGGTGGTGCTT	XM_014201582	105,37	131	60,03
	R: TGTTGCCTTGCGACATAGT				59,96

^a: GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Histologiske analyser og røntgenanalyser

Vevsprøver ble dehydrert i etanol, og støpt inn i parafin i henhold til standard histologiske teknikker. Vevssnitt av hjerte med ca. 2-4 mm tykkelse ble farget med hematoksylin og eosin (H&E). Totalt 50-60 prøver per vev ble undersøkt (3-5 prøver per merd). Leverprøver ble undersøkt for grad av patologisk steatose ved hjelp av en semi-kvantitativ scoringsskala fra 1 til 5, hvor 1 representerer liten grad av vakuolisering og 5 høyt antall intracytoplasmatiske mikro- og makrovesikler. Videre, for prøver fra midttarm og baktarm, ble en enkel histologisk evaluering benyttet til å beskrive generelle morfologiske egenskaper som folding av tarmslimhinnen og vakuolisering av enterocytter. Hjertet (atrium/ventrikel) ble undersøkt for eventuelle histopatologiske endringer.

Velferd og filet kvalitet

Fisk ble evaluert for eventuelle ytre synlige skader (hudlesjoner, snute-, skjell- og finneskader) og intern helsescore (melaninflekker i fettvev- og hjerte, hjerteform, mage- og tarmbetennelse, og fettakkumulering i lever). Hver av velferdsindikatorerne fikk en score mellom 0 og 3 (ytre skader) eller 0 og 4 (intern helsescore), hvor lav verdi representerer en god og høy verdi en dårlig tilstand. Eksterne og interne evalueringer ble utført av samme personer (2 stk.). I tillegg ble scorene fra ytre og indre indikatorer kartlagt ved bruk av radarplott, og det resulterende arealet ble beregnet og brukt som en

oppsummert indeks (ekstern velferdsindeks, EWI og intern velferdsindeks, IWI), i henhold til den generelle formelen:

$$\text{EWI eller IWI} = 1/2 \times (A \times B + B \times C + \dots + C \times A) \times s \left((360 / n \times \pi) / 180 \right)$$

Store bokstaver (A, B, C++) representerer hver av velferdsindikatorerne og "n" er antall fisk inkludert i evalueringen.

Fisk ved sluttuttak ble filetert manuelt og analysert for filetkvalitet ved 7 ± 1 dager post mortem. Filetfarge ble målt instrumentelt ved Minolta (CR-400 Minolta, KONICA MINOLTA SENSING, INC. JAPAN) på homogenat av norsk kvalitetssnitt (NKS), preparert iht. NS 9402, tre målinger per individ. Fargerommet CIE L*a*b* 1976 ble brukt til resultater, der L*, a* og b* representerer henholdsvis lyshet (L*=0 for svart, L*=100 for hvit), rødhet (for positive tall) og gulhet (positive tall). Disse ble omregnet til Hue/kulør (lavere Hue betyr mer rødfarge) og Chroma/metning. Av de samme homogenatene ble det så lagd samleprøve per merd for kjemisk analyse av astaxanthin ved HPLC.

Mørke flekker ble vurdert ved bruk av «FHF-skalaen» (Mørkøre 2012), samt ved telling av antall affiserte muskelsegmenter.

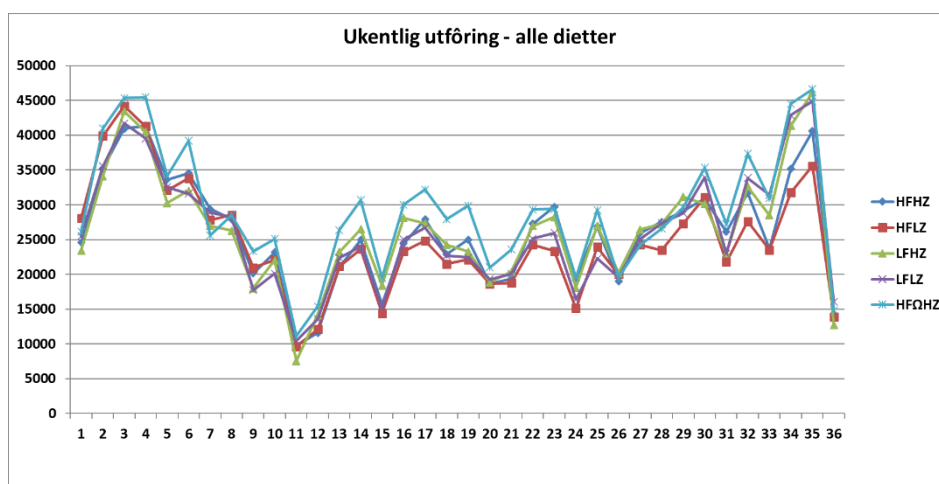
Fasthet i muskel ble målt instrumentelt (Larsson et al., 2012) i dorsal del av NKS. Instrument brukt var en Texture Analyzer TA.XTplus100C (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, UK) utstyrt med en 30 kg load cell og en sylinder-probe ($\varnothing$ 0.5"; type P/0.5) som ble kjørt ved konstant hastighet (1 mm/s).

Statistisk Analyse

Hver diett ble gitt til tre merder ($n = 3$), hvor hver merd tjente som statistisk enhet. Normaliteten av dataene og homogeniteten av varians ble analysert ved bruk av Shapiro–Wilk-test og Levene's test, henholdsvis. Hvis $p < 0,05$, ble Mann-Whitney U-test brukt som alternativ t-test (sammenligning av HFHZ og HFΩ-3HZ-gruppene, merket "§" i relaterte resultater), mens Scheirer-Ray-Hare-test ble brukt som alternativ toveis ANOVA (sammenligning av HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ-gruppene, merket "α" i relaterte resultater) (not som en tilfeldig faktor) (Dytham, 2011). Resultater fra mRNA-ekspressjon ble sammenlignet ved ikke-parametrisk analyse. Resultater fra vekst, mineraler i vev (unntatt plasma) mellom HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ-gruppene ble evaluert ved toveis ANOVA, med fett og Zn som uavhengige variabler. Derimot ble effekten av n-3 LC-PUFA analysert ved bruk av t-test mellom HFHZ og HPΩHZ-gruppene. Når det gjelder resultatene fra plasmamineraler, plasmalipider og BMD blant HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ-gruppene, ble toveis nested ANOVA brukt, med fett og Zn som uavhengige variabler og merd som tilfeldig faktor. Også ble disse resultatene fra HFHZ og HPΩHZ-gruppene analysert ved t-test nested analyse, med diett som en uavhengig variabel og merd som en tilfeldig faktor. Hvis p-verdien var $< 0,05$, ble resultatene ansett som statistisk signifikante. Alle resultater er presentert som gjennomsnitt $\pm$ standardavvik (SD). GraphPad Prism 8 (Insightful Science, USA) og R (R Development Core Team, 2011) ble brukt til statistisk analyse og JMP® programversjon 11.2.1 (SAS Institute Inc.).

5.7.3 Resultat og diskusjon AP 3: vekst, fôrutnyttelse, helse, mineral og fettsyresammensetning, filètkvalitet

Figur 72 og tabellene 46-47 viser fôrinntaket i de ulike diettgruppene gjennom hele forsøksperioden. Det var ingen signifikante forskjeller i fôrinntak mellom diettgruppene hverken i periode I eller i periode II. Imidlertid viste diettgruppen fôret det høyeste omega-3 fettsyrenivået (11% av totale fettsyrer) tendens til noe høyere fôrinntak i dagene etter avlusning enn de andre diettgruppene, noe som kan tyde på at høye nivåer av EPA og DHA i dietten har positiv effekt på fôrinntaket etter stress som tidligere vist i Lutfi et al., 2022. FCR var ca. 1,0 for alle eksperimentelle grupper.



Figur 72 Fôrinntak gjennom hele forsøksperioden. Fôrinntaket (gram) ble beregnet ukentlig.

Tabell 46 viser ingen signifikante forskjeller i tilvekst (SGR og TGC) mellom diettgruppene i første vekstperiode i sjø, fra oktober 2021 til januar 2022. I den andre vekstperioden, fra januar til juni 2022, oppnådde gruppen med det høyeste nivået av omega-3-fettsyrer (HFΩHZ) og gruppen med lavt fettinnhold og høyt sinknivå (LFHZ) de høyeste vekstratene (Tabell 47). Gruppen som ble fôret med 11 % EPA+DHA av totale fettsyrer hadde en høyere sluttvekt enn gruppene som fikk 6,6 % EPA+DHA. Dette samsvarer med tidligere funn fra Lutfi et al., 2022 som rapporterte at laks fôret med 10 % EPA+DHA oppnådde høyere tilvekst enn laks fôret med 5 % EPA+DHA i dietten. Denne effekten ble diskutert å være relatert til økt fôrinntak etter stress, som for eksempel avlusning, noe som også ser ut til å være tilfelle i denne studien.

Gruppen fôret diett med høyt fettinnhold og lavt sinknivå (HFLZ) presterte dårligst, med den laveste sluttvekten, som var signifikant lavere enn sluttvektene til HFΩHZ- og LFHZ-gruppene (Tabell 47). Tidligere studier på pattedyr har vist at marginal sinkmangel i dietten kan føre til redusert vekst, og denne effekten ser ut til å være spesielt tydelig i HF-gruppen, Amornrut et al., 1997.

Total fettretensjon var signifikant høyere i første vekstperiode (ca. 72 %) sammenlignet med andre vekstperiode (ca. 65 %). Det ble ikke observert noen signifikante effekter av diettene på total fettretensjon (Tabell 46-Tabell 47 og Figur 73).

Tidligere studier har vist at Atlantisk laks deponerer mer fett i muskel og har økt retensjon av lipider i helkropp ved avtagende daglengde om høsten. Dette er spesielt vist hos laks oppdrettet ved nordlige breddegrader med lange vintre og sen vår. Utover våren viser laksen reduserte lipidnivåer og lavere kondisjonsfaktor før sommer og høst (Rørvik et al, 2018)., noe som er i overensstemmelse med funn fra denne studien.

Tabell 46 Vekst ytelse og retensjon av fett og de viktigste fettsyrene i hele kroppen til atlantisk laks føret med de eksperimentelle diettene i 3 måneder (Periode 1; oktober 2021 - midten av januar 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ standardfeil med merd som statistisk enhet ($n = 3$, der hver prøve er representert av en pool av fem fisk). Data ble analysert ved enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys test ($P < 0,05$).

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ	P-verdi
Vekt (g)	2649 $\pm$ 27,6	2633 $\pm$ 12,9	2582 $\pm$ 69,2	2618 $\pm$ 48,8	2689 $\pm$ 74,0	0,69
SGR	0,6 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,00	0,6 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,02	0,7 $\pm$ 0,03	0,89
TGC	3,6 $\pm$ 0,14	3,6 $\pm$ 0,02	3,5 $\pm$ 0,18	3,6 $\pm$ 0,12	3,7 $\pm$ 0,16	0,89
FCR	1,0 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,03	0,38
Fett retensjon	72,0 $\pm$ 6,41	73,4 $\pm$ 2,25	74,7 $\pm$ 4,70	70,1 $\pm$ 5,59	70,5 $\pm$ 4,02	0,95
14:0	98,6 $\pm$ 3,38	94,3 $\pm$ 6,39	73,9 $\pm$ 15,13	77,0 $\pm$ 2,47	68,0 $\pm$ 4,44	0,08
16:0	100,3 $\pm$ 6,64	90,7 $\pm$ 6,53	82,9 $\pm$ 13,12	87,0 $\pm$ 3,13	73,8 $\pm$ 6,61	0,27
16:1n-7	109,9 $\pm$ 56,26	60,7 $\pm$ 60,68	166,4 $\pm$ 11,65	163,7 $\pm$ 4,20	124,1 $\pm$ 1,58	0,32
18:0	81,3 $\pm$ 5,41	76,3 $\pm$ 2,84	71,1 $\pm$ 11,35	73,0 $\pm$ 2,09	59,6 $\pm$ 7,31	0,29
18:1n-9	99,3 $\pm$ 8,10	87,7 $\pm$ 3,89	83,3 $\pm$ 10,20	85,0 $\pm$ 2,08	79,0 $\pm$ 7,66	0,38
18:2n-6	93,9 $\pm$ 6,69	82,9 $\pm$ 4,22	78,1 $\pm$ 9,38	77,9 $\pm$ 2,22	75,1 $\pm$ 7,73	0,34
18:3n-3	89,4 $\pm$ 5,40	78,8 $\pm$ 4,18	72,0 $\pm$ 10,39	73,1 $\pm$ 2,50	72,1 $\pm$ 6,99	0,33
20:0	54,1 $\pm$ 4,40	46,3 $\pm$ 4,29	43,0 $\pm$ 6,08	48,1 $\pm$ 2,34	38,1 $\pm$ 4,41	0,21
20:4n-6	265,3 $\pm$ 14,02 ^a	270,0 $\pm$ 6,54 ^a	242,0 $\pm$ 36,43 ^a	248,1 $\pm$ 16,18 ^a	124,7 $\pm$ 7,20 ^b	0,002
20:5n-3	82,1 $\pm$ 3,51	77,0 $\pm$ 6,06	57,2 $\pm$ 16,87	69,0 $\pm$ 1,35	59,6 $\pm$ 5,02	0,25
22:5n-3	295,1 $\pm$ 6,95	313,1 $\pm$ 22,98	213,1 $\pm$ 83,09	260,9 $\pm$ 1,44	212,7 $\pm$ 18,19	0,32
22:6n-3	117,5 $\pm$ 4,17	110,4 $\pm$ 4,33	94,4 $\pm$ 13,92	150,8 $\pm$ 46,35	88,8 $\pm$ 7,01	0,36

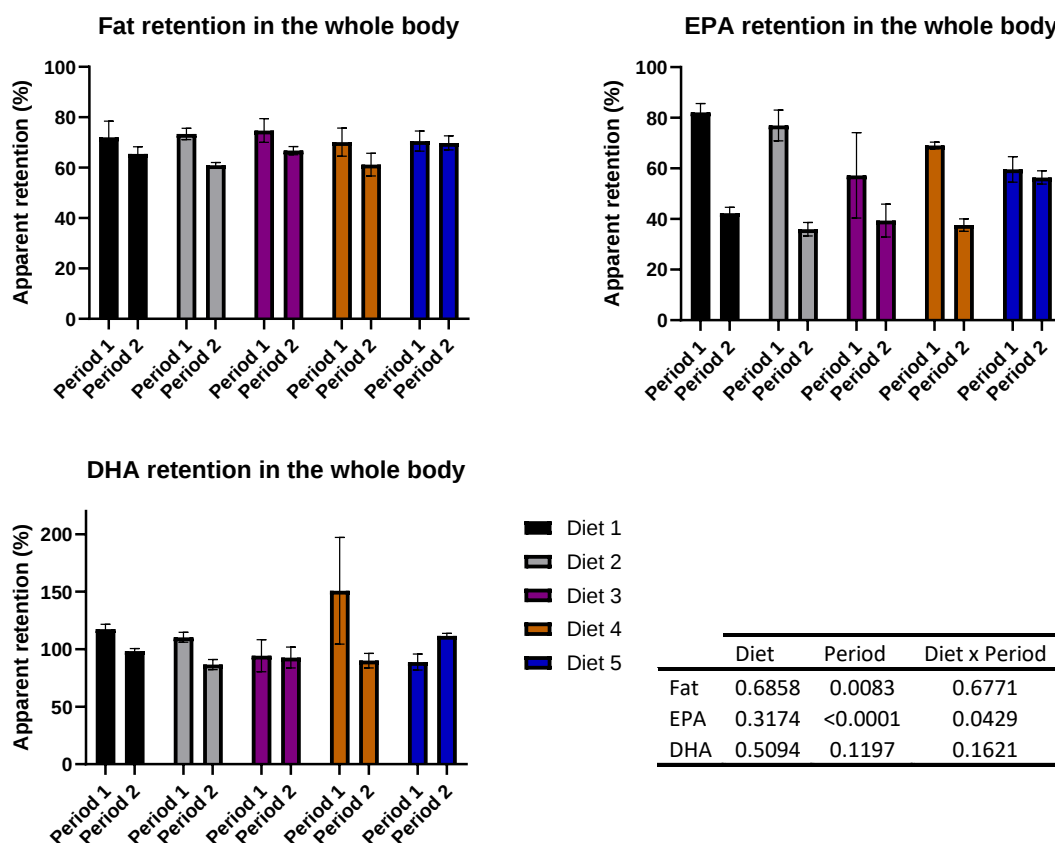
SGR, Specific growth rate; TGC, thermal growth coefficient; FCR, feed conversion ratio

Tabell 47 Vekst og retensjon av fett og de viktigste fettsyrene i hele kroppen til atlantisk laks føret med de eksperimentelle diettene i Periode 2 (midten av januar 2022 - juni 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ standardfeil med merd som statistisk enhet ($n = 3$, der hver prøve er representert av en pool av fem fisk). Data ble analysert ved enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys test ($P < 0,05$).

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ	p-verdi
Vekt (g)	4470 $\pm$ 23,2 ^{bc}	4313 $\pm$ 58,9 ^c	4554 $\pm$ 37,1 ^b	4520 $\pm$ 77,6 ^{bc}	4786 $\pm$ 8,8 ^a	0,0006
SGR	0,3 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,3 $\pm$ 0,00 ^b	0,4 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,3 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,4 $\pm$ 0,02 ^a	0,02
TGC	3,6 $\pm$ 0,05 ^{ab}	3,3 $\pm$ 0,07 ^b	3,8 $\pm$ 0,11 ^a	3,7 $\pm$ 0,09 ^{ab}	4,0 $\pm$ 0,16 ^a	0,008
FCR	1,0 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,01	1,0 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,03	0,38
Fett retensjon	65,4 $\pm$ 2,88	61,0 $\pm$ 1,06	66,8 $\pm$ 1,64	61,2 $\pm$ 4,53	69,8 $\pm$ 2,76	0,21
14:0	55,2 $\pm$ 1,51	47,7 $\pm$ 1,56	58,7 $\pm$ 8,01	52,7 $\pm$ 4,97	63,1 $\pm$ 3,05	0,23
16:0	59,1 $\pm$ 2,12	53,5 $\pm$ 1,88	62,4 $\pm$ 7,56	59,5 $\pm$ 4,11	63,2 $\pm$ 2,26	0,53
16:1n-7	129,7 $\pm$ 1,82 ^a	129,0 $\pm$ 0,28 ^a	130,6 $\pm$ 4,56 ^a	129,8 $\pm$ 4,88 ^a	107,5 $\pm$ 2,37 ^b	0,002
18:0	50,8 $\pm$ 1,65	47,2 $\pm$ 2,50	56,2 $\pm$ 6,63	49,2 $\pm$ 2,07	51,1 $\pm$ 1,09	0,47
18:1n-9	74,7 $\pm$ 1,38	68,7 $\pm$ 2,86	70,8 $\pm$ 6,36	70,8 $\pm$ 3,48	78,2 $\pm$ 2,79	0,44
18:2n-6	70,9 $\pm$ 1,24	66,4 $\pm$ 2,86	67,3 $\pm$ 5,57	68,5 $\pm$ 3,00	77,1 $\pm$ 2,95	0,25
18:3n-3	62,6 $\pm$ 0,25	55,0 $\pm$ 3,14	58,1 $\pm$ 6,37	57,4 $\pm$ 3,53	68,6 $\pm$ 3,42	0,18
20:0	39,8 $\pm$ 2,89	38,0 $\pm$ 1,26	40,2 $\pm$ 3,43	36,0 $\pm$ 1,86	34,6 $\pm$ 1,45	0,42
20:4n-6	22,2 $\pm$ 2,78 ^{ab}	11,0 $\pm$ 11,56 ^b	25,8 $\pm$ 10,70 ^{ab}	21,9 $\pm$ 7,00 ^{ab}	56,0 $\pm$ 8,35 ^a	0,04
20:5n-3	42,3 $\pm$ 2,39 ^{ab}	36,0 $\pm$ 2,68 ^b	39,4 $\pm$ 6,48 ^{ab}	37,6 $\pm$ 2,45 ^b	56,4 $\pm$ 2,61 ^a	0,02
22:5n-3	157,2 $\pm$ 8,98 ^{ab}	133,6 $\pm$ 10,11 ^b	144,0 $\pm$ 19,78 ^{ab}	129,6 $\pm$ 12,94 ^b	196,6 $\pm$ 5,50 ^a	0,02
22:6n-3	98,3 $\pm$ 2,29	86,6 $\pm$ 4,40	92,7 $\pm$ 9,14	90,1 $\pm$ 6,32	111,6 $\pm$ 2,10	0,06

SGR, Specific growth rate; TGC, thermal growth coefficient; FCR, feed conversion ratio

Det er verdt å merke seg at retensjonen av EPA var signifikant høyere i perioden oktober 2021 til januar 2022 enn i perioden januar til juni 2022 i diettgruppene HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ, mens det i diettgruppen HFQHZ ikke kunne observeres slik sesongvariasjon i retensjon av EPA+ DHA. Videre ble det i periode I observert en tendens til lavere retensjon av EPA+DHA i HFQHZ gruppen sammenlignet med diettgruppene føret lavere diettnivåer av disse fettsyrene, men dette snudde i periode II hvor retensjonen av disse fettsyrene var høyere i HFQHZ, noe som medførte en signifikant interaksjon mellom periode og diettnivå av EPA+DHA på EPA retensjonen i helkropp ($p = 0,043$). En mulig årsak til at man ikke ser et drop i retensjonen av EPA + DHA i periode II på våren i HFQHZ, selv om man får en reduksjon i retensjonen av totalfett, kan muligens skyldes det høyere nivået av mettet fett i HFQHZ sammenlignet med de andre diettgruppene, ca 22% mettet fett av totale fettsyrer i dietten sammenlignet med ca 17% av totale fettsyrer i HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ. Dette er i overensstemmelse med økt retensjon av EPA og DHA i gruppen føret det høyeste diettnivået av mettet fett i AP 2, og som publisert i Sissener et al., 2025. I andre vekstperiode var det også en tendens til lavere retensjon av EPA og DHA i helkropp hos laks som ble føret med de to diettene med lavt sinknivå.



Figur 73 Retensjon av totalfett, EPA og DHA hos atlantisk laks føret med eksperimentelle dietter (diets 1=HFHZ, diet 2=HFLZ, diet 3=LFHZ, diet 4=LFLZ, diet 5=HFΩHZ) i Periode 1 (oktober 2021 - midten av januar 2022) sammenlignet med Periode 2 (midten av januar 2022 - juni 2022). Resultatene er uttrykt som gjennomsnitt med standardfeil, der hver verdi stammer fra en sammenslått prøve fra fem fisk. Data ble analysert ved toveis ANOVA (diets og periode som faktorer; $P < 0,05$).

Dødeligheten var lav i alle diettgrupper, og det var ingen signifikante forskjeller i prosent dødelighet mellom diettgruppene, men det var tendens til høyere dødelighet i gruppen føret høyt fett med lav Zn (HFLZ), (4 %) sammenlignet med 1,2-1,8 % dødelighet i de andre diettgruppene (Tabell 48). Her er det viktig å merke seg at dette er meget lave dødelighetstall for laks i åpne sjømerder, som reflekterer at det har vært gode betingelser for fisken. Dermed er det rimelig å anta at redusert vekst og velferdsutfordringene man ser endel tendenser til i HFLZ-gruppene kunne blitt mer framtreddende ved utfordrende betingelser for fisken.

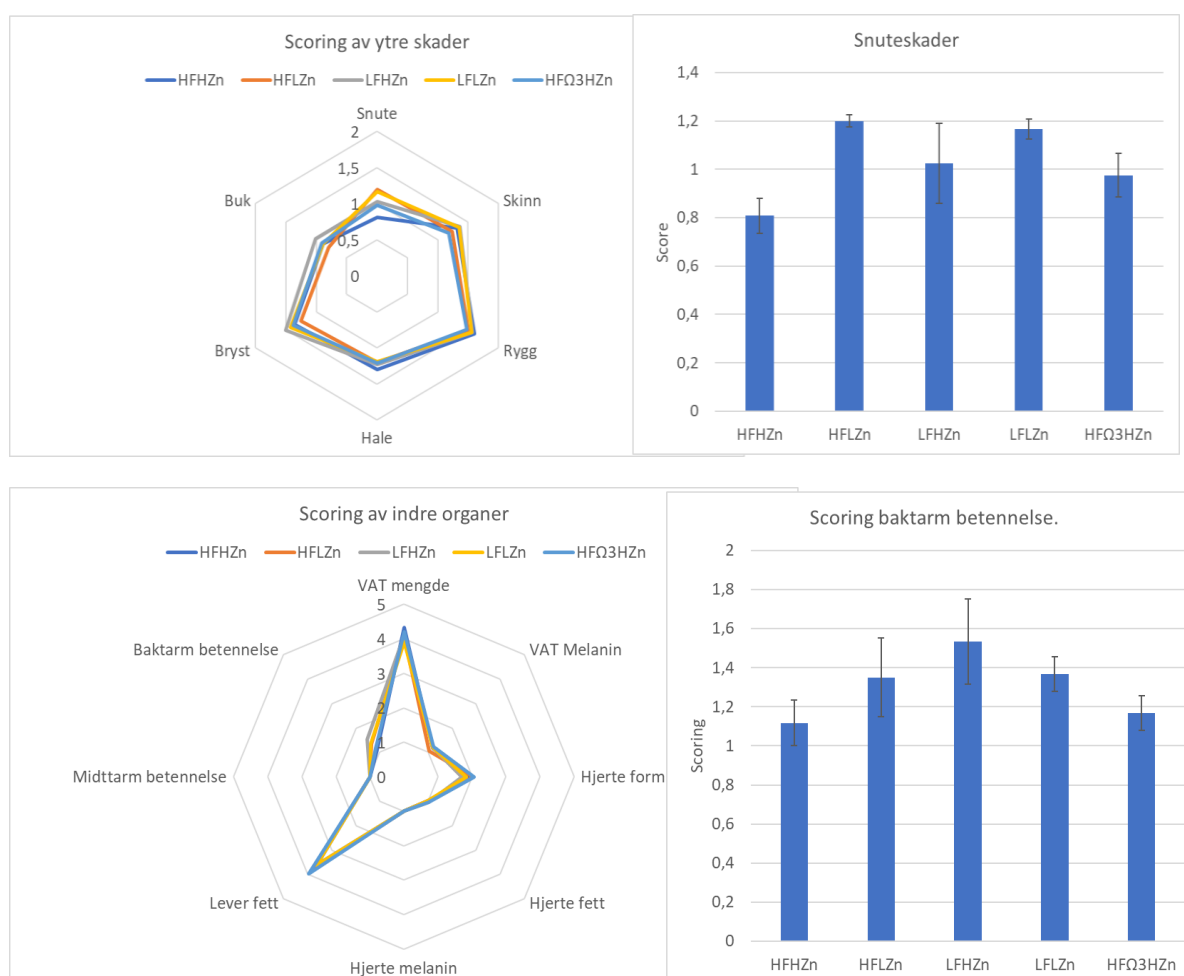
Tabell 48 Vekst, fôrutnyttelse og akkumulert dødelighet hos atlantisk laks føret med de eksperimentelle diettene i 8 måneder (Periode 1 + Periode 2). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ standardfeil med tank som statistisk enhet ($n = 3$). Data ble analysert ved enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys test ($P < 0,05$).

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ	P-verdi
SGR	0,4 $\pm$ 0,01 ^{bc}	0,4 $\pm$ 0,01 ^c	0,4 $\pm$ 0,00 ^{ab}	0,4 $\pm$ 0,01 ^b	0,5 $\pm$ 0,00 ^a	0,0003
TGC	3,6 $\pm$ 0,08 ^{bc}	3,4 $\pm$ 0,10 ^c	3,7 $\pm$ 0,05 ^{ab}	3,7 $\pm$ 0,08 ^b	3,9 $\pm$ 0,03 ^a	0,0002
FCR	1,1 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,01	1,1 $\pm$ 0,02	1,1 $\pm$ 0,02	0,078
Dødelighet (%)	1,5 $\pm$ 0,30	4,2 $\pm$ 1,10	1,2 $\pm$ 0,30	1,8 $\pm$ 1,39	1,8 $\pm$ 0,52	0,165

SGR, Specific growth rate; TGC, thermal growth coefficient; FCR, feed conversion ratio

Velferd og helse

Registrering av de ytre velferdsindikatorer; skader på snute, gjeller, skjelltap og finneskader viste ingen statistisk signifikante forskjeller mellom diettgruppene, men det var en tendens til høyere forekomst av snuteskader i gruppene føret med lavest nivå av Zn (HFLZ og LFLZ). (Figur 74). Helsen scoring av indre organer inkluderer forekomst av fett på hjertet, mengde innvolls fett og forekomst av melaninflekker i fettvevet, mage og tarmbetennelse og leverfett. Figuren viser ingen signifikante forskjeller i helsescore mellom diettgruppene, men de to gruppene HFHZ og HFΩHZ hadde tendens til lavere score for baktarmsbetennelse. Lavfettgruppene var føret med høyere nivåer av planteproteinene hvetegluten og erteprotein, noe som muligens kan ha påvirket tendensen til høyere scoring for moderat betennelse i baktarmen i LF gruppene.



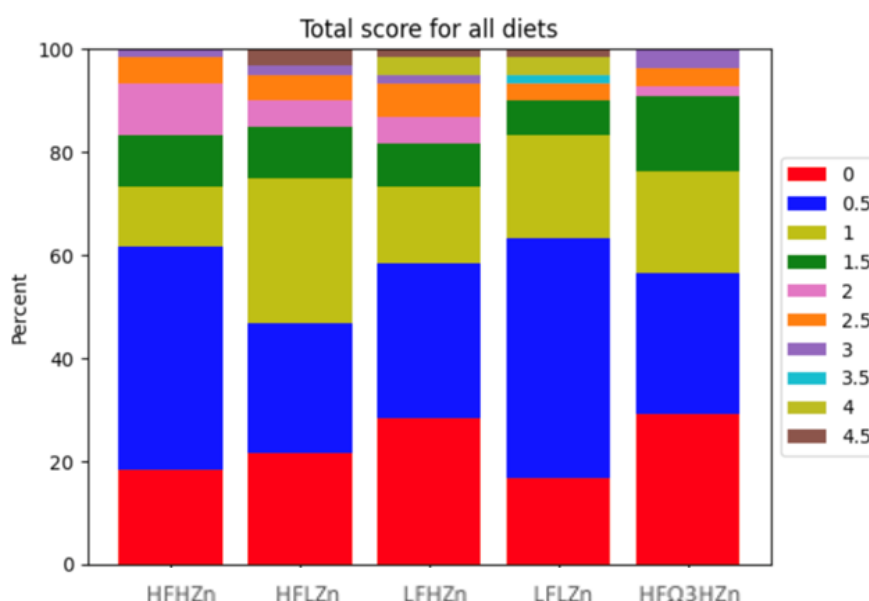
Figur 74 Eksterne (ytre skader) og interne (indre organ helsescore) velferdsindekser vist i form av oversikts «spider» diagram og data på scoring av snuteskader og baktarmsbetennelse vises som gjennomsnitt ± SEM (n=3).

Histologisk undersøkelse av hjertet (ansvarlig Øystein Evensen NMBU, Veterinærhøgskolen)

To regioner av hjertet, atrium og ventrikel fra de fem eksperimentelle diettgruppene HFHZ, HFLZ, LFHZ, LFLZ og HFΩHZ, ble scoret for eventuell forekomst av betennelse, nekrose, degenerative endringer og andre abnormaliteter, ved mikroskopianalyse av vevsmorfologi (Figur 75). Andre funn, som trombedannelse og fibrose, ble notert kvalitativt. Statistiske analyser, inkludert lineær regresjon, ble utført for å identifisere eventuelle signifikante forskjeller mellom diettgruppene.

De fleste fisk i alle diettgrupper viste lavgradige endringer (score 0–1,5). Høyere score (2–3,5) var mindre hyppig. Ventrikkel viste generelt mer betydelige endringer enn atrier, med score opp til 3,5 i noen tilfeller. Diettgruppene HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ viste ingen signifikante forskjeller fra hverandre i histopatologisk score ($p > 0,05$). HFΩHZ hadde den laveste gjennomsnittlige numeriske scoren, noe som tyder på færre histopatologiske endringer i denne gruppen, muligens grunnet det høyere EPA+DHA-innholdet og lavere n-6/n-3 ratio i dietten. Resultatet indikerer dermed at det høye EPA+DHA-innholdet og den lave n-6/n-3 ratioen i HFΩHZ dietten kan ha bidratt til redusert betennelse og bedre hjertehelse. Selv om det ikke var signifikant, kan det nevnes at det ble funnet flest fisk med den høyeste histopatologisk score på 4,5 i diettgruppen HFLZ.

Tegn på vevsreparasjon, som økt bindevev og regenerering var vanlig funn i alle grupper, men ingen signifikante statistiske forskjeller mellom diettgrupper ble funnet i disse parameterne. Trombe-dannelse ble notert sporadisk, men korrelerte ikke med spesifikke diettgrupper.



Figur 75 Samlet scoring av to regioner av hjertet, atrium og ventrikkel fra de fem eksperimentelle diettgruppene; HFHZ, HFLZ, LFHZ, LFLZ og HFΩ3HZ. De to regionene ble scoret for forekomst av betennelse, nekrose, og degenerative endringer. Fargekoden viser alvorlighetsgrad av histopatologisk score. lavgradige endringer (score 0–1,5). Høyere score (2–4,5).

Mangelen på statistisk signifikante forskjeller i histopatologisk hjertescore indikerer at de ulike diettene hadde relativt begrenset innvirkning på hjertepatologi under de studerte forholdene. Imidlertid antyder den numerisk lavere scoren i diettgruppen HFΩHZ mulig kardioprotektive effekter av en diett rik på omega-3-fettsyrene EPA og DHA og med lav n6/n3 ratio. Men flere faktorer kan ha påvirket hjertescoren.

Eksterne faktorer: Genetiske predisposisjoner, tidlige livsforhold eller miljøstressorer.

Infeksiøse agenser: Selv om histologiske forskjeller ble dokumentert mellom individ, ble det ikke utført molekylær diagnostikk (f.eks. PCR-testing) for å identifisere mulige patogener. Noen endringer, som funn av betennelse i atrier til enkelte fisk, kan tyde på tilstander som kardiomyopatisyndrom (CMS), men dette forblir spekulativt.

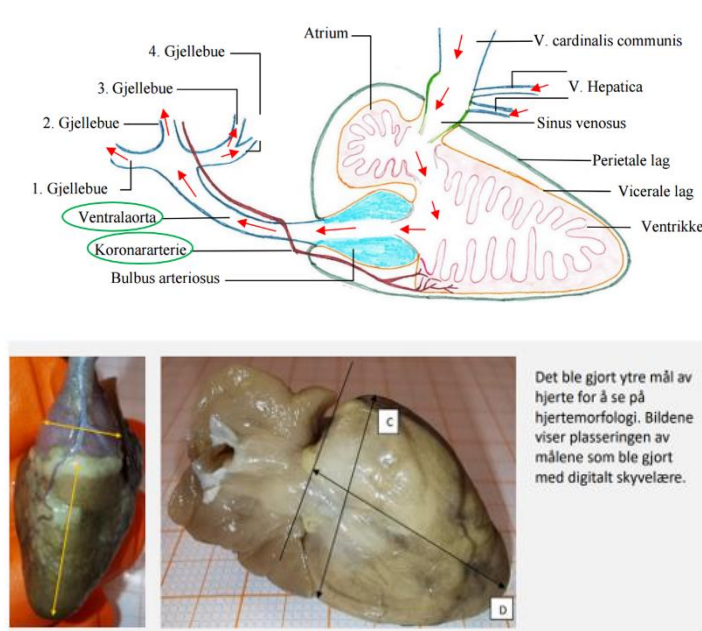
Histologiske begrensninger: Gradering er basert på subjektivitet, og ett hjertesnitt per fisk ble analysert, noe som mulig overser regionale variasjoner i patologi.

Konklusjon: Til tross for mangelen på statistisk signifikante forskjeller mellom diettgruppene, viste den histopatologiske hjertescoren for HFΩHZ-gruppen den numerisk laveste verdien. Dette antyder en mulig fordel ved å gi fôr rikt på omega-3-fettsyrer for å redusere hjertebetennelse. Videre ble det i HFLZ-gruppen observert enkelte individer med høy histopatologisk score. Dette sammenfaller med at denne gruppen også hadde den laveste sluttvekten og en tendens til høyere dødelighet sammenlignet med de andre diettgruppene.

Studier av forekomst og alvorlighetsgrad av hjerteforandringer og arteriosklerose

Resultatene er hentet fra masteroppgave av Kristina. M. Solvang med veileder Tore Seternes ved universitetet i Tromsø

Ved sluttuttaket i juni 2022, ble 60 hjerter med gjellebue (hjerter fra 4 fisk per merd, 12 fisk per diettgruppe) skåret ut og fiksert i 10 % formalin. Etter fiksering ble hjertene separert fra gjellebuene. Deretter ble ventralaorta delt i 3 mindre deler og vevet rundt fjernet, se Figur 76 for oversikt over hjertets oppbygging. Det ble registrert vekt av hjerte, foretatt ytre mål av hjertets form, registrert farge og fettakkumulering på hjerter etter kriterier vist i Tabell 49.



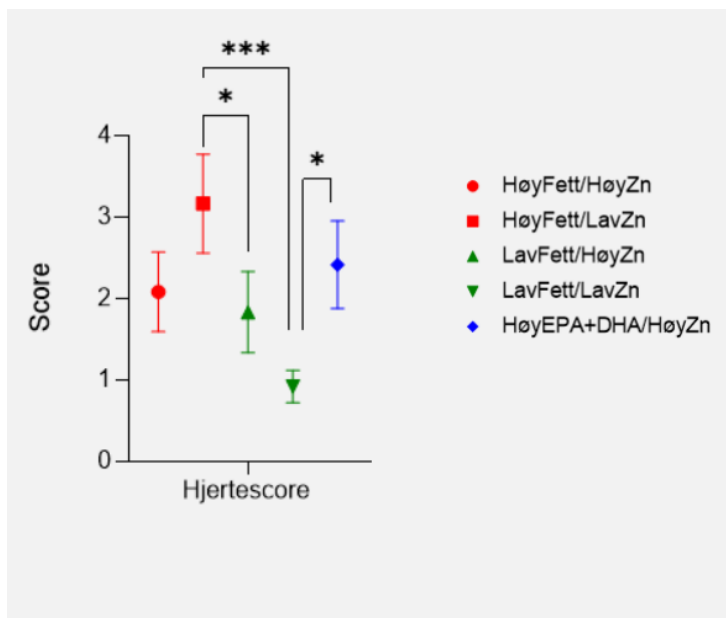
Figur 76 Figur av Kristina Solvang av hjertets oppbygging (Øvre figur). Nedre figur viser plassering av målene som ble tatt for hjertets form. Histologianalyser ble utført på ventralaorta og koronararterien, som markert med grønne sirkler i figuren.. De ytre målene, som vist i nedre figur, ble benyttet til å lage samlet gjennomsnittlig score for normal og grad av unormal form på hjertet scoret og grad av ytre fett på hjertet.

Tabell 49 Kriterium og grad av scoring hjerter

Score	Form	Fettavleiring	Farge
0	Normal form, pæreformet	Lite eller ingen fettdeponi	Ingen avvikende fargenyanser
1	Noe tap av normal form	Fokale fettavleiringer	Noe mørkere farge
2	Ventrikkelen har lite normal fasong	Multifokale fettavleiringer	Tydelig mørk misfarging
3	Rund, og ingen normal form	Flere fettavleiringer	Alvorlig misfarging

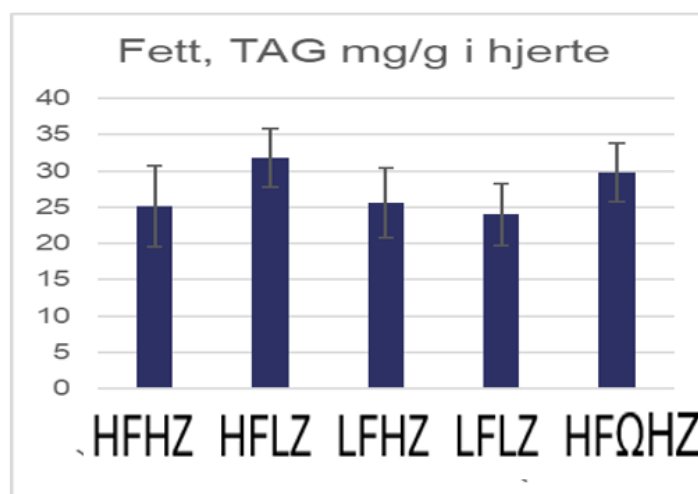
Gjennomsnittsverdier for hjertescoren; ytre mål basert på hjertets form, hjertefarge og grad av fettavleiringer på hjertet i ett graderingssystem fra 0 til 3 er vist i Tabell 49. Score null viser til ingen avvik og score tre viser til alvorlig avvikende hjertemorfologi.

For den totale gjennomsnittlige hjertescoren viste resultatene lavest score for de to lavfettgruppene LFLZ og LFHZ (Figur 77). Det var ingen signifikant forskjell i hjertescore mellom diettgruppene HFHZ og HFΩHZ. Gruppen HFLZ viste tendens til høyere score enn de andre diettgruppene med flest individ med alvorlig avvikende score for hjertemorfologi.



Figur 77 Samlet gjennomsnittlig score for normal og grad av unormal form på hjertet scoret og grad av ytre fett på hjertet, basert på de ytre målene beskrevet i Figur 76.

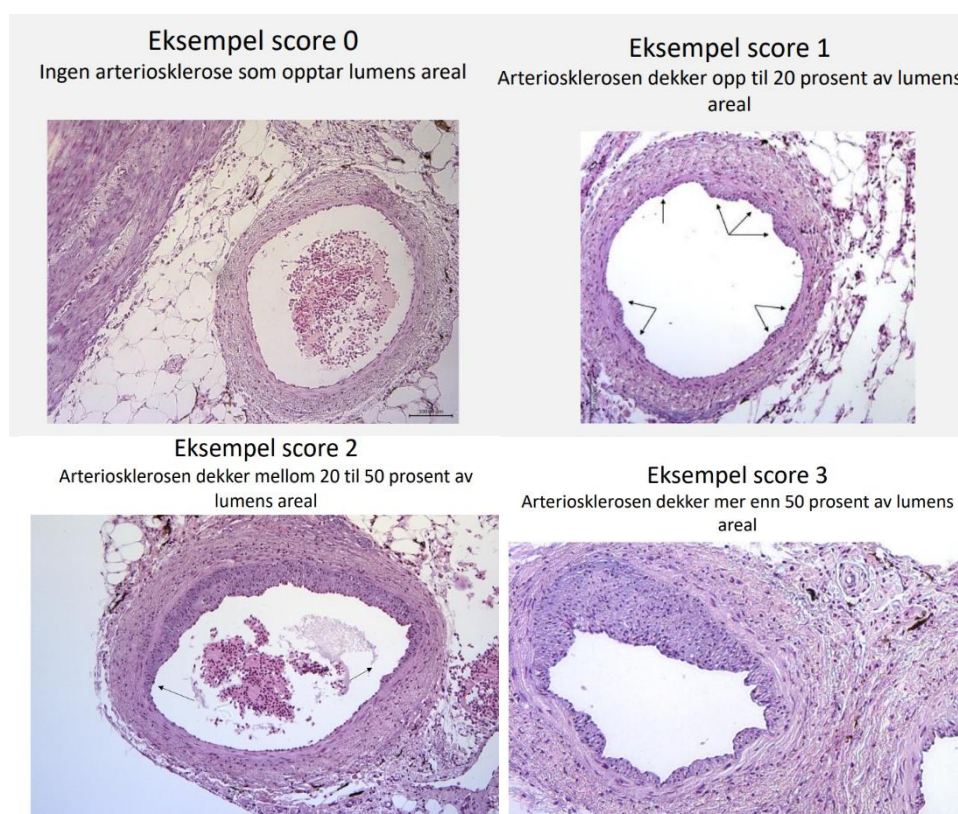
Triacylglycerol (TAG nivå) i hjertet (atrium + ventrikkelen uten bulbus) ble analysert kjemisk som vist i Figur 78. Det var ingen signifikante forskjeller mellom diettgruppene i mengde TAG, men det var en tendens til lavere TAG nivå i de to diettgruppene føret det lave fettinnholdet i dietten.



Figur 78 TAG mg/g i hjertet til laks fra de ulike diettgruppene. Verdiene er vist som gjennomsnittsverdier ± sem.

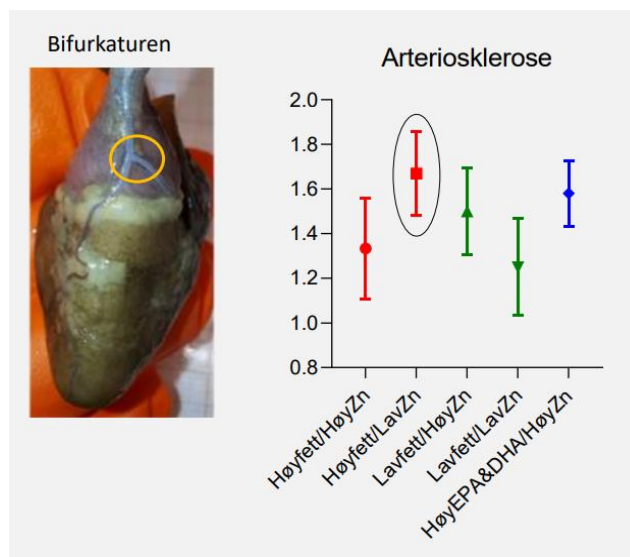
Det ble tatt ut fikserte vevsprøver fra to områder av hjertet, ett fra koronararterien som forsyner det kompakte laget i ventrikkelen med blod og ett fra ventralaorta som forsyner gjellebuene med blod. Det ble laget ca. 80 vertikale snitt fra koronararterien (bifurkaturen) og 10 horisontale snitt av ventralaorta. Histologisk analyse ble utført etter hematoksylin og eosin farging av snittene. Formålet med denne analysen var å kartlegge eventuell forekomst av arteriosklerose.

Arteriosklerose består av neointimal hyperplasi. Hvor glatte muskelceller prolifrerer og går inn i intima gjennom små åpninger/porer eller brudd i den indre elastiske lamina (Farrell et al., 2002. Dette må ikke forveksles med atherosklerose som forekommer hos mennesker, hvor fettavleiringer oppstår på innsiden av arterien og som med tiden forkalkes. Figur 79 viser eksempelbilder av ulike alvorlighetsgrad av arteriosklerose.



Figur 79 Eksempelfigurer fra laks fra forsøket som viser score for arteriosklerose i koronararteriens bifurkatur

Det ble avdekket ulik grad av arteriosklerose hos 57 av 60 individer, noe som ga en forekomst av arteriosklerose på 95 %. Det var ingen signifikant forskjell i forekomst av arteriosklerose mellom diettgruppene. Samtidig indikerer resultatene en tendens til høyere alvorlighetsgrad av arteriosklerose i diettgruppen gitt høy fett diett med lav Zn (HFLZ). Dette er den samme gruppen hvor det ble funnet de fleste individ med høyest histopatologisk score.



Figur 80 Illustrerer graden av arteriosklerose i koronararterie i bifurkaturen hos slakteklars laks. Y-aksen fremstiller en score basert på arteriosklerosens omfang. Resultatene er fremstilt som gjennomsnitt og standardavvik basert på triplikat merdoppsett ($n=3$). $P<0,05$ regnes som signifikante. Desto høyere score desto mer alvorlig er graden av arteriosklerosen.

Det er tidligere vist at arteriosklerose resulterer i en forsnævring i koronararterien som forsyner det ytre kompakte muskellaget i ventrikkelen i hjertet med oksygenrikt blod. Blodtilførselen kan enten bli redusert eller helt forsnævret slik at blodtilførselen stopper totalt opp. (Kryvi & Poppe, 2021). I vår studie ble det funnet mer alvorlig grad av histopatologisk score i ventrikkelen enn i atrier, og den store forekomsten av ulik grad av arteriosklerose i koronararterien kan muligens ha påvirket histopatologisk score i atriet.

Denne tilstanden er tidligere beskrevet hos voksen og kjønnsmoden oppdrettslaks, og tilstanden er ofte mest omfattende hos hurtigvoksende individer (Poppe, 2002; Saunders et al., 1992; Gamperl and Farrell, 2004). Det er også pekt på mekanisk irritasjon på koronarkarets vegg i sammenheng med kraftig utvidelse av bulbus arteriosus som en medvirkende årsak. Forholdene som forårsaker denne tilstanden, er likevel ikke fullstendig kjent (Poppe, 2002).

Resultater fra mineralanalyse av hjertet er vist i Tabell 50. Her var det få signifikante forskjeller, muligens relatert til stor variasjon og få prøver (samleprøver per kar). Mg i bulbus var signifikant høyere med høy n-3 LC-PUFA (HFΩHZ) enn i gruppen som hadde fått tilsvarende fett- og Zn-nivå (HFLZ); imidlertid gjenspeiler dette høyere Mg i fôret for førstnevnte gruppe. Både HFLZ og LFLZ hadde tilsvarende høyt nivå av Mg i bulbus, noe som ga en nesten signifikant interaksjonseffekt ($p=0,057$) mellom Zn og fett. Fe i bulbus var signifikant lavere i HFΩHZ, noe som er potensielt interessant, da denne gruppen hadde det høyeste innholdet av Fe i fôret. Dette kan muligens relateres til nylige funn i gris, der det ble vist at omega-3 beskytter mot oksidativt stress gjennom telomer-bindende protein TRF1 (Ogluszka et al., 2020), mens høye jernnivåer gir oksidativt stress og forkortelse av telomerer.

Tabell 50 Mineralanalyser av hjerter. Analysert på samleprøver per merd (n=3 per diett), gjennomsnitt $\pm$ SD. Hjertet er delt i bulbus, der både makro- og mikromineraler er analysert, og resten av hjertet (utenom bulbus), der kun mikromineraler er analysert.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ	Zn x Fett	p-verdi		
							Zn	Fett	Ω
Mineraler i bulbus, mg/kg ww									
Ca	140±10	147±12	147±21	137±6	143±6	0,31	0,83	0,83	0,64
Na	2867±208	3100±361	3200±361	2867±115	3167±252	0,12	0,77	0,77	0,19
K	1800±100	1800±100	1800±0	1833±58	1767±58	0,72	0,72	0,72	0,64
Mg	103±23	153±49	147±38	109±12	157±23	0,05	0,75	0,99	0,047
P	1233±58	1300±0	1267±58	1300±0	1300±0	0,50	0,07	0,50	0,12
Mn	0,43±0,20	0,34±0,06	0,33±0,02	0,48±0,32	0,27±0,03	0,32	0,78	0,83	0,27
Fe	7,83±1,37	6,77±3,76	6,60±2,40	6,00±1,37	5,47±0,35	0,87	0,57	0,50	0,044
Cu	0,45±0,14	0,43±0,13	0,40±0,17	0,57±0,27	0,55±0,39	0,44	0,51	0,67	0,69
Zn	177±23,1	163±55,1	190±43,6	147±32,1	129±37,8	0,54	0,26	0,94	0,13
Se	0,21±0,01	0,19±0,02	0,20±0,01	0,20±0,02	0,20±0,01	0,43	0,43	1,00	0,49
Mineraler i resten av hjertet ventrikkel + atrie, mg/kg ww									
Mn	0,73±0,07	0,67±0,10	0,68±0,06	0,72±0,07	0,68±0,01	0,31	0,80	0,97	0,30
Fe	38,0±2,0	41,0±2,0	41,0±2,0	38,0±1,0	37,7±5,5	0,02	1,00	1,00	0,93
Cu	3.63±0.31	3,97±0,15	3,60±0,46	3,73±0,55	3,70±0,46	0,67	0,34	0,58	0,84
Zn	33.0±5.3	26,3±3,2	31,0±2,0	28,0±5,6	38,0±3,6	0,48	0,08	0,95	0,25
Se	0,30±0,01	0,32±0,01	0,32±0,03	0,30±0,02	0,31±0,02	0,16	1,00	0,76	0,47

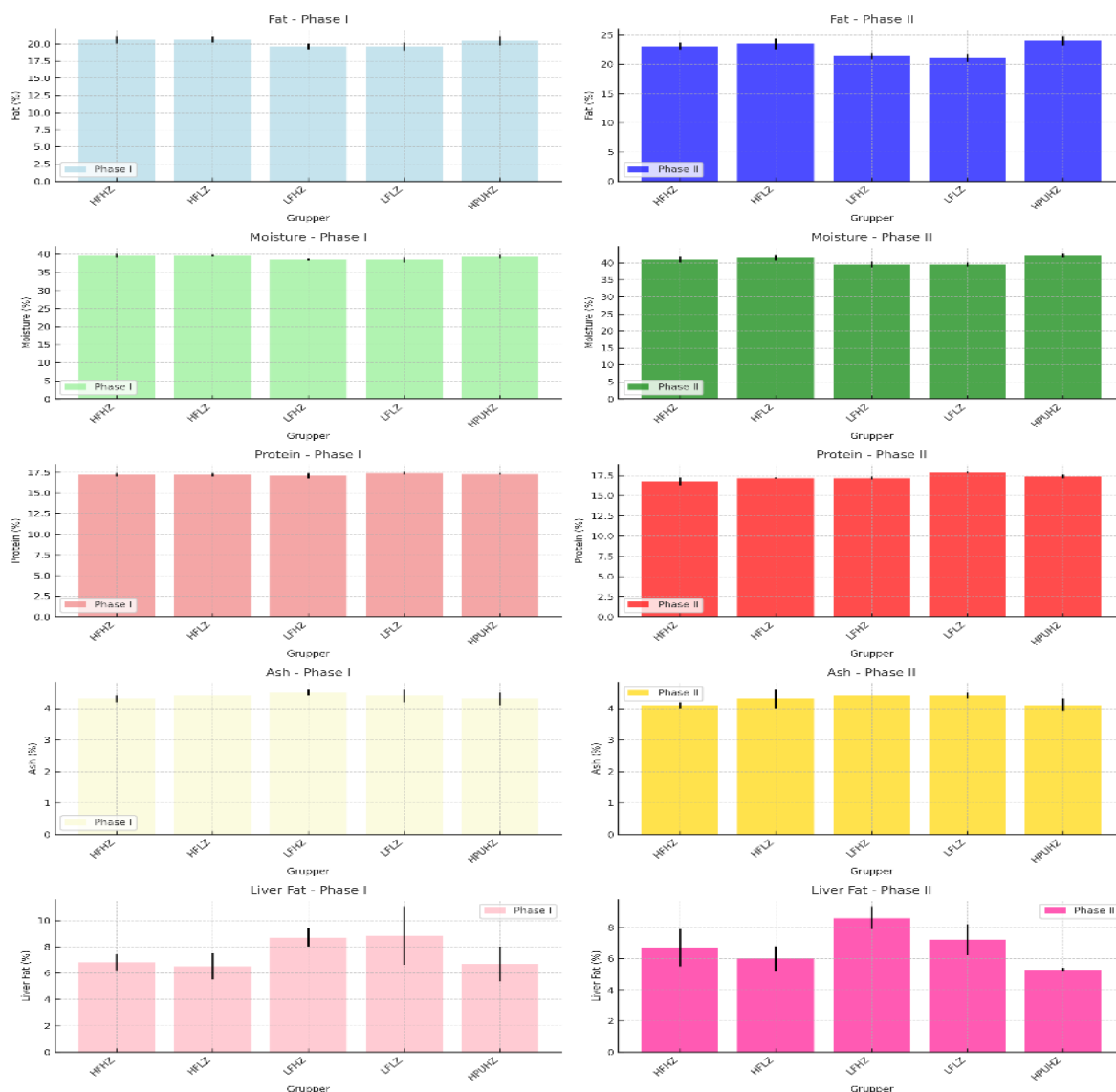
5.7.4 Oppsummering hjertehelse

Resultatene avdekket varierende alvorlighetsgrad av innsnevring i koronararteriens forgreningspunkt hos 95 % av forsøksfisken, noe som potensielt kan påvirke blodtilførselen til hjertekammeret (ventrikkel). To hjertereioner, forkammeret (atrium) og hjertekammeret (ventrikkel), ble også vurdert for eventuell forekomst av betennelse, vevsdød (nekrose), degenerative endringer og andre avvik. Funnene viste at ventrikkelpå prøvene generelt hadde mer betydelige endringer sammenlignet med atriene, med histopatologiskscore opp til 3,5 i enkelte tilfeller. Hvorvidt endringene i ventrikkel er direkte knyttet til redusert blodtilførsel grunnet arteriosklerose i koronararterien, kan ikke fastslås med sikkerhet basert på disse resultatene alene.

Til tross for få signifikante forskjeller mellom diettgruppene når det gjelder hjertescore, utmerket én gruppe seg negativt i de fleste vurderinger, gruppen med høyt fettinnhold og lavt sinkinnhold i fôret (HFLZ). På den annen side viste gruppen som fikk ekstra EPA+DHA i en høyfettdiett, en tendens til forbedret histopatologisk hjertescore for betennelse.

Kroppssammensetning (ansvarlig Nofima og HI)

Sammensetningen av helfisk (fett, protein, tørrstoff, aske) og fett i lever, både på midt- og sluttuttak er vist i Figur 81. Fettnivå i helfisk var høyere i HF enn LF-gruppene på begge uttak, mens HFΩHZ-gruppen var lik som HF-gruppene. Dermed fulgte fettnivå i helfisk fettnivå i fôrene, uten noen effekt av Zn eller fettsyresammensetning i fôret. Endringer i tørrstoff fulgte endringer i fett, som er vanlig. For aske lå nivået signifikant høyere i LF-gruppene på sluttuttaket, med tilsvarende tendens på midtuttak. For protein i helfisk var det ingen effekter på mellomuttaket, men på sluttuttaket var proteinnivå i helfisk påvirket både av Zn og fettnivå i fôr, med tilsynelatende positiv effekt av LF og LZ. Fett i lever var signifikant påvirket av fett i fôr på begge uttak, med høyere leverfett i LF-gruppene.



	P value			
	Zn x FAT	ZN	Fat	Ω
Midtuttak:				
Fett i helfisk	0,94	0,95	0,04	0,51
% vann	0,98	0,97	0,00	0,77
Protein	0,28	0,28	0,77	0,50
Aske	0,05	0,83	0,06	0,93
Fett i lever	0,84	0,87	0,02	0,90
Sluttuttak:				
Fett i helfisk	0,34	0,46	0,00	0,33
% vann	0,57	0,50	0,00	0,14
Protein	0,55	0,01	0,01	0,11
Aske	0,53	0,30	0,05	0,97
Fett i lever	0,52	0,08	0,02	0,10

Figur 81 Kroppssammensetning og leverfett i laks på midt- (fase I, lyse figurer til venstre) og sluttuttak (fase II, figurer til høyre). Tabellen under viser p-verdiene for toveis ANOVA med Zn- og fettinnhold i fôr som de to variablene (3 første p-verdier), samt sammenligning av HFQHZgruppen med HF1Z (kolonne « Ω »).

Tabell 51-Tabell 54 viser fettsyresammensetningen av helkropp i periode I og periode II, både som prosent av totale fettsyrer og i mg/g. Fettsyresammensetningen av helkropp gjenspeilet i stor grad fettsyresammensetningen av fôret. Det var ingen signifikant forskjeller i nivåene av EPA+ DHA og sum av mettede fettsyrer i helkropp mellom diettgruppene HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ hverken i periode I eller periode II. Det var en tendens til lavere nivåer av EPA+ DHA i mg/g i LF gruppene, mens i prosent av totale fettsyrer var det ingen forskjell. Kun gruppen fôret høyere diettnivåer av EPA+DHA HFΩHZ, hadde høyere nivåer av disse fettsyrene i helkropp.

Tabell 51 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i helkropp til atlantisk laks fôret med de eksperimentelle diettene i 3 måneder (Periode 1; oktober 2021 – midten av januar 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M. med kar som statistisk enhet ($n = 3$, der hver prøve fra hver merd representerer en sammenslåing av fem fisk). Data ble analysert ved hjelp av enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukeys test. signifikant forskjell ($P < 0,05$).

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ
14:0	1,9 $\pm$ 0,04 ^b	1,9 $\pm$ 0,01 ^b	1,9 $\pm$ 0,01 ^b	2,0 $\pm$ 0,10 ^{ab}	2,2 $\pm$ 0,03 ^a
16:0	9,7 $\pm$ 0,07 ^b	9,7 $\pm$ 0,11 ^b	9,8 $\pm$ 0,08 ^b	10,1 $\pm$ 0,14 ^b	10,6 $\pm$ 0,04 ^a
18:0	2,6 $\pm$ 0,01	2,6 $\pm$ 0,02	2,6 $\pm$ 0,07	2,7 $\pm$ 0,07	2,5 $\pm$ 0,01
20:0	0,3 $\pm$ 0,00 ^a	0,3 $\pm$ 0,01 ^{ab}	0,3 $\pm$ 0,00 ^{ab}	0,3 $\pm$ 0,00 ^a	0,3 $\pm$ 0,00 ^b
Σ SFA ¹	14,8 $\pm$ 0,12 ^b	14,9 $\pm$ 0,10 ^b	15,0 $\pm$ 0,03 ^b	15,4 $\pm$ 0,31 ^{ab}	16,0 $\pm$ 0,06 ^a
18:1 n-9	38,8 $\pm$ 0,34 ^a	38,6 $\pm$ 0,06 ^a	38,7 $\pm$ 0,14 ^a	37,9 $\pm$ 0,73 ^a	36,2 $\pm$ 0,04 ^b
18:1 n-7	3,0 $\pm$ 0,02	3,0 $\pm$ 0,03	3,0 $\pm$ 0,01	3,0 $\pm$ 0,06	2,9 $\pm$ 0,01
20:1 n-11	1,0 $\pm$ 0,01 ^b	1,0 $\pm$ 0,01 ^b	0,9 $\pm$ 0,00 ^b	1,0 $\pm$ 0,01 ^b	1,1 $\pm$ 0,00 ^a
22:1 n-7	2,7 $\pm$ 0,03 ^b	2,7 $\pm$ 0,02 ^b	2,7 $\pm$ 0,02 ^b	2,8 $\pm$ 0,06 ^b	3,3 $\pm$ 0,02 ^a
22:1 n-11	0,5 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,01
Σ MUFA ²	46,7 $\pm$ 0,28 ^a	46,4 $\pm$ 0,05 ^a	46,4 $\pm$ 0,12 ^a	45,8 $\pm$ 0,60 ^{ab}	44,7 $\pm$ 0,10 ^b
18:2 n-6	14,2 $\pm$ 0,07 ^a	14,0 $\pm$ 0,05 ^a	14,2 $\pm$ 0,10 ^a	13,7 $\pm$ 0,36 ^{ab}	12,9 $\pm$ 0,08 ^b
20:2 n-6	1,1 $\pm$ 0,01 ^{ab}	1,1 $\pm$ 0,03 ^{ab}	1,1 $\pm$ 0,01 ^a	1,1 $\pm$ 0,05 ^{ab}	1,0 $\pm$ 0,01 ^b
20:4 n-6	0,4 $\pm$ 0,00	0,5 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,00	0,4 $\pm$ 0,01	0,4 $\pm$ 0,01
Σ N-6 ³	16,0 $\pm$ 0,08 ^a	15,8 $\pm$ 0,01 ^a	16,0 $\pm$ 0,07 ^a	15,5 $\pm$ 0,38 ^a	14,5 $\pm$ 0,05 ^b
18:3 n-3	5,3 $\pm$ 0,03 ^a	5,3 $\pm$ 0,02 ^a	5,3 $\pm$ 0,03 ^a	5,3 $\pm$ 0,04 ^a	5,0 $\pm$ 0,03 ^b
20:4 n-3	3,3 $\pm$ 0,01	3,3 $\pm$ 0,02	3,3 $\pm$ 0,03	3,3 $\pm$ 0,01	3,4 $\pm$ 0,00
20:5 n-3	2,8 $\pm$ 0,06 ^b	2,8 $\pm$ 0,03 ^b	2,7 $\pm$ 0,03 ^b	3,0 $\pm$ 0,22 ^{ab}	3,3 $\pm$ 0,03 ^a
22:5 n-3	1,1 $\pm$ 0,03	1,2 $\pm$ 0,01	1,2 $\pm$ 0,04	1,3 $\pm$ 0,11	1,3 $\pm$ 0,02
22:6 n-3	4,9 $\pm$ 0,09 ^b	5,1 $\pm$ 0,05 ^b	4,9 $\pm$ 0,08 ^b	5,0 $\pm$ 0,03 ^b	6,2 $\pm$ 0,05 ^a
Σ N-3 ⁴	17,6 $\pm$ 0,19 ^b	17,9 $\pm$ 0,05 ^b	17,5 $\pm$ 0,12 ^b	18,0 $\pm$ 0,39 ^b	19,4 $\pm$ 0,06 ^a
Σ PUFA ⁵	33,6 $\pm$ 0,12 ^{ab}	33,7 $\pm$ 0,05 ^{ab}	33,6 $\pm$ 0,05 ^{ab}	33,5 $\pm$ 0,06 ^b	33,9 $\pm$ 0,10 ^a
EPA+DHA	7,7 $\pm$ 0,14 ^b	7,9 $\pm$ 0,03 ^b	7,6 $\pm$ 0,09 ^b	8,0 $\pm$ 0,25 ^b	9,5 $\pm$ 0,04 ^a

¹Inkluderer 15:0, 17:0.

² Inkluderer 14:1n-5, 16:1T, 16:1n-7, 17:1n-7, 18:1n-9T, 20:1n-9, 24:1n-9.

³ Inkluderer 20:3n-6.

⁴ Inkluderer 20:3n-3.

⁵Inkluderer 20:3n-6, 20:3n-3.

Tabell 52 Fettsyresammensetning (mg/g) i helkropp til atlantisk laks føret med de eksperimentelle diettene i 3 måneder (Periode 1; oktober 2021 – midten av januar 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M. med kar som statistisk enhet ($n = 3$, der hver prøve fra hver merd representerer en sammenslåing av fem fisk). Data ble analysert ved hjelp av enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukeys test. signifikant forskjell ($P < 0,05$).

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	4,0 $\pm$ 0,05 ^{ab}	4,0 $\pm$ 0,09 ^{ab}	3,5 $\pm$ 0,21 ^b	3,7 $\pm$ 0,03 ^b	4,3 $\pm$ 0,14 ^a
16:0	20,8 $\pm$ 0,58	20,6 $\pm$ 0,53	18,4 $\pm$ 1,10	19,0 $\pm$ 0,80	20,8 $\pm$ 0,93
18:0	5,5 $\pm$ 0,15	5,5 $\pm$ 0,06	4,9 $\pm$ 0,28	5,0 $\pm$ 0,15	5,0 $\pm$ 0,24
20:0	0,7 $\pm$ 0,03	0,7 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,04	0,6 $\pm$ 0,03
Σ SFA ¹	31,8 $\pm$ 0,81	31,7 $\pm$ 0,70	28,2 $\pm$ 1,63	29,1 $\pm$ 1,05	31,5 $\pm$ 1,38
18:1 n-9	83,5 $\pm$ 3,23	82,3 $\pm$ 1,17	72,6 $\pm$ 4,14	71,9 $\pm$ 5,11	71,0 $\pm$ 3,17
18:1 n-7	6,4 $\pm$ 0,15	6,3 $\pm$ 0,12	5,6 $\pm$ 0,36	5,7 $\pm$ 0,19	5,8 $\pm$ 0,23
20:1 n-11	2,1 $\pm$ 0,08 ^{ab}	2,0 $\pm$ 0,04 ^{ab}	1,8 $\pm$ 0,11 ^b	1,8 $\pm$ 0,08 ^{ab}	2,2 $\pm$ 0,10 ^a
22:1 n-7	5,9 $\pm$ 0,14 ^{ab}	5,8 $\pm$ 0,13 ^{ab}	5,1 $\pm$ 0,33 ^b	5,3 $\pm$ 0,18 ^b	6,5 $\pm$ 0,31 ^a
22:1 n-11	1,2 $\pm$ 0,06	1,2 $\pm$ 0,03	1,0 $\pm$ 0,08	0,9 $\pm$ 0,11	1,0 $\pm$ 0,05
Σ MUFA ²	100,3 $\pm$ 3,63	98,8 $\pm$ 1,46	87,2 $\pm$ 5,09	86,8 $\pm$ 5,61	87,7 $\pm$ 4,00
18:2 n-6	30,5 $\pm$ 1,03	29,9 $\pm$ 0,53	26,6 $\pm$ 1,56	26,0 $\pm$ 2,02	25,3 $\pm$ 1,17
20:2 n-6	2,4 $\pm$ 0,09	2,4 $\pm$ 0,05	2,2 $\pm$ 0,13	2,1 $\pm$ 0,20	2,0 $\pm$ 0,09
20:4 n-6	0,9 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,01	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,02
Σ N-6 ³	34,3 $\pm$ 1,16	33,8 $\pm$ 0,53	30,1 $\pm$ 1,77	29,4 $\pm$ 2,24	28,5 $\pm$ 1,28
18:3 n-3	11,4 $\pm$ 0,29	11,3 $\pm$ 0,20	9,9 $\pm$ 0,59	10,0 $\pm$ 0,49	9,8 $\pm$ 0,38
20:4 n-3	7,0 $\pm$ 0,24	7,1 $\pm$ 0,12	6,2 $\pm$ 0,38	6,2 $\pm$ 0,35	6,6 $\pm$ 0,29
20:5 n-3	5,9 $\pm$ 0,09 ^{ab}	6,0 $\pm$ 0,15 ^{ab}	5,2 $\pm$ 0,36 ^b	5,7 $\pm$ 0,11 ^{ab}	6,5 $\pm$ 0,23 ^a
22:5 n-3	2,5 $\pm$ 0,03	2,6 $\pm$ 0,06	2,2 $\pm$ 0,18	2,4 $\pm$ 0,08	2,6 $\pm$ 0,08
22:6 n-3	10,5 $\pm$ 0,15 ^{ab}	10,8 $\pm$ 0,15 ^{ab}	9,2 $\pm$ 0,52 ^b	9,4 $\pm$ 0,44 ^b	12,2 $\pm$ 0,61 ^a
Σ N-3 ⁴	37,8 $\pm$ 0,76	38,1 $\pm$ 0,64	32,9 $\pm$ 2,02	34,0 $\pm$ 1,15	38,0 $\pm$ 1,61
Σ PUFA ⁵	72,1 $\pm$ 1,92	71,8 $\pm$ 1,17	63,0 $\pm$ 3,78	63,4 $\pm$ 3,37	66,5 $\pm$ 2,89
EPA+DHA	16,5 $\pm$ 0,24 ^{ab}	16,8 $\pm$ 0,27 ^{ab}	14,3 $\pm$ 0,88 ^b	15,1 $\pm$ 0,36 ^b	18,7 $\pm$ 0,84 ^a

¹Inkluderer 15:0, 17:0.

²Inkluderer 14:1n-5, 16:1T, 16:1n-7, 17:1n-7, 18:1n-9T, 20:1n-9, 24:1n-9.

³Inkluderer 20:3n-6.

⁴Inkluderer 20:3n-3.

⁵Inkluderer 20:3n-6, 20:3n-3.

Tabell 53 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i helkropp til atlantisk laks føret med de eksperimentelle diettene i 8 måneder (slutten av Periode 2; juni 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M. med kar som statistisk enhet ($n = 3$). Data ble analysert ved hjelp av enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukeys test signifikant forskjell ($P < 0,05$).

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	$1,8 \pm 0,01^b$	$1,8 \pm 0,02^b$	$1,9 \pm 0,02^b$	$1,8 \pm 0,02^b$	$2,5 \pm 0,04^a$
16:0	$9,3 \pm 0,07^c$	$9,2 \pm 0,08^c$	$9,6 \pm 0,06^b$	$9,6 \pm 0,05^b$	$10,6 \pm 0,04^a$
18:0	$2,5 \pm 0,01^{bc}$	$2,6 \pm 0,02^{bc}$	$2,7 \pm 0,03^a$	$2,6 \pm 0,02^{ab}$	$2,5 \pm 0,03^c$
20:0	$0,3 \pm 0,01^a$	$0,3 \pm 0,01^a$	$0,3 \pm 0,00^a$	$0,3 \pm 0,00^a$	$0,3 \pm 0,00^b$
Σ SFA ¹	$14,5 \pm 0,09^c$	$14,5 \pm 0,12^c$	$15,2 \pm 0,06^b$	$15,0 \pm 0,09^b$	$16,4 \pm 0,07^a$
16:1 n-7	$2,2 \pm 0,01^b$	$2,2 \pm 0,01^b$	$2,3 \pm 0,04^b$	$2,2 \pm 0,02^b$	$3,2 \pm 0,06^a$
18:1 n-9	$40,1 \pm 0,03^{ab}$	$40,3 \pm 0,11^a$	$39,7 \pm 0,06^b$	$39,8 \pm 0,10^b$	$35,0 \pm 0,13^c$
18:1 n-7	$3,1 \pm 0,03$	$3,2 \pm 0,05$	$3,2 \pm 0,03$	$3,1 \pm 0,02$	$3,3 \pm 0,04$
20:1 n-9	$4,0 \pm 0,01^b$	$4,0 \pm 0,01^b$	$4,0 \pm 0,04^b$	$4,0 \pm 0,02^b$	$4,3 \pm 0,02^a$
22:1 n-11	$1,6 \pm 0,03^b$	$1,6 \pm 0,03^b$	$1,5 \pm 0,03^b$	$1,5 \pm 0,02^b$	$2,3 \pm 0,05^a$
22:1 n-9	$1,3 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,01$	$1,1 \pm 0,19$	$1,2 \pm 0,18$
Σ MUFA ²	$53,0 \pm 0,06^{ab}$	$53,3 \pm 0,06^a$	$52,6 \pm 0,02^{bc}$	$52,5 \pm 0,15^c$	$50,3 \pm 0,11^d$
18:2 n-6	$15,2 \pm 0,01^a$	$14,9 \pm 0,09^b$	$14,8 \pm 0,02^b$	$14,8 \pm 0,08^b$	$12,3 \pm 0,07^c$
20:2 n-6	$1,2 \pm 0,02^a$	$1,2 \pm 0,03^a$	$1,3 \pm 0,02^a$	$1,3 \pm 0,02^a$	$1,0 \pm 0,01^b$
20:4 n-6	$0,2 \pm 0,00^b$	$0,3 \pm 0,02^b$	$0,3 \pm 0,00^b$	$0,3 \pm 0,01^b$	$0,4 \pm 0,02^a$
Σ N-6 ³	$17,1 \pm 0,03^a$	$16,8 \pm 0,11^a$	$16,8 \pm 0,04^a$	$16,8 \pm 0,09^a$	$14,0 \pm 0,07^b$
18:3 n-3	$4,8 \pm 0,06^a$	$4,8 \pm 0,02^a$	$4,7 \pm 0,04^a$	$4,8 \pm 0,04^a$	$4,1 \pm 0,05^b$
20:5 n-3	$2,8 \pm 0,04^b$	$2,8 \pm 0,02^b$	$2,9 \pm 0,04^b$	$2,9 \pm 0,03^b$	$4,4 \pm 0,07^a$
22:5 n-3	$1,3 \pm 0,02^b$	$1,3 \pm 0,01^b$	$1,3 \pm 0,01^b$	$1,3 \pm 0,04^b$	$1,9 \pm 0,01^a$
22:6 n-3	$4,2 \pm 0,07^b$	$4,3 \pm 0,02^b$	$4,1 \pm 0,08^b$	$4,2 \pm 0,07^b$	$5,9 \pm 0,08^a$
Σ N-3 ⁴	$13,6 \pm 0,08^b$	$13,6 \pm 0,02^b$	$13,5 \pm 0,06^b$	$13,6 \pm 0,06^b$	$16,7 \pm 0,05^a$
Σ PUFA ⁵	$30,7 \pm 0,05$	$30,4 \pm 0,13$	$30,3 \pm 0,06$	$30,4 \pm 0,09$	$30,8 \pm 0,12$
EPA+DHA	$7,1 \pm 0,05^b$	$7,1 \pm 0,03^b$	$7,0 \pm 0,03^b$	$7,2 \pm 0,05^b$	$10,3 \pm 0,01^a$

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 22:0.

²Inkluderer 14:1n-5, 17:1n-7, 19:1, 24:1n-9.

³Inkluderer 18:2n-6TT, 18:3n-6, 20:3n-6.

⁴Inkluderer 20:3n-3.

⁵Inkluderer 18:2n-6TT, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:3n-3.

Tabell 54 Fettsyresammensetning (mg/g) i helkropp til atlantisk laks føret med de eksperimentelle diettene i 8 måneder (slutten av Periode 2; juni 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M med kar som statistisk enhet ($n = 3$). Data ble analysert ved hjelp av enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukeys test signifikant forskjell ($P < 0,05$).

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	3,9 $\pm$ 0,06 ^b	3,6 $\pm$ 0,06 ^b	3,7 $\pm$ 0,22 ^b	3,5 $\pm$ 0,14 ^b	5,6 $\pm$ 0,18 ^a
16:0	20,2 $\pm$ 0,36 ^b	18,6 $\pm$ 0,36 ^b	19,1 $\pm$ 1,12 ^b	18,3 $\pm$ 0,59 ^b	24,0 $\pm$ 0,51 ^a
18:0	5,5 $\pm$ 0,09	5,2 $\pm$ 0,15	5,4 $\pm$ 0,33	5,0 $\pm$ 0,10	5,7 $\pm$ 0,05
20:0	0,7 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,03	0,6 $\pm$ 0,02	0,6 $\pm$ 0,01
Σ SFA ¹	31,5 $\pm$ 0,53 ^b	29,1 $\pm$ 0,58 ^b	30,1 $\pm$ 1,72 ^b	28,8 $\pm$ 0,95 ^b	37,3 $\pm$ 0,79 ^a
16:1 n-7	4,8 $\pm$ 0,08 ^b	4,4 $\pm$ 0,10 ^b	4,5 $\pm$ 0,28 ^b	4,3 $\pm$ 0,15 ^b	7,2 $\pm$ 0,26 ^a
18:1 n-9	87,1 $\pm$ 0,95	81,0 $\pm$ 2,44	78,8 $\pm$ 4,31	76,2 $\pm$ 2,07	79,6 $\pm$ 1,50
18:1 n-7	6,8 $\pm$ 0,10 ^{ab}	6,4 $\pm$ 0,19 ^{ab}	6,3 $\pm$ 0,39 ^b	6,0 $\pm$ 0,21 ^b	7,4 $\pm$ 0,17 ^a
20:1 n-9	8,6 $\pm$ 0,07 ^b	8,1 $\pm$ 0,21 ^b	7,9 $\pm$ 0,35 ^b	7,6 $\pm$ 0,24 ^b	9,9 $\pm$ 0,15 ^a
22:1 n-11	3,5 $\pm$ 0,04 ^b	3,2 $\pm$ 0,08 ^{bc}	3,0 $\pm$ 0,10 ^c	2,9 $\pm$ 0,09 ^c	5,3 $\pm$ 0,09 ^a
22:1 n-9	2,8 $\pm$ 0,06	2,6 $\pm$ 0,04	2,6 $\pm$ 0,13	2,1 $\pm$ 0,40	2,7 $\pm$ 0,44
Σ MUFA ²	115,3 $\pm$ 1,17	107,2 $\pm$ 3,07	104,4 $\pm$ 5,60	100,5 $\pm$ 3,10	114,3 $\pm$ 2,38
18:2 n-6	33,0 $\pm$ 0,35 ^a	29,9 $\pm$ 0,96 ^{ab}	29,3 $\pm$ 1,57 ^{ab}	28,4 $\pm$ 0,72 ^b	27,8 $\pm$ 0,55 ^b
20:2 n-6	2,6 $\pm$ 0,02	2,4 $\pm$ 0,12	2,5 $\pm$ 0,11	2,4 $\pm$ 0,08	2,2 $\pm$ 0,02
20:4 n-6	0,5 $\pm$ 0,01 ^b	0,5 $\pm$ 0,04 ^b	0,5 $\pm$ 0,03 ^b	0,5 $\pm$ 0,03 ^b	0,8 $\pm$ 0,06 ^a
Σ N-6 ³	37,2 $\pm$ 0,43 ^a	33,7 $\pm$ 1,12 ^{ab}	33,4 $\pm$ 1,77 ^{ab}	32,2 $\pm$ 0,80 ^b	31,8 $\pm$ 0,64 ^b
18:3 n-3	10,5 $\pm$ 0,08 ^a	9,7 $\pm$ 0,28 ^{ab}	9,4 $\pm$ 0,46 ^{ab}	9,1 $\pm$ 0,25 ^b	9,4 $\pm$ 0,19 ^{ab}
20:5 n-3	6,2 $\pm$ 0,15 ^b	5,7 $\pm$ 0,18 ^b	5,8 $\pm$ 0,39 ^b	5,6 $\pm$ 0,15 ^b	10,1 $\pm$ 0,35 ^a
22:5 n-3	2,7 $\pm$ 0,06 ^b	2,5 $\pm$ 0,08 ^b	2,6 $\pm$ 0,15 ^b	2,5 $\pm$ 0,10 ^b	4,4 $\pm$ 0,10 ^a
22:6 n-3	9,2 $\pm$ 0,16 ^b	8,5 $\pm$ 0,20 ^{bc}	8,2 $\pm$ 0,31 ^c	8,1 $\pm$ 0,23 ^c	13,3 $\pm$ 0,12 ^a
Σ N-3 ⁴	29,5 $\pm$ 0,26 ^b	27,3 $\pm$ 0,78 ^b	26,8 $\pm$ 1,33 ^b	26,1 $\pm$ 0,69 ^b	38,0 $\pm$ 0,68 ^a
Σ PUFA ⁵	66,7 $\pm$ 0,66 ^{ab}	61,0 $\pm$ 1,90 ^b	60,2 $\pm$ 3,10 ^b	58,3 $\pm$ 1,48 ^b	69,9 $\pm$ 1,32 ^a
EPA+DHA	15,4 $\pm$ 0,21 ^b	14,2 $\pm$ 0,38 ^b	14,0 $\pm$ 0,69 ^b	13,7 $\pm$ 0,34 ^b	23,4 $\pm$ 0,42 ^a

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 22:0.

²Inkluderer 14:1n-5, 17:1n-7, 19:1, 24:1n-9.

³Inkluderer 18:2n-6TT, 18:3n-6, 20:3n-6.

⁴Inkluderer 20:3n-3.

⁵Inkluderer 18:2n-6TT, 18:3n-6, 20:3n-6, 20:3n-3.

Tabell 55 viser fettsyresammensetningen av muskel i periode II, som mg fetttsyre/g vev. Fettsyresammensetningen av muskel gjenspeilet i stor grad fettsyresammensetningen av føret. Det var ingen signifikant forskjeller i nivåene av EPA+ DHA og sum av mettede fettsyrer i helkropp mellom diettgruppene HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ ved sluttuttaket. Kun gruppen føret høyere diettnivåer av EPA+DHA, HFQHZ, hadde høyere nivå av disse fettsyrene i muskel. Figur 82 viser % EPA+DHA av totale fettsyrer i muskel ved sluttuttaket, med ca. 6,5 % EPA + DHA i alle diettgrupper bortsett fra HFQHZ som hadde ca. 9 % EPA+DHA.

Tabell 55 Fettsyresammensetning (mg/g) i Norsk Kvalitetssnitt (NKS) muskel til atlantisk laks fôret med de eksperimentelle diettene i 8 måneder (slutten av Periode 2; juni 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M med kar som statistisk enhet ($n = 3$). Data ble analysert ved hjelp av enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukeys test signifikant forskjell ($P < 0,05$).

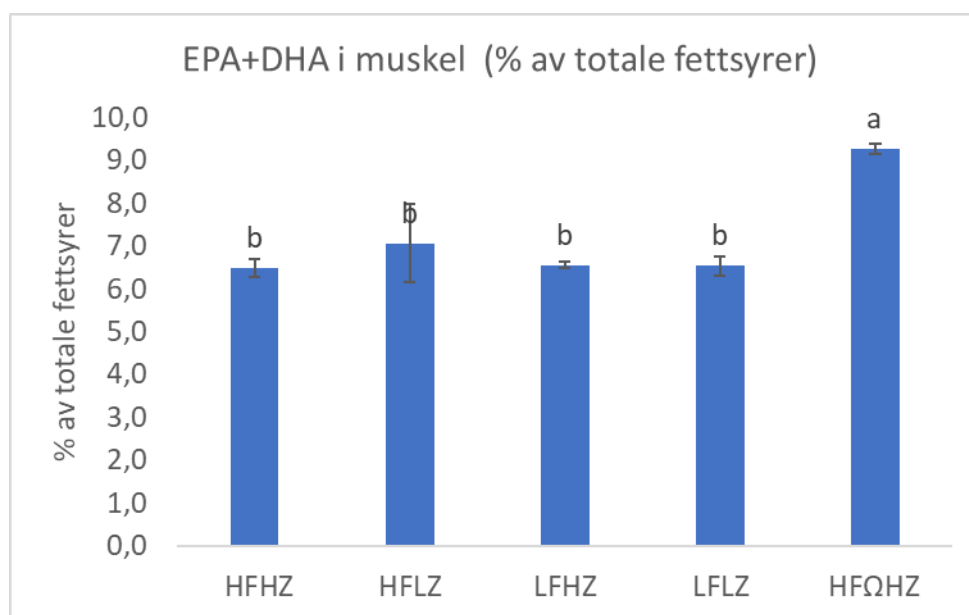
	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ	P verdi
Fett%	18,7 $\pm$ 0,57	18,4 $\pm$ 0,74	19,0 $\pm$ 0,41	16,9 $\pm$ 0,04	19,7 $\pm$ 0,09	
014:0	2,5 $\pm$ 0,09	3,1 $\pm$ 0,31	2,6 $\pm$ 0,05	2,5 $\pm$ 0,09	3,7 $\pm$ 0,09	0,02
16:0	14,0 $\pm$ 0,54	15,8 $\pm$ 0,65	14,4 $\pm$ 0,22	13,6 $\pm$ 0,48	17,0 $\pm$ 0,53	0,001
18:0	3,9 $\pm$ 0,20	4,4 $\pm$ 0,042	4,1 $\pm$ 0,08	4,2 $\pm$ 0,051	4,3 $\pm$ 0,24	0,004
20:0	0,5 $\pm$ 0,05	0,5 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,02	0,5 $\pm$ 0,03	0,88
Σ SFA ¹	21,75 $\pm$ 0,94	24,4 $\pm$ 1,00	22,3 $\pm$ 0,38	21,5 $\pm$ 1,11	25,9 $\pm$ 0,99	0,86
16:1 n-7	3,0 $\pm$ 0,09	3,2 $\pm$ 0,16	3,2 $\pm$ 0,04	2,9 $\pm$ 0,01	4,6 $\pm$ 0,06	0,03
18:1 n-9	57,8 $\pm$ 1,37	55,1 $\pm$ 4,66	58,6 $\pm$ 1,00	52,6 $\pm$ 0,57	54,3 $\pm$ 0,94	<.0001
18:1 n-7	4,1 $\pm$ 0,10	4,0 $\pm$ 0,26	4,2 $\pm$ 0,07	4,2 $\pm$ 0,03	5,1 $\pm$ 0,06	0,37
20:1 n-9	4,6 $\pm$ 0,11	5,5 $\pm$ 0,76	4,7 $\pm$ 0,08	4,2 $\pm$ 0,03	5,1 $\pm$ 0,06	0,03
22:1 n-11	2,4 $\pm$ 0,05	3,9 $\pm$ 1,37	2,3 $\pm$ 0,07	2,2 $\pm$ 0,01	3,6 $\pm$ 0,05	0,17
22:1 n-9	0,8 $\pm$ 0,03	0,9 $\pm$ 0,04	0,8 $\pm$ 0,03	0,8 $\pm$ 0,01	0,9 $\pm$ 0,01	0,22
Σ MUFA ²	76,1 $\pm$ 1,88	76,2 $\pm$ 3,06	76,9 $\pm$ 1,29	69,5 $\pm$ 0,67	77,3 $\pm$ 1,04	0,03
18:2 n-6	21,5 $\pm$ 0,49	19,7 $\pm$ 1,80	21,5 $\pm$ 0,39	19,2 $\pm$ 0,26	18,9 $\pm$ 0,40	0,06
20:2 n-6	1,8 $\pm$ 0,03	1,7 $\pm$ 0,10	1,9 $\pm$ 0,03	1,6 $\pm$ 0,01	1,5 $\pm$ 0,02	0,16
20:3 n-6	0,4 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,08	0,5 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01	0,004
20:4 n-6	0,4 $\pm$ 0,53	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,00	0,3 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,10
Σ N-6 ³	24,4 $\pm$ 0,43 ^a	22,6 $\pm$ 1,83	24,5 $\pm$ 0,44	21,9 $\pm$ 0,29	21,4 $\pm$ 0,50	<.0001
18:3 n-3	6,7 $\pm$ 0,16	6,0 $\pm$ 0,81	6,7 $\pm$ 0,10	6,0 $\pm$ 0,13	6,3 $\pm$ 0,16	0,12
20:4 n-3	0,6 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,09	0,6 $\pm$ 0,03	0,5 $\pm$ 0,01	0,9 $\pm$ 0,02	0,52
20:3 n-3	0,6 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,06	0,6 $\pm$ 0,01	0,5 $\pm$ 0,01	0,6 $\pm$ 0,01	0,002
20:5 n-3	3,7 $\pm$ 0,09	3,5 $\pm$ 0,30	4,0 $\pm$ 0,06	3,5 $\pm$ 0,10	5,9 $\pm$ 0,08	0,52
22:5 n-3	1,7 $\pm$ 0,03	1,5 $\pm$ 0,19	1,8 $\pm$ 0,02	1,6 $\pm$ 0,07	2,6 $\pm$ 0,03	<.0001
22:6 n-3	5,6 $\pm$ 0,15	6,7 $\pm$ 1,21	5,6 $\pm$ 0,11	5,2 $\pm$ 0,20	8,2 $\pm$ 0,21	<.0001
Σ N-3 ⁴	18,9 $\pm$ 0,15	18,9 $\pm$ 1,21	19,2 $\pm$ 0,26	17,3 $\pm$ 0,52	24,5 $\pm$ 0,47	0,02
EPA+DHA	9,3 $\pm$ 0,22	10,2 $\pm$ 1,20	9,5 $\pm$ 0,13	8,6 $\pm$ 0,30	14,2 $\pm$ 0,27	14,2 $\pm$ 0,27

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 22:0.

²Inkluderer 14:1n-5, 17:1n-7, 19:1, 24:1n-9.

³Inkluderer 18:2n-6TT, 18:3n-6

⁴Inkluderer 18:2n-6TT, 18:3n-6



Figur 82 Prosent EPA+DHA av totale fettsyrer i muskel til atlantisk laks føret med de eksperimentelle diettene i 8 måneder (slutten av Periode 2; juni 2022). Data er vist som gjennomsnittsverdier $\pm$ S.E.M med kar som statistisk enhet ($n = 3$). Data ble analysert ved hjelp av enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukeys test signifikant forskjell ($P < 0,05$).

Mineraler i helkropp og vev

Ved slutten av periode I (Tabell 56), var plasmanivået av Zn i HZD-gruppene signifikant høyere enn i LZD-gruppene ($p < 0,01$). LFD-behandlinger økte dessuten plasmanivået av Zn signifikant sammenlignet med HFD-behandlinger ($p < 0,05$). Videre ble Zn-innholdet i hode-nyren påvirket av en interaksjon mellom fettnivå og Zn ($p < 0,05$). Zn-status i hele kroppen og utvalgte vev (unntatt plasma) ble imidlertid ikke påvirket av fett- og Zn-nivå ved slutten av periode I ($p > 0,05$). Zn-status i hele kroppen og utvalgte vev ble heller ikke påvirket av n-3 LC-PUFA ved midtveisprøvetakingen ($p > 0,05$).

Tabell 56 Effekt av de ulike fôrene på retensjon av sink, og sinkstatus i helfisk og ulike vev, ved midtuttak (PI) og sluttuttak (PII).

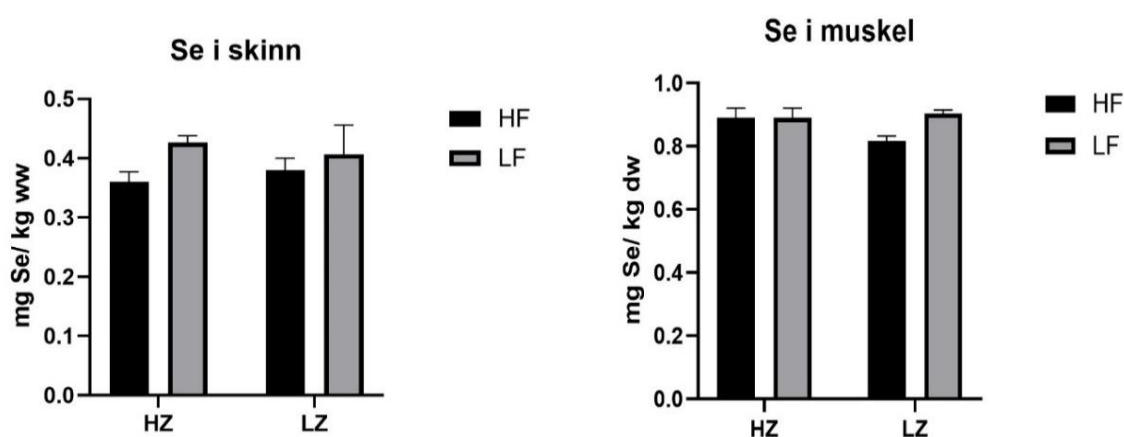
	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ	Zn x Fett	p-verdi		
							Zn	Fett	Ω
Retensjon, %	15,0±2,3	13,2±4,6	18,0±1,6	17,7±2,8	26,9±7,6	0,67	0,57	0,06	0,06
Helfisk Zn (mg/kg, ww)									
Start	37,3								
PI	36,3±8,7	39,0±2,7	31,7±3,5	34,3±6,1	33,7±3,8	0,99	0,45	0,20	0,65
PII	32,1±2,7	23,6±3,2	34,8±1,7	25,9±1,7	45,4±7,9	0,92	0,00	0,12	0,10 ^S
Δ ¹ , %	-2,5±23,4	4,7±7,1	-15±9,4	-7,9±16,4	-9,6±10,2	0,99	0,45	0,20	0,63
Δ ² , %	-8,4±22,3	-39,2±11,6	11,1±18,3	-23,6±8,2	37,3±36,4	0,84	0,01	0,10	0,14
Plasma Zn (µmmol/L)									
PI	200,9±12,4	146,2±23,2	240,7±3,7	178±14,6	190,9±14,0	0,63	0,00	0,02	0,39
PII	208,4±17,9	98,2±11,6	239,5±42,3	139,7±16,8	210,6±9,7	0,87	0,00	0,05	0,87
Δ ² , %	4,1±12,6	-32,5±4,2	-0,3±19	-21,4±8,4	10,5±4,3	0,31	0,00	0,65	0,46
Lever Zn (mg/kg, ww)									
PI	23,6±1,7	24,9±2,9	23,3±1,5	23,2±1,5	24,1±1,5	0,58	0,60	0,42	0,70
PII	20,9±2,0	18,0±0,6	21,6±0,2	20,1±0,8	21,2±2,6	0,68	0,00	0,00	0,50
Δ ² , %	-11,3±5,6	-26,9±10,1	-6,9±6,8	-13,2±7,3	-11,5±14,2	0,32	0,04	0,07	0,98
Hodenyre Zn (mg/kg, ww)									
PI	25,5±0,5	25,9±0,9	26,0±0,7	23,2±1,6	24,7±0,5	0,02	0,08	0,10	0,13
PII	18,3±2,5	17,4±0,1	18,9±2,0	15,4±1,8	18,5±0,7	0,25	0,07	0,54	0,86
Δ ² , %	-28,3±10,3	-32,8±2,4	-27,3±7,1	-36,2±12,6	-25±4,1	0,68	0,24	0,95	0,63
Ryggvirvler Zn (mg/kg, ww)									
PI	46,6±5,2	44,9±6,6	48,7±5,9	46,5±4,0	44,3±2,7	0,95	0,55	0,58	0,53
PII	40,8±3,3	28,8±1,9	42,7±4,7	34,8±10,3	38,0±4,6	0,57	0,02	0,28	0,45
Δ ² , %	-12±10,4	-31,7±12,3	-12,2±1,3	-24,4±23,8	-13,6±15,5	0,67	0,09	0,68	0,89
Muskel Zn (mg/kg, ww)									
PI	14,0±0,6	13,8±0,5	13,8±0,8	15,9±3,7	13,6±2,5	0,31	0,42	0,43	0,79
PII	14,3±0,3	13,1±1,2	15,5±0,6	13,4±0,1	13,9±1,1	0,32	0,00	0,11	0,58
Δ ² , %	2,0±6,3	-5,1±8,5	12,4±3,5	-13,4±17,6	5,6±29,2	0,16	0,03	0,87	0,84
Skind Zn (mg/kg), ww									
PII	31,1±1,1	18,8±0,3	39,2±2,7	23,2±2,5	30,8±2,3	0,14	0,00	0,00	0,84

Start (fiskevekt ca 1,6 kg); PI: midtuttak/ slutten av fase I (fiskevekt ca 2,5 kg), PII: sluttuttak/ slutten av fase II (fiskevekt ca 4,5 kg); Alle verdier oppgitt som gjennomsnitt ± standardavvik; n (plasma) = 18; n (helfisk, lever, hodenyre, ryggvirvler, muskel, skinn) = 3 (samleprøve per merd); ww: våtvekt, dw: tørrvekt (muskel Zn resultat i tørrstoff); S: Mann-Whitney U test

Ved slutten av periode II (Tabell 56), økte HZ diettene signifikant Zn-nivået i helfisk ($p < 0,01$) og ulike vev, inkludert plasma ($p < 0,01$), lever ($p < 0,01$), ryggvirvler ($p < 0,05$), muskel ($p < 0,01$) og skinn ($p < 0,01$) sammenlignet med LZ diettene. For det andre ga redusert fettinnhold i fôret signifikant økt Zn-nivå i plasma ($p < 0,05$), lever ($p < 0,01$) og skinn ($p < 0,01$), og hadde en tendens til å øke Zn-nivået i helkropp ($p = 0,12$). For det tredje hadde fisk som ble fôret med diett med høyt EPA+DHA nivå en tendens til å ha høyere Zn-nivå i helkropp sammenlignet med fisk som ble fôret med lavt n-3 LC-PUFA ($p = 0,10$).

Som vist i Tabell 56, hadde redusert fettnivå i fôret en tendens til å øke Zn-retensjonen ($p = 0,06$). Fisk fôret med høy n-3 LC-PUFA oppnådde også høyere Zn-retensjon enn de som ble fôret med lav n-3 LC-PUFA ($p = 0,06$). Videre ble Zn-nivået i helkropp og vev redusert til en viss grad fra midt- til sluttuttak. Økt Zn-nivå i fôret reduserte signifikant denne nedgangen i helkropp ($p < 0,05$), plasma ($p < 0,01$), lever ($p < 0,05$) og muskel ($p < 0,05$), med tilsvarende tendens for ryggvirvlene ($p = 0,09$). LFD-behandlinger hadde også en tendens til å redusere nedgangen for helkropp ($p = 0,10$) og lever ($p = 0,07$) sammenlignet med HFD-behandlinger.

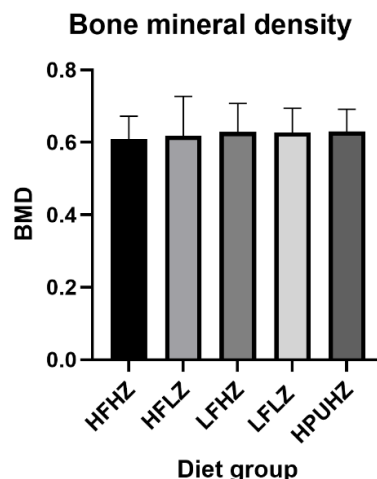
Når det gjelder Se, økte LFD signifikant innholdet av Se i skinn ved slutten av fase II sammenlignet med HFD ($p < 0,05$, Figur 83). I muskel var det en signifikant interaksjon mellom fett og sink ($p < 0,01$), der lavfett så ut til å være positivt for Se status i muskel når det var lav Zn i fôret (men ingen effekt ved høy Zn). Det var også en tendens til at plasmanivået av Se økte med LFD ($p = 0,09$, data ikke vist). Andre mineraler som mangan (Mn), jern (Fe) og kobber (Cu) i helfisk og vev ble også analysert. LFD-behandlinger økte signifikant Mn-nivået i leveren ($p < 0,05$) sammenlignet med HFD-behandlinger (data ikke vist). Redusert fettnivå i fôret økte også Fe-nivået i hode-nyren signifikant ($p < 0,05$) (data ikke vist). Imidlertid ble Cu-statusen i fisken ikke påvirket av fôrene ($p > 0,05$).



Figur 83 Selen i skinn og muskel ved sluttuttaket (PII). Lavfettgruppene hadde signifikant høyere Se i skinn, mens i muskel viste toveis ANOVA signifikant effekt både for fett og interaksjon fett x Zn i fôr; her så det ut til at lavfett hovedsakelig hadde positiv effekt på Se i muskel ved lav Zn i fôret.

Beintetthet (BMD)

Beintettheten ble ikke påvirket av Zn, fettnivå og n-3 LC-PUFA i fôrene ($p > 0,05$) (Figur 84).



Figur 84 Beintetthet (BMD) i Atlantisk laks gitt de fem ulike forsøksfôrene, ved sluttuttaket (periode II). Data er presentert som gjennomsnitt og standardavvik.

Diskusjon samspill mineraler og fett

I denne studien var $180 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ i høy-Zn-dietter nær anbefalingene for plantebasert fôr til laks i sjøvannsfasen (Prabhu et al., 2019, Vera et al., 2020, Yarahmadi et al., 2022) og samsvarte med EUs maksimale grense. Videre har EFSA foreslått å redusere Zn-nivået til 150 mg kg^{-1} i laksefôr (EFSA, 2014). Uten effektive metoder for å forbedre Zn-tilgjengelighet eller -utnyttelse, har det å redusere Zn-nivået til under 180 mg kg^{-1} i plantebasert fôr i sjøvannsfasen for laks vist seg å svekke kroppens Zn-status og fiskens helse (Yarahmadi et al., 2022). I denne studien forble Zn-status i helkropp i HFHZ-gruppen stabil mellom de to prøvetakingene (midtveis vs. slutt), noe som antyder laks fôret med dietter som inneholder $180 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ kunne opprettholde Zn-homeostase gjennom en balanse mellom Zn-opptak og Zn-utskillelse, tilsvarende mekanismer observert hos pattedyr (King, 1990).

Selv om hele kroppens Zn-nivå ble opprettholdt, ble Zn-innholdet i ryggvirvler og lever i HFHZ-gruppen redusert i løpet av denne perioden, mens Zn-nivået i musklene forble uendret. Dette indikerer en mulig mobilisering av Zn fra lever og ryggvirvler til musklene, et mønster også observert hos pattedyr (King, 1990), der ryggvirvler og lever fungerer som betydelige Zn-reservoarer. Rotter som fôres med Zn-mangelfulle dietter reduserte Zn-utskillelse for å gjenopprette kroppens Zn-homeostase og mobiliserte Zn fra "lavprioritetsvev" (som lever og ryggvirvler) til "høyprioritetsvev" (som muskler og skinn) for å støtte vekst (Giugliano and Millward, 1984).

Videre observerte vi at Zn i plasma i HFHZ-gruppen forble stabil mellom de to prøvetakingene, noe som antyder at $180 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ i HFHZ-dietten er tilstrekkelig for å opprettholde Zn-homeostase. Plasma Zn (en annen "Zn-pool") mobiliseres kun når Zn-homeostase ikke kan opprettholdes etter mobilisering av Zn fra andre reservoarer som lever og ryggvirvler (King, 1990). Reduksjon i plasma Zn er assosiert med økt risiko for Zn-mangelsykdommer. Derfor kan redusert fettinnhold og økt n-3 LC-PUFA i fôr være to strategier for å redusere Zn-nivået til mindre enn 180 mg kg^{-1} i fôr, samtidig som Zn-homeostasen opprettholdes. Ytterligere studier er imidlertid nødvendige for å fastslå nøyaktig Zn-nivå, ettersom $100 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ ser ut til å være for lavt basert på resultatene våre.

Redusert fettnivå i fôret økte Zn-retensjonen og Zn-status i helkropp, noe som stemmer overens med tidligere resultater (Selvam et al., 2022). Selvam et al fant at Zn-innhold i helkropp ble redusert med 37,8 % i fisk gitt lavfett-fôr sammenlignet med høyfett-fôr (fettnivå: 30 % vs. 35 %; Zn-nivå: 100 mg kg^{-1} , 15-måneders fôring). Til sammenligning så vi i denne studien at redusert fettnivå i fôret økte Zn-innhold i helkropp med 9,7 % (HFLZ vs. LFLZ, fettnivå: 33 % vs. 38 %; Zn-nivå: 100 mg kg^{-1} , 8-måneders fôring). Ulik varighet på forsøkene forklarer sannsynligvis størrelsen på effekten, noe som støttes av at

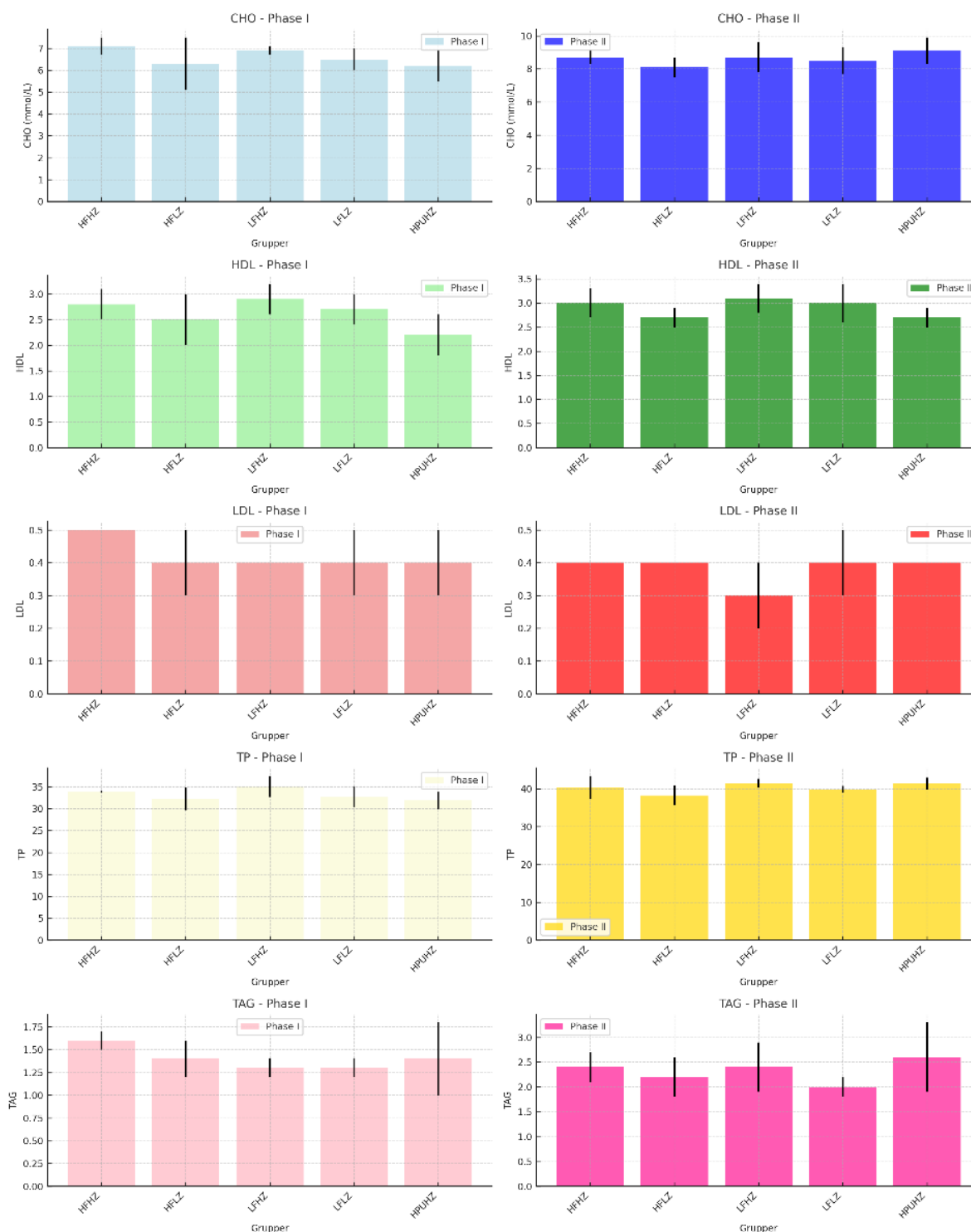
vi så betydelig større effekter på sluttuttak sammenlignet med midtuttaket i dette forsøket. Derfor er det nødvendig å gjennomføre langvarige fôringsforsøk for å se de langsiktige effektene av fôret på mineralutnyttelse.

Videre ga redusert fettnivå i fôret økt Zn-status i leveren (viktig metabolsk organ), samtidig som disse fiskene hadde økt fettnivå i lever. Reduksjonen av Zn-status i leveren for høyfett-dietter skyldtes derfor ikke fettfortynningseffekten. Tilsvarende fikk postnatale rotter fôret med lavfett-dietter økt Zn-nivået i leveren som voksne (Król et al., 2011). Redusert fettnivå i fôret økte også Zn- og Se-innholdet i skinnet (barriereorgan). I praktisk oppdrett blir fisken utsatt for mange belastninger (som bakterielle og parasittinfeksjoner), noe som gjør fisken sårbar for skinnskader. Zn-holdige enzymer spiller en viktig rolle i å regulere betennelse og fremme sårheling, slik som proliferasjon av keratinocytter (Tenaud et al., 1999). Økt Zn-nivå i fôret fremmet helingsprosessen i skinnet til laks (Berge et al., 2019, Jensen et al., 2015). Se er også korrelert med aktiviteten til mange antioksidantenzymmer (som glutathion peroksidase, GPx), og fisk med Se-mangel fikk svekket skinnets strukturelle integritet og immunfunksjon (Zheng et al., 2018b, Zheng et al., 2018a). Derfor vil redusert fettnivå i fôret være gunstig for skinnhelsen ved å øke Zn- og Se-statusen i skinnet. I tillegg økte redusert fettnivå Se-nivået i muskel. Muskel er den største uspesifikke Se-lageret i fisk (Kucukbay et al., 2009, Prabhu et al., 2020), og Se fra muskel vil effektivt mobiliseres når fisken utsettes for utfordringer (Kucukbay et al., 2009, Rider et al., 2009).

Tarmen er ikke bare et viktig organ for å regulere Zn-opptak (Ma and Wang, 2024), men også et "Zn-lager" for å opprettholde kroppens Zn-homeostase (Cousins, 1979, Maage and Julshamn, 1993). I denne studien oppregulerte LZD signifikant uttrykk av gener i tarm relatert til Zn-influx (ZIP4) sammenlignet med HZD. Økt ZIP4-ekspressjon øker akkumuleringen av ZIP4-protein i enterocytters apikale membran (Dufner-Beattie et al., 2003), noe som kan øke Zn-influx i tarm for å kompensere for lav Zn-status i fisken. Tilsvarende ble intestinal ZIP4-ekspressjon signifikant oppregulert i rotter med Zn-mangel, mens ZIP4-protein i tarm ble rikelig degradert når det var tilstrekkelig Zn (Dufner-Beattie et al., 2003, Weaver et al., 2007).

Plasma lipider og lipoproteiner

Plasma lipider og lipoproteiner, inkludert CHO, HDL, LDL og TAG, er presentert i Figur 85. TAG-nivået i plasma i HFD-gruppene var signifikant høyere enn i LFD-gruppene ved midtuttaket ($p < 0,05$). Imidlertid var det ingen signifikante forskjeller i plasma lipider mellom behandlingene ved sluttuttaket ($p > 0,05$).



Figur 85 Effekt av de ulike fôrene på plasma lipider i Atlantisk laks ved midttuttak (periode I) og sluttuttak (periode II). Figuren viser plasma kolesterol (CHO), high density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LPL), total protein (TP) og triacylglycerol (TAG). Data er vist som gjennomsnitt og standardavvik (SD).

Fettsyresammensetning av røde blodceller

Analysert fettsyresammensetning (i % av totale fettsyrer) er vist for røde blodceller (

Tabell 57), samt polare- (PL) og nøytrale lipider (NL) i lever (tabell 57 og 58). HF og LF-fôrene ble formulert til å ha lik fettsyresammensetning i % av fettsyrer, mens HFΩHZ-fôret hadde en litt annerledes fettsyreprofil, da andelen

fiskeolje ble økt på bekostning av rapsolje for å øke EPA og DHA. Fettsyresammensetningen i røde blodceller er i liten grad påvirket av fôret, ved mellomuttaket er både EPA, DHA og 16:0 like mellom alle gruppene, mens ved sluttuttaket er det en svak effekt av HFΩHZ -fôret på 16:0 og tilsvarende tendens for DHA (kun signifikant for sum EPA+DHA).

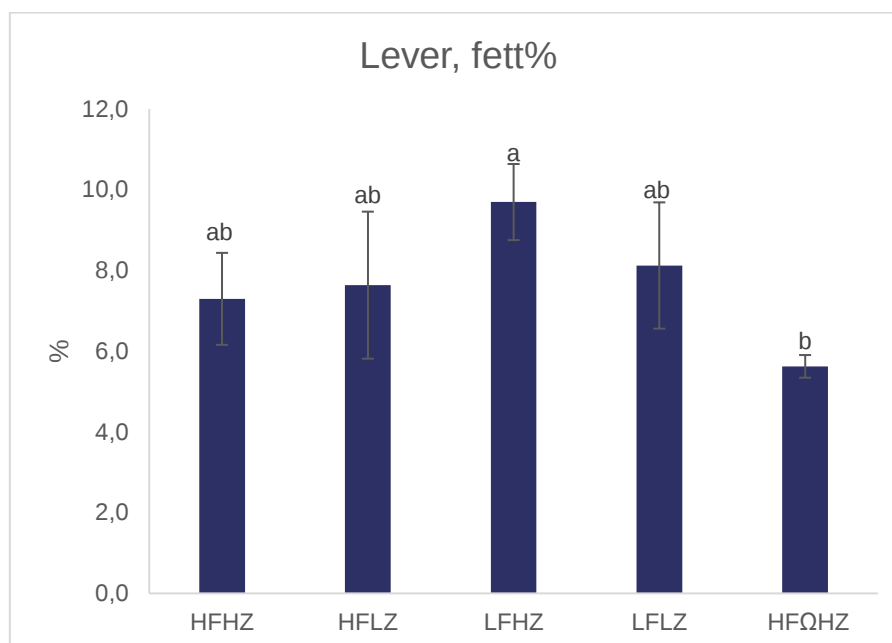
Tabell 57 Effekt av de ulike fôrene på fettsyresammensetning (utvalgte fettsyrer) i røde blodceller i S. salar. Data er vist som gjennomsnitt og standardavvik (SD), og p-verdier vises fra toveis ANOVA (med Zn og fett som faktorer), samt sammenligning mellom HFHZ og HFΩHZ (vist som "Ω").

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ	p verdi			
						Zn × Fett	Zn	Fett	Ω
Periode I (% av totale fettsyrer)									
Σ SFA	39,4±1,8	32,5±6,4	36,8±6,0	36,2±6,3	37,3±6,8	0,34	0,26	0,86	0,63
16:0	25,7±0,3	21,6±3,5	24,1±3,1	23,6±3,4	24,4±3,8	0,36	0,24	0,82	0,58
18:0	14,4±0,6	10,9±2,9	12,8±2,9	12,6±2,8	12,9±3,1	0,33	0,28	0,91	0,00
Σ MUFA	7,2±0,8	7,6±0,8	7,2±0,7	7,2±0,5	6,0±0,9	0,59	0,59	0,73	0,00
18:1	6,9±0,3	7,6±0,8	7,2±0,7	7,2±0,5	6,0±0,9	0,54	0,54	0,76	0,00
Σ PUFA	53,4±1,0	59,9±5,7	55,9±5,3	56,4±5,9	56,7±6,0	0,32	0,25	0,87	0,40
Σ n-3	46,0±0,4	52,5±5,1	48,7±4,7	49,1±5,2	50,5±5,4	0,26	0,20	0,90	0,22
18:3n-3 (ALA)	0,7±0,1	0,8±0,1	0,7±0,0	0,7±0,0	0,5±0,1	0,27	0,30	0,91	0,05
20:5n-3 (EPA)	8,6±0,4	9,6±0,9	9,2±1,2	9,0±1,2	9,4±1,2	0,28	0,52	0,99	0,31
22:6n-3 (DHA)	33,9±0,2	38,9±3,7	35,5±3,2	36,4±3,9	37,5±3,7	0,29	0,14	0,80	0,17
Σ EPA + DHA	42,5±0,2	48,5±4,6	44,7±4,4	45,4±4,9	46,9±4,8	0,28	0,19	0,85	0,19
Σ n-6	7,4±1,0	7,5±0,7	7,2±0,7	7,3±0,7	6,1±0,6	0,99	0,89	0,75	0,13
18:2n-6 (LA)	3,4±0,1	3,6±0,3	3,6±0,3	3,6±0,4	2,4±0,2	0,75	0,72	0,71	0,00
20:4n-6 (ARA)	3,0±0,1	3,2±0,4	3,1±0,3	3,1±0,3	3,1±0,3	0,57	0,43	0,82	0,53
n-3/n-6	6,5±0,5	6,1±0,1	6,3±0,4	6,7±0,0	6,8±0,1	0,14	0,12	0,74	0,00
Periode II (% av totale fettsyrer)									
Σ SFA	30,4±1,4	30,6±2,1	31,0±0,7	30,5±0,7	33,2±1,0	0,67	0,84	0,77	0,04
16:0	21,8±1,0	21,7±1,1	22,1±0,9	21,6±0,3	23,8±0,3	0,78	0,56	0,89	0,04
18:0	8,6±0,6	8,9±1,0	8,9±0,1	8,9±0,4	9,4±0,6	0,61	0,70	0,67	0,17
Σ MUFA	12,0±0,5	11,5±0,5	11,5±0,5	11,8±0,4	9,7±0,2	0,22	0,60	0,64	0,00
18:1	10,5±0,4	10,1±0,4	10,0±0,5	10,3±0,4	8,3±0,2	0,21	0,63	0,51	0,00
Σ PUFA	57,5±1,0	57,9±1,7	57,5±0,4	57,8±0,4	57,1±1,0	0,95	0,59	0,85	0,60
Σ n-3	49,4±1,1	50,1±1,6	49,7±0,4	49,8±0,3	50,9±1,1	0,64	0,46	0,94	0,18
18:3n-3 (ALA)	2,0±0,2	1,7±0,2	1,8±0,1	1,8±0,1	1,4±0,2	0,21	0,18	0,58	0,02
20:5n-3 (EPA)	12,3±0,4	12,3±0,5	12,3±0,4	12,5±0,4	12,5±0,3	0,85	0,77	0,87	0,52
22:6n-3 (DHA)	31±0,8	31,8±1,0	30,9±0,5	31,0±0,6	32,7±0,7	0,42	0,28	0,32	0,05
Σ EPA + DHA	43,3±0,7	44,1±1,4	43,2±0,3	43,5±0,4	45,2±0,9	0,55	0,27	0,43	0,05
Σ n-6	8,1±0,1	7,8±0,1	7,8±0,3	7,9±0,2	6,2±0,1	0,08	0,41	0,57	0,00
18:2n-6 (LA)	4,1±0,2	3,8±0,1	3,8±0,2	3,9±0,1	2,3±0,0	0,06	0,34	0,42	0,00
20:4n-6 (ARA)	2,8±0,3	2,8±0,0	2,7±0,1	2,8±0,0	3,0±0,1	0,93	0,44	0,36	0,23
n-3/n-6	6,1±0,2	6,5±0,1	6,4±0,3	6,3±0,2	8,3±0,3	0,10	0,28	0,67	0,00

Values mean ± SD; ALA: linolenic acid; LA: linoleic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; ARA: arachidonic acid.

Fett og fettsyresammensetning av lever

Figur 86 viser at lever til diettgruppen HFΩHZ hadde signifikant lavere fettprosent i lever enn lavfettgruppen LFHZ, det var ingen signifikante effekter mellom de andre diettgruppene, men de to LF-gruppene hadde numerisk de høyeste fettprosentene i lever.



Figur 86 Fettprosent i lever

Total fettfraksjon fra lever ble separert i fosfolipid (PL) fraksjon og nøytrallipidfraksjon (NL) og fettsyresammensetningen ble bestemt i begge fraksjoner. I PL i lever har LF-fôrgruppene lavere nivå av DHA enn HF-fôrgruppene ved midtuttaket, mens med sluttuttaket er det HFΩHZ-gruppen som skiller seg ut med betydelig høyere DHA enn resterende grupper. På dette tidspunktet har HFΩHZ -gruppen ulike nivåer av så å si alle fettsyrer sammenlignet med HFHZ, der forskjellene kan relateres til forskjeller i fettsyreprofil i fôrene.

Når det gjelder NL i lever ser man tilsvarende effekter av HFΩHZ, mens her er det også signifikante forskjeller for en rekke fettsyrer mellom HF og LF-gruppene, noe som antakelig er relatert til den høyere fettprosenten vi ser i lever hos LF-gruppene.

Tabell 58 Effekt av de ulike fôrene på fettsyresammensetning (utvalgte fettsyrer) i polare lipider (PL) i lever i S. salar. Data er vist som gjennomsnitt og standardavvik (SD), og p-verdier vises fra toveis ANOVA (med Zn og fett som faktorer), samt sammenligning mellom HFHZ og HFΩHZ (vist som "Ω").

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HF Ω HZ	Zn × Fett	p verdi		
							Zn	Fett	Ω
Periode I (% av totale fettsyrer)									
Σ SFA	20,7±0,4	21,2±1,0	20,7±0,3	20,6±0,2	21,7±0,5	0,39	0,58	0,45	0,06
16:0	13,1±0,4	13,5±1,0	12,8±0,2	12,9±0,3	13,3±0,2	0,61	0,48	0,18	0,54
18:0	6,3±0,3	6,4±0,1	6,7±0,1	6,5±0,1	6,8±0,6	0,13	0,38	0,02	0,26
Σ MUFA	21,1±0,6	21,1±0,5	22,1±0,6	22,3±1,0	20,7±2,0	0,71	0,78	0,03	0,74
18:1n-9	15,6±0,4	15,7±0,6	16,3±0,6	16,7±1,0	14,1±1,6	0,71	0,60	0,05	0,17
Σ PUFA	56,2±0,2	55,9±1,0	55,4±0,5	55,1±0,9	55,2±1,6	0,94	0,45	0,08	0,34
Σ n-3	41,5±0,2	41,6±0,6	40,7±0,7	40,8±0,6	43,2±1,9	0,92	0,75	0,03	0,20
18:3n-3 (ALA)	1,3±0,1	1,5±0,3	1,3±0,1	1,5±0,3	1,0±0,1	0,90	0,18	0,90	0,01
20:5n-3 (EPA)	10,2±0,2	10,5±0,6	10,6±0,3	9,9±1,0	11,4±0,4	0,20	0,55	0,68	0,01
22:6n-3 (DHA)	25,5±0,3	25,2±0,5	24,2±0,5	24,9±0,7	26,0±2,0	0,12	0,60	0,03	0,69
Σ EPA + DHA	35,8±0,3	35,7±0,7	34,8±0,8	34,8±0,7	37,4±2,0	0,86	0,99	0,04	0,23
Σ n-6	14,7±0,3	14,2±0,7	14,6±0,2	14,3±0,5	11,9±0,7	0,71	0,14	0,99	0,00
18:2n-6 (LA)	7,6±0,1	7,4±0,2	7,7±0,3	7,6±0,1	5,0±0,3	0,50	0,35	0,24	0,00
20:4n-6 (ARA)	3,8±0,2	3,7±0,2	3,6±0,2	3,4±0,3	4,5±0,7	0,66	0,21	0,09	0,16
n-3/n-6	2,8±0,1	2,9±0,2	2,8±0,1	2,9±0,1	3,6±0,3	0,78	0,19	0,41	0,01
Periode II (% av totale fettsyrer)									
Σ SFA	20,1±0,6	20,3±0,6	19,9±0,3	19,6±1,8	22,0±0,2	0,62	0,95	0,46	0,01
16:0	12,2±0,6	12,6±0,8	11,5±0,2	11,4±1,0	13,4±0,2	0,60	0,77	0,06	0,02
18:0	6,7±0,4	6,6±0,3	7,2±0,5	7,0±0,9	7,1±0,2	0,74	0,62	0,18	0,20
Σ MUFA	21,4±2,2	21,5±2,5	22,7±0,2	23,4±5,7	17,9±0,3	0,88	0,81	0,43	0,06
18:1n-9	16,1±1,9	16,5±1,9	16,9±0,12	17,7±4,5	12,4±0,2	0,93	0,72	0,54	0,03
Σ PUFA	56,6±2,0	56,2±1,9	55,7±0,1	55,1±4,1	57,7±0,2	0,95	0,71	0,50	0,44
Σ n-3	41,5±2,1	41,5±2,0	40,5±0,2	39,6±4,5	45,9±0,3	0,80	0,80	0,36	0,02
18:3n-3 (ALA)	1,5±0,1	1,5±0,1	1,4±0,1	1,4±0,3	0,9±0,0	0,92	0,96	0,74	0,00
20:5n-3 (EPA)	10,7±0,8	10,8±0,7	10,5±0,4	10,6±1,5	12,4±0,1	0,98	0,87	0,72	0,02
22:6n-3 (DHA)	24,1±1,4	24,2±1,4	23,1±0,4	22,4±2,8	27,1±0,5	0,70	0,74	0,19	0,02
Σ EPA + DHA	34,9±2,1	35,0±2,0	33,6±0,2	33,0±4,3	39,5±0,3	0,79	0,87	0,31	0,02
Σ n-6	15,1±0,3	14,6±0,1	15,2±0,2	15,4±0,4	11,7±0,1	0,06	0,38	0,01	0,00
18:2n-6 (LA)	7,8±0,4	7,6±0,2	7,6±0,2	7,8±0,9	4,5±0,1	0,57	0,92	0,90	0,00
20:4n-6 (ARA)	4,0±0,3	3,9±0,1	3,8±0,1	3,9±0,5	5,0±0,1	0,69	0,99	0,65	0,00
n-3/n-6	2,8±0,2	2,8±0,2	2,7±0,0	2,6±0,4	3,9±0,1	0,52	0,98	0,17	0,00

Values mean ± SD; ALA: linolenic acid; LA: linoleic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; ARA: arachidonic acid.

Tabell 59 Effekt av de ulike fôrene på fettsyresammensetning (utvalgte fettsyrer) i nøytrale lipider (NL) i lever i S. salar. Data er vist som gjennomsnitt og standardavvik (SD), og p-verdier vises fra toveis ANOVA (med Zn og fett som faktorer), samt sammenligning mellom HFHZ og HFQHZ (vist som "Ω").

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ	Zn × Fett	p verdi		
							Zn	Fett	Ω
Periode I (% av totale fettsyrer)									
Σ SFA	9,2±0,4	10,0±1,2	9,7±0,1	9,4±0,4	11,2±0,9	0,16	0,53	0,97	0,02
16:0	4,8±0,2	5,4±0,8	4,7±0,3	4,6±0,3	6,2±0,8	0,23	0,38	0,19	0,04
18:0	2,8±0,16	2,9±0,3	3,4±0,2	3,1±0,2	2,9±0,2	0,10	0,49	0,01	0,25
Σ MUFA	60,7±0,6	58,8±2,4	61,6±0,9	62,0±0,6	55,1±2,5	0,18	0,39	0,03	0,02
18:1n-9	47,2±0,5	45,7±2,0	47,9±0,8	48,0±0,4	40,0±2,4	0,26	0,32	0,05	0,01
Σ PUFA	28,4±0,5	29,4±1,2	26,8±0,8	26,7±0,6	31±1,7	0,28	0,34	0,00	0,06
Σ n-3	10,9±0,6	12,5±1,5	9,6±1,1	9,4±0,7	16,7±2,0	0,17	0,28	0,01	0,01
18:3n-3 (ALA)	3,6±0,2	3,8±0,2	3,5±0,2	3,8±0,3	3,1±0,2	0,55	0,10	0,77	0,02
20:5n-3 (EPA)	2,3±0,2	2,8±0,5	2,0±0,4	1,8±0,4	4,3±0,6	0,19	0,51	0,01	0,01
22:6n-3 (DHA)	2,9±0,4	3,7±0,9	2,2±0,6	2,1±0,4	5,4±1,5	0,21	0,36	0,01	0,05
Σ EPA + DHA	5,3±0,5	6,5±1,4	4,2±1,0	3,9±0,8	9,7±2,1	0,22	0,44	0,01	0,02
Σ n-6	17,4±0,1	16,8±0,3	17,0±0,4	17,2±0,4	14,2±0,4	0,07	0,24	0,92	0,00
18:2n-6 (LA)	13,3±0,1	12,9±0,1	13,0±0,2	13,0±0,21	10,5±0,5	0,10	0,10	0,43	0,00
20:4n-6 (ARA)	1,1±0,1	1,1±0,1	1,0±0,0	1,0±0,1	1,3±0,2	0,58	0,58	0,00	0,19
n-3/n-6	0,6±0,1	0,8±0,1	0,5±0,1	0,5±0,1	1,2±0,2	0,17	0,17	0,01	0,00
Periode II (% av totale fettsyrer)									
Σ SFA	9,6±0,9	10,0±0,6	9,4±0,3	9,5±0,8	14,6±0,2	0,70	0,59	0,39	0,00
16:0	5,2±0,6	5,4±0,4	4,7±0,3	4,9±0,6	8,9±0,2	0,97	0,53	0,11	0,00
18:0	2,8±0,2	3,0±0,2	3,2±0,1	3,1±0,1	3,2±0,1	0,14	0,53	0,03	0,03
Σ MUFA	58,5±0,6	59,0±0,5	61,0±1,0	60,1±1,6	48,9±0,9	0,26	0,69	0,02	0,00
18:1n-9	46,0±0,5	46,5±0,2	47,7±0,8	47,3±1,2	35,5±0,6	0,31	0,90	0,02	0,00
Σ PUFA	29,7±0,6	29,2±0,2	27,4±0,9	28,4±0,9	33,2±0,4	0,11	0,68	0,01	0,00
Σ n-3	11,1±0,4	11,3±0,3	9,9±0,8	10,6±0,8	19,5±0,7	0,43	0,26	0,03	0,00
18:3n-3 (ALA)	3,7±0,1	3,7±0,1	3,4±0,1	3,4±0,2	3,0±0,1	0,75	0,95	0,00	0,00
20:5n-3 (EPA)	2,5±0,2	2,7±0,1	2,2±0,2	2,4±0,3	5,7±0,5	0,64	0,14	0,05	0,00
22:6n-3 (DHA)	2,4±0,1	2,5±0,2	1,8±0,3	2,3±0,5	5,9±0,2	0,44	0,14	0,05	0,00
Σ EPA + DHA	4,9±0,3	5,2±0,4	4,0±0,6	4,7±0,7	11,6±0,7	0,52	0,13	0,05	0,00
Σ n-6	18,5±0,3	17,8±0,3	17,4±0,4	17,6±0,4	13,5±0,3	0,08	0,28	0,03	0,00
18:2n-6 (LA)	14,5±0,2	13,9±0,2	13,1±0,6	13,5±0,4	10,3±0,2	0,05	0,58	0,00	0,00
20:4n-6 (ARA)	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,0	1,3±0,0	0,91	0,74	0,98	0,00
n-3/n-6	0,6±0,0	0,6±0,0	0,6±0,1	0,6±0,1	1,4±0,1	0,94	0,17	0,16	0,00

Values mean ± SD; ALA: linolenic acid; LA: linoleic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; ARA: arachidonic acid.

Total fettsyresammensetning i lever, målt i mg/g og som prosentandel av totale fettsyrer, ble analysert ved sluttuttaket. Tabell 60-Tabell 61 viser signifikant høyere nivå av DHA, både i mg/g og som prosentandel av totale fettsyrer, i gruppen fôret med det høyeste diettnivået av fiskeolje (ca. 11 % av totale fettsyrer), sammenlignet med de andre diettgruppene som ble fôret med ca. 6,6 % av totale fettsyrer i dietten.

For øvrig var det ingen signifikante forskjeller i mg/g i lever for mettede og enumettede fettsyrer. At de to LF-gruppene hadde like mye EPA+DHA i mg/g i lever som HF-gruppene, skyldes sannsynligvis det høyere totale fettnivået i lever hos LF-gruppene.

Prosentvis fordeling av fettsyrer i lever viste flere signifikante forskjeller som til stor grad reflekterte fettsyresammensetningen av fôret, det var signifikant høyere prosentandel EPA+DHA, 14:0, 20:4n-6 (ARA) og lavere total n-6 fettsyrer i HFQHZ gruppen, sammenlignet med de andre diettgruppene.

Tabell 60 Fettsyrer (mg/g) i LEVER. Data (n=3) er vist som gjennomsnitt ± standardfeil. Signifikante forskjeller er indikert med ulike bokstaver, testet med enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys HSD.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	0,4± 0,07	0,4± 0,14	0,5± 0,19	0,5± 0,15	0,4± 0,05
16:0	3,8± 0,10	3,9± 0,46	4,3± 0,92	3,9± 0,36	3,8± 0,16
18:0	2,0± 0,28	2,1± 0,27	2,5± 0,97	2,3± 0,34	1,7± 0,23
Σ SFA ¹	6,5± 0,47	6,8± 0,92	7,6± 2,11	6,9± 0,87	6,0± 0,44
16:1n-7	0,5± 0,13	0,6± 0,20	0,8± 0,43	0,6± 0,25	0,4± 0,07
18:1 n-9	14,1± 3,53	16,2± 6,12	18,2± 11,23	17,1± 6,38	6,4± 0,99
18:1 n-7	1,2± 0,27	1,3± 0,43	1,5± 0,75	1,4± 0,47	0,8± 0,11
20:1 n-9	1,7± 0,54	1,9± 0,89	2,3± 1,47	2,0± 0,89	0,8± 0,12
24:1n-9	0,4± 0,02	0,4± 0,04	0,4± 0,03	0,4± 0,01	0,4± 0,02
Σ MUFA ²	19,0± 4,71	21,7± 7,99	24,4± 14,20	22,8± 8,33	9,8± 1,43
18:2 n-6	5,0± 1,11	5,3± 1,81	5,3± 3,02	5,4± 1,65	2,0± 0,30
20:2 n-6	1,1± 0,31	1,1± 0,44	1,4± 0,85	1,2± 0,46	0,5± 0,08
20:4 n-6	0,7± 0,08	0,7± 0,00	0,7± 0,07	0,7± 0,03	0,8± 0,16
Σ N-6 ³	7,0± 1,53	7,6± 2,32	7,7± 4,15	7,8± 2,17	3,4± 0,52
18:3 n-3	1,2± 0,26	1,3± 0,43	1,3± 0,72	1,3± 0,42	0,5± 0,09
20:5 n-3	2,7± 0,30	2,8± 0,20	3,0± 0,19	2,8± 0,21	3,0± 0,14
22:5 n-3	1,1± 0,19	1,1± 0,14	1,3± 0,17	1,1± 0,18	1,2± 0,09
22:6 n-3	5,3± 0,34 ^{ab}	5,3± 0,08 ^{ab}	5,4± 0,06 ^{ab}	5,1± 0,10 ^b	5,7± 0,17 ^a
Σ N-3 ⁴	10,7± 1,16	11,0± 1,04	11,6± 1,38	10,7± 1,03	10,7± 0,43
EPA+DHA	8,0± 0,62	8,1± 0,28	8,4± 0,20	7,9± 0,28	8,8± 0,29

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0

²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1, 18:1n-11, 20:1n-11, 22:1n-7, 22:1n-11, 22:1n-9

³Inkluderer 18:3n-6, 20:3n-6

⁴Inkluderer 20:4n-3, 20:3n-3

Tabell 61 Fettsyrer (prosent av totale fettsyrer) i LEVER. Data (n=3) er vist som gjennomsnitt $\pm$ standardfeil. Signifikante forskjeller er indikert med ulike bokstaver, testet med enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys HSD.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	0,9 $\pm$ 0,03 ^b	0,9 $\pm$ 0,05 ^b	1,0 $\pm$ 0,16 ^{ab}	0,9 $\pm$ 0,07 ^b	1,2 $\pm$ 0,04 ^a
16:0	8,9 $\pm$ 1,25	8,4 $\pm$ 1,14	9,0 $\pm$ 2,87	8,1 $\pm$ 1,20	12,2 $\pm$ 0,75
18:0	4,5 $\pm$ 0,17	4,5 $\pm$ 0,53	4,7 $\pm$ 0,21	4,8 $\pm$ 0,48	5,3 $\pm$ 0,47
Σ SFA ¹	14,8 $\pm$ 1,45	14,3 $\pm$ 1,62	15,3 $\pm$ 3,18	14,3 $\pm$ 1,64	19,4 $\pm$ 0,98
16:1n-7	1,2 $\pm$ 0,11	1,2 $\pm$ 0,10	1,5 $\pm$ 0,22	1,3 $\pm$ 0,16	1,4 $\pm$ 0,11
18:1 n-9	31,6 $\pm$ 2,14	33,1 $\pm$ 3,77	31,8 $\pm$ 9,73	34,1 $\pm$ 3,76	20,7 $\pm$ 1,51
18:1 n-7	2,7 $\pm$ 0,12	2,8 $\pm$ 0,18	2,9 $\pm$ 0,25	2,8 $\pm$ 0,22	2,6 $\pm$ 0,14
20:1 n-9	3,7 $\pm$ 0,51	3,9 $\pm$ 0,78	4,1 $\pm$ 1,25	4,0 $\pm$ 0,69	2,6 $\pm$ 0,19
24:1n-9	0,9 $\pm$ 0,13	0,9 $\pm$ 0,19	0,9 $\pm$ 0,40	0,8 $\pm$ 0,18	1,3 $\pm$ 0,08
Σ MUFA ²	42,8 $\pm$ 2,81	44,4 $\pm$ 4,66	43,5 $\pm$ 10,49	45,4 $\pm$ 4,70	31,5 $\pm$ 1,99
18:2 n-6	11,2 $\pm$ 0,49	10,9 $\pm$ 0,84	9,4 $\pm$ 2,52	10,9 $\pm$ 0,54	6,5 $\pm$ 0,42
20:2 n-6	2,4 $\pm$ 0,25	2,3 $\pm$ 0,32	2,4 $\pm$ 0,76	2,5 $\pm$ 0,28	1,5 $\pm$ 0,14
20:4 n-6	1,5 $\pm$ 0,09 ^b	1,5 $\pm$ 0,34 ^b	1,4 $\pm$ 0,58 ^b	1,5 $\pm$ 0,32 ^b	2,6 $\pm$ 0,41 ^a
Σ N-6 ³	15,9 $\pm$ 0,61 ^a	15,6 $\pm$ 0,71 ^a	13,9 $\pm$ 2,90 ^{ab}	15,7 $\pm$ 0,39 ^a	11,0 $\pm$ 0,66 ^b
18:3 n-3	2,6 $\pm$ 0,12 ^a	2,6 $\pm$ 0,19 ^a	2,3 $\pm$ 0,55 ^{ab}	2,5 $\pm$ 0,19 ^a	1,7 $\pm$ 0,15 ^b
20:5 n-3	6,2 $\pm$ 0,52	6,0 $\pm$ 1,15	6,6 $\pm$ 2,95	5,7 $\pm$ 0,95	9,8 $\pm$ 0,50
22:5 n-3	2,5 $\pm$ 0,12 ^b	2,3 $\pm$ 0,26 ^b	2,8 $\pm$ 1,06 ^{ab}	2,3 $\pm$ 0,22 ^b	3,9 $\pm$ 0,11 ^a
22:6 n-3	12,1 $\pm$ 1,61	11,5 $\pm$ 2,54	12,0 $\pm$ 6,26	10,7 $\pm$ 2,35	18,6 $\pm$ 1,50
Σ N-3 ⁴	24,4 $\pm$ 1,91	23,4 $\pm$ 3,53	24,7 $\pm$ 9,50	22,3 $\pm$ 3,15	34,8 $\pm$ 1,79
EPA+DHA	18,3 $\pm$ 2,12 ^b	17,5 $\pm$ 3,68 ^b	18,6 $\pm$ 9,21 ^b	16,5 $\pm$ 3,29 ^b	28,4 $\pm$ 1,99 ^a

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0

²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1, 18:1n-11, 20:1n-11, 22:1n-7, 22:1n-11, 22:1n-9

³Inkluderer 18:3n-6, 20:3n-6

⁴Inkluderer 20:4n-3, 20:3n-3

Fettsyresammensetning av skinn og tarm

Tabell 62-Tabell 65 viser total fettsyresammensetning av skinn og tarm i mg/g og i prosent av totale fettsyrer. Tabellene viser at det var hovedsakelig ingen signifikante forskjeller i fettsyresammensetning mellom høyfett og lavfettgruppene HFHZ, HFLZ, LFHZ, LFLZ, det var kun HFQHZ som skilte seg ut med høyere nivåer av EPA, DPA, DHA, ARA og 14:0 og lavere nivå av totale n-6.

Tabell 62 Fettsyrer (mg/g) i skinn. Data (n=3) er vist som gjennomsnitt $\pm$ standardfeil. Signifikante forskjeller er indikert med ulike bokstaver, testet med enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys HSD.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ
14:0	1,4 $\pm$ 0,11 ^{ab}	1,3 $\pm$ 0,25 ^b	1,1 $\pm$ 0,09 ^b	1,3 $\pm$ 0,10 ^b	1,8 $\pm$ 0,34 ^a
16:0	7,8 $\pm$ 0,53	7,0 $\pm$ 1,23	6,6 $\pm$ 0,45	7,1 $\pm$ 0,55	8,6 $\pm$ 1,43
18:0	2,3 $\pm$ 0,13	2,0 $\pm$ 0,35	2,0 $\pm$ 0,10	2,1 $\pm$ 0,14	2,2 $\pm$ 0,35
Σ SAT ¹	12,2 $\pm$ 0,81	10,9 $\pm$ 1,93	10,3 $\pm$ 0,65	11,0 $\pm$ 0,85	13,2 $\pm$ 2,20
16:1n-7	1,7 $\pm$ 0,13 ^{ab}	1,5 $\pm$ 0,32 ^b	1,4 $\pm$ 0,10 ^b	1,5 $\pm$ 0,12 ^b	2,3 $\pm$ 0,45 ^a
18:1 n-9	31,9 $\pm$ 2,23	28,5 $\pm$ 6,02	25,1 $\pm$ 1,47	27,3 $\pm$ 2,41	27,5 $\pm$ 5,20
18:1 n-7	2,3 $\pm$ 0,15	2,1 $\pm$ 0,43	1,9 $\pm$ 0,12	2,0 $\pm$ 0,15	2,3 $\pm$ 0,45
20:1 n-9	2,6 $\pm$ 0,18	2,3 $\pm$ 0,51	2,0 $\pm$ 0,15	2,2 $\pm$ 0,19	2,6 $\pm$ 0,49
22:1n-11	1,3 $\pm$ 0,09 ^{ab}	1,2 $\pm$ 0,25 ^b	1,0 $\pm$ 0,10 ^b	1,1 $\pm$ 0,09 ^b	1,8 $\pm$ 0,33 ^a
Σ MUFA ²	41,9 $\pm$ 2,96	37,6 $\pm$ 7,88	33,2 $\pm$ 2,02	36,1 $\pm$ 3,11	38,9 $\pm$ 7,36
18:2 n-6	11,7 $\pm$ 0,83	10,3 $\pm$ 2,18	9,1 $\pm$ 0,54	10,0 $\pm$ 0,88	9,5 $\pm$ 1,81
20:2 n-6	1,0 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,21	0,9 $\pm$ 0,05	0,9 $\pm$ 0,09	0,8 $\pm$ 0,15
Σ N-6 ³	13,6 $\pm$ 0,95	12,0 $\pm$ 2,50	10,8 $\pm$ 0,62	11,7 $\pm$ 1,02	11,1 $\pm$ 2,06
18:3 n-3	3,7 $\pm$ 0,27	3,3 $\pm$ 0,71	2,9 $\pm$ 0,21	3,2 $\pm$ 0,28	3,2 $\pm$ 0,61
20:5 n-3	2,7 $\pm$ 0,18 ^b	2,5 $\pm$ 0,37 ^b	2,4 $\pm$ 0,16 ^b	2,5 $\pm$ 0,17 ^b	3,8 $\pm$ 0,60 ^a
22:5 n-3	1,1 $\pm$ 0,07 ^{ab}	1,0 $\pm$ 0,20 ^b	0,9 $\pm$ 0,06 ^b	1,0 $\pm$ 0,06 ^b	1,5 $\pm$ 0,27 ^a
22:6 n-3	3,7 $\pm$ 0,26 ^b	3,4 $\pm$ 0,51 ^b	3,1 $\pm$ 0,21 ^b	3,3 $\pm$ 0,23 ^b	4,9 $\pm$ 0,66 ^a
Σ N-3 ⁴	11,9 $\pm$ 0,82 ^{ab}	10,9 $\pm$ 1,90 ^{ab}	9,9 $\pm$ 0,66 ^b	10,5 $\pm$ 0,78 ^{ab}	14,0 $\pm$ 2,28 ^a
EPA+DHA	6,4 $\pm$ 0,44 ^b	6,0 $\pm$ 0,87 ^b	5,6 $\pm$ 0,37 ^b	5,8 $\pm$ 0,39 ^b	8,6 $\pm$ 1,26 ^a

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0

²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1, 18:1n-11, 20:1n-11, 22:1n-7, 22:1n-9

³Inkluderer 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-6

⁴Inkluderer 20:4n-3, 20:3n-3

Tabell 63 Fettsyrer (% av totale fettsyrer) i skinn, Data (n=3) er vist som gjennomsnitt med sem, Signifikante forskjeller er indikert med ulike bokstaver, testet med enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys HSD.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ
14:0	1,7 ± 0,02 ^b	1,7 ± 0,01 ^b	1,7 ± 0,03 ^b	1,8 ± 0,01 ^b	2,3 ± 0,02 ^a
16:0	9,6 ± 0,06 ^c	9,7 ± 0,24 ^c	10,1 ± 0,07 ^b	10,0 ± 0,07 ^{bc}	10,9 ± 0,18 ^a
18:0	2,8 ± 0,04 ^b	2,8 ± 0,08 ^b	3,1 ± 0,06 ^a	3,0 ± 0,06 ^{ab}	2,8 ± 0,07 ^b
Σ SAT ¹	15,0 ± 0,10 ^c	15,0 ± 0,34 ^c	15,7 ± 0,03 ^{bc}	15,6 ± 0,14 ^b	16,7 ± 0,25 ^a
16:1n-7	2,1 ± 0,01 ^b	2,1 ± 0,03 ^b	2,1 ± 0,03 ^b	2,1 ± 0,01 ^b	2,9 ± 0,05 ^a
18:1 n-9	39,2 ± 0,08 ^a	39,0 ± 0,44 ^a	38,3 ± 0,10 ^b	38,7 ± 0,19 ^{ab}	34,6 ± 0,32 ^c
18:1 n-7	2,8 ± 0,02 ^b	2,8 ± 0,03 ^b	2,9 ± 0,01 ^b	2,8 ± 0,03 ^b	3,0 ± 0,04 ^a
20:1 n-9	3,2 ± 0,02 ^{ab}	3,1 ± 0,07 ^{ab}	3,1 ± 0,05 ^b	3,1 ± 0,01 ^b	3,3 ± 0,04 ^a
22:1n-11	1,6 ± 0,02 ^b	1,6 ± 0,01 ^b	1,5 ± 0,08 ^c	1,5 ± 0,03 ^{bc}	2,2 ± 0,03 ^a
Σ MUFA ²	51,7 ± 0,16 ^a	51,6 ± 0,48 ^a	50,6 ± 0,20 ^b	51,1 ± 0,13 ^{ab}	49,1 ± 0,43 ^c
18:2 n-6	14,5 ± 0,03 ^a	14,1 ± 0,17 ^b	13,9 ± 0,03 ^b	14,1 ± 0,09 ^b	11,9 ± 0,14 ^c
20:2 n-6	1,3 ± 0,02 ^{ab}	1,2 ± 0,04 ^b	1,3 ± 0,02 ^a	1,3 ± 0,02 ^a	1,0 ± 0,02 ^c
Σ N-6 ³	16,8 ± 0,02 ^a	16,4 ± 0,14 ^b	16,5 ± 0,08 ^b	16,5 ± 0,09 ^b	14,0 ± 0,07 ^c
18:3 n-3	4,6 ± 0,02 ^a	4,6 ± 0,06 ^a	4,4 ± 0,06 ^b	4,5 ± 0,03 ^{ab}	4,0 ± 0,05 ^c
20:5 n-3	3,4 ± 0,06 ^c	3,5 ± 0,21 ^{bc}	3,7 ± 0,12 ^b	3,6 ± 0,07 ^{bc}	4,8 ± 0,14 ^a
22:5 n-3	1,3 ± 0,01 ^c	1,3 ± 0,03 ^c	1,4 ± 0,02 ^b	1,4 ± 0,03 ^{bc}	1,9 ± 0,04 ^a
22:6 n-3	4,5 ± 0,07 ^b	4,8 ± 0,27 ^b	4,8 ± 0,10 ^b	4,7 ± 0,08 ^b	6,2 ± 0,32 ^a
Σ N-3 ⁴	14,6 ± 0,12 ^b	15,0 ± 0,41 ^b	15,1 ± 0,20 ^b	14,9 ± 0,15 ^b	17,7 ± 0,40 ^a
EPA+DHA	7,9 ± 0,13 ^b	8,2 ± 0,48 ^b	8,5 ± 0,22 ^b	8,3 ± 0,14 ^b	10,9 ± 0,45 ^a

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0

²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1, 18:1n-11, 20:1n-11, 22:1n-7, 22:1n-9

³Inkluderer 18:3n-6, 20:3n-6, 20:4n-6

⁴Inkluderer 20:4n-3, 20:3n-3

Tabell 64 Fettsyrer (mg/g) i TARM, Data (n=3) er vist som gjennomsnitt med sem, Signifikante forskjeller er indikert med ulike bokstaver, testet med enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys HSD.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ
14:0	0,6 ± 0,11	0,6 ± 0,34	0,6 ± 0,23	0,5 ± 0,16	1,6 ± 0,86
16:0	4,9 ± 0,55	5,0 ± 1,59	5,2 ± 1,01	4,3 ± 0,89	8,4 ± 3,26
18:0	1,9 ± 0,16	1,9 ± 0,39	2,0 ± 0,26	1,8 ± 0,27	2,6 ± 0,71
Σ SAT ¹	7,9 ± 0,88	8,0 ± 2,46	8,3 ± 1,59	6,9 ± 1,40	13,2 ± 5,11
16:1n-7	0,6 ± 0,13	0,7 ± 0,42	0,7 ± 0,28	0,5 ± 0,18	1,8 ± 1,13
18:1 n-9	13,3 ± 2,45	14,1 ± 7,88	14,0 ± 5,33	10,4 ± 3,60	20,8 ± 11,93
18:1 n-7	1,1 ± 0,19	1,1 ± 0,52	1,1 ± 0,38	0,9 ± 0,24	2,0 ± 1,00
20:1 n-9	1,1 ± 0,19	1,1 ± 0,58	1,2 ± 0,43	0,9 ± 0,28	2,1 ± 1,14
22:1n-11	0,5 ± 0,09	0,5 ± 0,33	0,5 ± 0,20	0,3 ± 0,15	1,4 ± 0,87
Σ MUFA ²	17,7 ± 3,23	18,7 ± 10,26	18,7 ± 6,96	13,9 ± 4,71	30,2 ± 17,05
18:2 n-6	5,2 ± 0,83	5,4 ± 2,92	5,7 ± 1,85	4,4 ± 1,38	7,4 ± 4,23
20:2 n-6	0,5 ± 0,09	0,5 ± 0,20	0,6 ± 0,16	0,5 ± 0,11	0,7 ± 0,30
20:4n-6	0,4 ± 0,02 ^b	0,4 ± 0,02 ^b	0,4 ± 0,02 ^b	0,4 ± 0,01 ^b	0,6 ± 0,05 ^a
Σ N-6 ³	6,5 ± 0,96	6,7 ± 3,22	7,1 ± 2,08	5,7 ± 1,58	9,0 ± 4,61
18:3 n-3	1,4 ± 0,28	1,5 ± 0,92	1,4 ± 0,59	1,0 ± 0,43	2,3 ± 1,35
20:5 n-3	2,1 ± 0,21 ^b	2,2 ± 0,46 ^{ab}	2,1 ± 0,17 ^b	1,9 ± 0,26 ^b	3,7 ± 1,18 ^a
22:5 n-3	0,7 ± 0,10	0,7 ± 0,18	0,8 ± 0,11	0,7 ± 0,11	1,4 ± 0,54
22:6 n-3	3,5 ± 0,33 ^b	3,8 ± 0,44 ^b	3,6 ± 0,27 ^b	3,5 ± 0,41 ^b	5,7 ± 1,33 ^a
Σ N-3 ⁴	7,9 ± 0,95	8,4 ± 2,14	8,2 ± 1,22	7,4 ± 1,28	13,7 ± 4,74
EPA+DHA	5,6 ± 0,52 ^b	6,0 ± 0,89 ^b	5,7 ± 0,40 ^b	5,4 ± 0,67 ^b	9,4 ± 2,51 ^a

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0

²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1, 18:1n-11, 20:1n-11, 22:1n-7, 22:1n-9, 24:1n-9

³Inkluderer 18:3n-6, 20:3n-6

⁴Inkluderer 20:4n-3, 20:3n-3

Tabell 65 Fettsyrer (prosent av totale fettsyrer) i TARM, Data (n=3) er vist som gjennomsnitt med sem, Signifikante forskjeller er indikert med ulike bokstaver, testet med enveis ANOVA etterfulgt av Tukeys HSD.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ
14:0	1,5 ± 0,06 ^b	1,4 ± 0,18 ^b	1,5 ± 0,14 ^b	1,3 ± 0,11 ^b	2,2 ± 0,17 ^a
16:0	12,2 ± 0,56	12,1 ± 1,28	12,3 ± 1,04	12,6 ± 0,79	12,9 ± 1,29
18:0	4,7 ± 0,35	4,8 ± 1,03	4,8 ± 0,75	5,3 ± 0,64	4,1 ± 0,84
Σ SAT ¹	19,4 ± 0,88	19,4 ± 2,23	19,6 ± 1,74	20,3 ± 1,34	20,2 ± 2,03
16:1n-7	1,6 ± 0,10 ^b	1,5 ± 0,29 ^b	1,6 ± 0,23 ^b	1,4 ± 0,17 ^b	2,6 ± 0,36 ^a
18:1 n-9	32,4 ± 1,17	31,8 ± 4,33	31,8 ± 3,60	29,6 ± 2,66	29,8 ± 3,31
18:1 n-7	2,7 ± 0,07 ^{ab}	2,6 ± 0,07 ^{ab}	2,6 ± 0,17 ^b	2,5 ± 0,05 ^b	2,9 ± 0,09 ^a
20:1 n-9	2,7 ± 0,07	2,6 ± 0,22	2,6 ± 0,29	2,5 ± 0,17	3,0 ± 0,22
22:1n-11	1,2 ± 0,05 ^b	1,1 ± 0,27 ^b	1,1 ± 0,18 ^b	0,9 ± 0,20 ^b	2,0 ± 0,32 ^a
Σ MUFA ²	43,3 ± 1,47	42,4 ± 5,18	42,5 ± 4,50	39,7 ± 3,24	43,3 ± 4,20
18:2 n-6	12,8 ± 0,19	12,3 ± 1,37	13,0 ± 0,69	12,5 ± 0,71	10,6 ± 1,21
20:2 n-6	1,3 ± 0,04 ^{bc}	1,3 ± 0,09 ^c	1,5 ± 0,06 ^{ab}	1,5 ± 0,09 ^a	1,0 ± 0,04 ^d
20:4n-6	1,0 ± 0,10	1,1 ± 0,39	1,0 ± 0,26	1,3 ± 0,31	1,0 ± 0,54
Σ N-6 ³	16,0 ± 0,05 ^a	15,5 ± 0,77 ^a	16,5 ± 0,44 ^a	16,4 ± 0,25 ^a	13,1 ± 0,58 ^b
18:3 n-3	3,4 ± 0,19	3,3 ± 0,66	3,3 ± 0,46	2,9 ± 0,48	3,2 ± 0,50
20:5 n-3	5,1 ± 0,32	5,4 ± 1,08	5,0 ± 1,05	5,7 ± 0,76	5,8 ± 1,09
22:5 n-3	1,7 ± 0,07	1,8 ± 0,35	1,9 ± 0,28	2,1 ± 0,24	2,2 ± 0,28
22:6 n-3	8,7 ± 0,59	9,7 ± 2,88	8,7 ± 1,91	10,3 ± 1,60	9,1 ± 2,26
Σ N-3 ⁴	19,5 ± 0,66	20,8 ± 3,59	19,6 ± 2,69	21,6 ± 2,08	21,1 ± 3,04
EPA+DHA	13,8 ± 0,85	15,1 ± 3,96	13,8 ± 2,94	16,1 ± 2,36	14,9 ± 3,34

¹Inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0

²Inkluderer 14:1n-5, 15:1, 17:1, 18:1n-11, 20:1n-11, 22:1n-7, 22:1n-9, 24:1n-9

³Inkluderer 18:3n-6, 20:3n-6

⁴Inkluderer 20:4n-3, 20:3n-3

Genuttrykk i tarm

Sammenlignet med Høy sink HZ-behandlinger, oppregulerte lav sink LZ-behandlinger signifikant genuttrykket av ZIP4 ($p < 0,05$) i tarmen (Tabell 66). Redusert Zn-nivå i fôret nedregulerte derimot uttrykk av MTA ($p < 0,01$). Tarmens mRNA-uttrykk relatert til Zn-opptak og transport ble ikke påvirket av fettinnvåk og n-3 LC-PUFA ($p > 0,05$). I tillegg ble genuttrykk relatert til fettopptak og transport ikke påvirket av Zn, fettinnvåk og n-3 LC-PUFA ($p > 0,05$).

Tabell 66 Genuuttrykk i tarm hos Atlantisk laks gitt de 5 ulike forsøksfôrene

						p-verdi			
	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFQHZ	Zn × Fett ^α	Zn ^α	Fett ^α	Ω [§]
APOA4	1,41±1,28	1,22±0,67	1,05±0,95	1,09±0,46	1,25±0,41	0,71	0,35	0,42	0,44
APOB	0,1±0,16	0,08±0,15	0,15±0,22	0,13±0,19	0,02±0,03	0,95	0,75	0,13	0,42
CD36	0,4±0,68	0,31±0,37	0,65±0,98	0,47±0,54	0,63±0,93	0,80	0,68	0,16	0,28
CPT1	1,53±0,45	1,51±0,52	1,38±0,5	1,6±0,55	2,06±1,07	0,27	0,62	0,91	0,38
DGAT1	0,42±0,76	0,29±0,35	0,64±0,95	0,41±0,52	0,49±0,93	0,54	0,80	0,34	0,92
FABP2	1,3±0,75	1,37±0,73	1,21±0,72	0,96±0,39	1,34±0,8	0,31	0,82	0,21	0,84
FATP4	0,67±1,19	0,36±0,44	1,49±2,39	1,07±1,75	0,95±1,2	0,49	0,83	0,19	0,34
FATP6	0,46±0,73	0,28±0,29	0,72±0,98	0,44±0,53	0,57±0,96	0,49	0,64	0,30	0,92
MGAT2	0,78±0,63	0,77±0,39	0,94±0,87	0,87±0,57	1,3±1,48	0,75	0,30	0,66	0,61
MT A	1,52±1,33	0,49±0,35	1,97±2,63	0,7±0,36	2,26±1,54	0,44	0,00	0,29	0,24
MT B	1,34±1,74	0,52±0,44	1,26±1,65	0,66±0,5	1,35±1,34	0,68	0,16	0,65	0,35
MTF1	0,45±0,83	0,2±0,23	0,69±0,98	0,41±0,56	0,48±0,94	0,31	0,55	0,35	0,92
MTP	1,33±0,8	1,32±0,54	1,45±0,7	1,19±0,43	1,37±0,55	0,48	0,76	0,98	0,57
NPC1L1	1,07±0,41	1,06±0,31	1,21±0,33	1,31±0,57	1,09±0,44	0,93	0,98	0,12	0,76
ZIP14	1,36±0,92	1,12±0,49	1,45±1,05	1,26±0,61	1,12±0,57	0,77	0,82	0,65	0,70
ZIP4	0,56±0,41	1,13±0,67	0,61±0,42	0,89±0,85	0,5±0,35	0,22	0,04	0,47	0,79
ZIP5	0,46±0,72	0,36±0,36	0,7±0,96	0,53±0,63	1,04±1,57	0,63	0,77	0,26	0,15
ZnT1	0,5±0,67	0,36±0,31	0,72±0,94	0,52±0,59	1,02±1,51	0,53	0,88	0,33	0,74
ZnT2	0,03±0,06	0,04±0,07	0,01±0,02	0,05±0,15	0,03±0,07	0,33	0,68	0,21	0,93
ZnT4	0,43±0,75	0,32±0,34	0,66±0,97	0,48±0,6	0,9±1,47	0,45	0,83	0,33	0,49
ZnT5	0,46±0,77	0,25±0,26	0,68±0,98	0,43±0,54	0,97±1,89	0,64	0,58	0,33	0,74
ZnT6	0,75±0,7	0,87±0,82	0,88±0,97	1,06±0,76	2,04±2,1	0,57	0,08	0,71	0,12
ZnT7	0,92±0,36	0,84±0,18	1,18±0,82	0,97±0,43	1,2±0,82	0,90	0,52	0,38	0,83

Gene expression results were normalized; Values mean ± SD (n = 12); α: Scheirer-Ray-Hare test; §: Mann-Whitney U test; APOA4: apolipoprotein A-IV; APOB: apolipoprotein B; CD36: cluster of differentiation 36; CPT1: carnitine O-palmitoyltransferase 1; DGAT1: diglyceride acyltransferase 1; FABP2: fatty acid-binding protein 2; FATP4: fatty acid transporter protein 4; FATP6: fatty acid transporter protein 6; MGAT2: monoacylglycerol O-acyltransferase 2; MT A: metallothionein A; MT B: metallothionein B; MTF1: metal regulatory transcription factor 1; MTP: microsomal triglyceride transfer protein; NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like 1; ZIPs: Zrt/Irt-like proteins; ZnTs: ; Zinc transporters.

Filetkvalitet

LZ-gruppene hadde signifikant lavere kondisjonsfaktor og høyere slakteutbytte enn HZ-gruppene, men det var ingen diett-effekt på filetutbytte (66).

Forekomsten av mørke flekker var generelt lav (9,7 %), og det var ingen signifikante forskjeller mellom fôrgruppene (66).

Fasthet i muskel, målt instrumentelt, ble ikke signifikant påvirket av diett, selv om LZ-gruppene tenderte å ha numerisk lavere fasthet enn HZ, og Ω3 fastere muskel enn HFHZ. Ved bruk av individ som replikat hadde LZ signifikant (p<0,05, data ikke vist) lavere fasthet i muskel enn HZ, og Ω3 tenderte (p=0,069, data ikke vist) å ha fastere muskel enn HFHZ (66).

Filetfarge målt instrumentelt var ikke påvirket av fett eller zink-nivå, men Ω3-gruppen hadde signifikant høyere rødfarge og chroma/metning enn HFHZ-gruppen. Ved enveis ANOVA av alle fem dietter samlet,

hadde homogenat fra HFΩHZ-gruppen signifikant høyere rødfarge (høyere a^* -verdi) sammenlignet med alle andre grupper, og også mer rødfarge (lavere hue) enn HFHZ, HFLZ og LFLZ ($p < 0,05$, data ikke vist).

Astaxanthin-nivået i muskelen var ikke signifikant påvirket av diett, selv om det numerisk tenderte å være lavere i LF-gruppene, og høyere i HFΩHZ gruppen. Ved toveis ANOVA av alle fem dietter samlet var forskjellen mellom LF og HF signifikant ($p < 0,05$, data ikke vist).

Samlet tyder resultatene på at lavt Zn-nivå kan påvirke fasthet i muskel negativt og at økt Ω3 gir bedre filetfarge.

Tabell 67 Resultater fra analyse av filetkvalitet. Data (n=3) er vist som gjennomsnitt ± standardfeil og er analysert ved toveis ANOVA med interaksjon for HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ, og ved enveis ANOVA for sammenligning av HFHZ og HFΩHZ.

	HFHZ	HFLZ	LFHZ	LFLZ	HFΩHZ	Zn x Fett	<i>p-verdi</i>		
							Zn	Fett	Ω3
Rundvekt (kg)	4,55±0,24	4,28±0,23	4,77±0,25	4,43±0,25	4,81±0,26	0,71	0,008	0,063	0,096
Sløydvekt (kg)	3,89±0,21	3,67±0,2	4,08±0,22	3,82±0,22	4,11±0,22	0,77	0,014	0,063	0,102
Lengde (cm)	68,8±1	67,8±1	69,2±1,1	68,4±0,9	69,8±1	0,76	0,019	0,14	0,14
Kondisjonsfaktor	1,37±0,02	1,35±0,02	1,41±0,02	1,36±0,02	1,39±0,02	0,33	0,021	0,13	0,49
Slakteutbytte (%)	85,4±0,2	85,8±0,2	85,5±0,3	86±0,2	85,4±0,2	0,79	0,01	0,53	0,83
Filletytbytte (% av rundvekt)	63,3±0,4	63,2±0,5	63,4±0,5	63,8±0,3	63±0,4	0,5	0,63	0,29	0,68
Filletytbytte (% av sløydvekt)	74,1±0,4	73,7±0,5	74,2±0,5	74,2±0,4	73,7±0,4	0,5	0,53	0,34	0,51
Mørke flekker, andel fisk med flekk	0,15±0,08	0,07±0,04	0,08±0,05	0,08±0,06	0,1±0,07	0,34	0,34	0,56	0,45
Mørke flekker, score (0 til 8)	0,5±0,31	0,17±0,13	0,18±0,12	0,15±0,11	0,27±0,21	0,33	0,24	0,28	0,41
Mørke flekker, # muskelsegmenter	0,7±0,4	0,3±0,2	0,4±0,2	0,4±0,3	0,4±0,3	0,33	0,41	0,54	0,41
Fasthet i muskel									
Bruddstyrke (N)	8,8±0,4	8,5±0,5	9,1±0,3	8,8±0,4	9,8±0,5	0,89	0,36	0,39	0,2
Kompresjon til 60% av filettykkelse (Nxsec)	3,3±0,2	3,2±0,2	3,3±0,1	3,2±0,2	3,6±0,2	0,98	0,39	0,83	0,21
Filetfarge; instrumentell fargemåling av homogenat og kjemisk analyse av astaxanthin									
Lyshet (L^* -verdi)	63,5±0,5	63,5±0,4	61,7±0,3	63,3±0,4	62,9±0,5	0,36	0,35	0,25	0,55
Rødhet (a^* -verdi)	12±0,3	12,1±0,3	12,1±0,3	11,7±0,3	13±0,3	0,14	0,4	0,52	0,019
Gulhet (b^* -verdi)	16,9±0,3	16,9±0,2	16,5±0,2	16,5±0,3	17,4±0,2	0,8	0,99	0,066	0,054
Hue/kulør	54,8±0,4	54,5±0,3	53,8±0,3	54,9±0,4	53,2±0,3	0,13	0,31	0,42	0,052
Chroma/metning	20,7±0,4	20,8±0,4	20,5±0,3	20,2±0,4	21,7±0,4	0,36	0,68	0,12	0,018
Astaxanthin (mg/kg)	3,07±0	3,13±0	2,97±0	2,9±0	3,2±0	0,46	1	0,09	0,37

5.7.5 Oppsummering hovedfunn AP 3

Ytelse: Det var ingen signifikante forskjeller i fôrinntak mellom diettgruppene i periode I eller II. Diettgruppen med høyest omega-3 fettsyrenivå (11 % av totale fettsyrer) viste en tendens til høyere fôrinntak etter avlusning. Ingen signifikante forskjeller i tilvekst (SGR og TGC) ble observert i første vekstperiode (oktober 2021 - januar 2022). I andre vekstperiode (januar - juni 2022) oppnådde gruppen med høyest omega-3 fettsyrenivå og gruppen med lavt fettinnhold og høyt sinknivå de høyeste vekstratene. Gruppen med 11 % EPA+DHA hadde høyere sluttvekt enn gruppene med 6,6 % EPA+DHA. Gruppen fôret med høyt fettinnhold og lavt sinknivå (HFLZ) presterte dårligst, med signifikant lavere sluttvekt enn HFΩHZ- og LFHZ-gruppene.

Fettretensjon: Total fettretensjon var signifikant høyere i første vekstperiode (ca. 72 %) sammenlignet med andre vekstperiode (ca. 65 %), uten signifikante effekter av diettene. Atlantisk laks deponerer mer fett i muskel og har økt retensjon av lipider ved avtagende daglengde om høsten, med reduserte lipidnivåer og lavere kondisjonsfaktor utover våren. Retensjonen av EPA var signifikant høyere i perioden oktober 2021 til januar 2022 enn i perioden januar til juni 2022 i diettgruppene HFHZ, HFLZ, LFHZ og LFLZ. HFΩHZ-gruppen viste ingen sesongvariasjon i retensjon av EPA+DHA, med høyere retensjon i periode II. En mulig årsak til stabil retensjon av EPA+DHA i HFΩHZ-gruppen kan være høyere nivå av mettet fett (ca. 22 %) sammenlignet med de andre gruppene (ca. 17 %).

Zn status: Hos laks fra 1,6 kg til 4,5 kg, ga det å redusere fettinnhold fra 38 % til 33 % forbedret Zn- og Se-status, men det å øke innholdet av langkjedede n-3 fettsyrer i fôret forbedret Zn-status. Det laveste fôrnivået på 100 mg Zn kg⁻¹ brukt i denne studien synes å være for lavt for laksen. Et nivå på 180 mg Zn kg⁻¹ i fôret ser ut til å være tilstrekkelig under forholdene fisken ble utsatt for i dette forsøket. Den forbedrede Zn-statusen ved bruk av lavfett diett eller økt EPA+DHA i dietten kan vise seg å være essensiell under mer utfordrende oppdrettsbetingelser, da betydningen av Zn og EPA+DHA for skinnhelse ble tydeliggjort i AP1.

Helse: Dødeligheten var lav i alle diettgrupper, uten signifikante forskjeller. Gruppen fôret med høyt fettinnhold og lavt sinknivå (HFLZ) hadde en tendens til høyere dødelighet (4 %) sammenlignet med de andre gruppene (1,2-1,8 %). Ytre velferdsindikatorer viste ingen signifikante forskjeller mellom grupper, men det var en tendens til høyere forekomst av snuteskader i gruppene fôret lavt sinknivå (HFLZ og LFLZ). Helsescoreing av indre organer viste ingen signifikante forskjeller, men lavfettgruppene viste en tendens til høyere scoring for moderat betennelse i baktarmen. De fleste fisk i alle diettgrupper viste lavgradige endringer for hjertehistopatologisk score (score 0–1,5), med høyere score (2–3,5) mindre hyppig. Ventrikkel viste mer betydelige endringer enn atrier, med score opp til 3,5 i noen tilfeller. HFΩHZ hadde den laveste gjennomsnittlige scoren, Den numerisk lavere scoren i HFΩHZ-gruppen antyder mulige kardioprotektive effekter av en diett rik på omega-3-fettsyrene EPA og DHA og med lav n-6/n-3 ratio.

Forekomst arteriosklerose: Histologisk analyse av fikserte vevsprøver fra koronararterien og ventralaorta ble utført for å kartlegge forekomst av arteriosklerose. Arteriosklerose ble funnet hos 95 % av individene, uten signifikante forskjeller mellom diettgruppene. Det var en tendens til høyere alvorlighetsgrad i gruppen fôret høyfett diett med lavt sinknivå (HFLZ), som også hadde flest individer med høy histopatologisk score. Arteriosklerose kan føre til forsnævring av koronararterien, som forsyner ventrikkelen med oksygenrikt blod. Ventrikkel viste mer alvorlig grad av histopatologisk score enn atrier, noe som kan være relatert til arteriosklerose i koronararterien. Gruppen med høyt fettinnhold og lavt sinkinnhold (HFLZ) utmerket seg negativt.

Filetkvalitet: Lavsink-gruppene hadde signifikant lavere kondisjonsfaktor og høyere slakteutbytte enn høysink-gruppene, men ingen diett-effekt på filetutbytte. Forekomsten av mørke flekker var lav (9,7 %) uten signifikante forskjeller mellom fôrgruppene. Fasthet i muskel ble ikke signifikant påvirket av diett,

men lavsink-gruppene hadde tendens til lavere fasthet, og høy Ω3-gruppen hadde fastere muskel enn høyfett høysink gruppen. Filetfarge var ikke påvirket av fettnivå eller sinknivå, men høyΩ3-gruppen hadde bedre rødfarge. Astaxanthin-nivået i muskel var lavere i LF-gruppene og høyere i HFΩHZ-gruppen. Resultatene tyder på at lavt Zn-nivå kan påvirke muskelens fasthet negativt, og at økt Ω3 gir bedre filetfarge.

5.7.6 Referanser AP 3:

- Amornrut Ploysangam, Grace A. Falciglia, Bonnie J. Brehm, Effect of Marginal Zinc Deficiency on Human Growth and Development, *Journal of Tropical Pediatrics*, Volume 43, Issue 4, August 1997, Pages 192–198,
- BERGE, G. M., YTTEBORG, E., ØSTBYE, T.-K., SUNDH, H., RUD, I., SVEEN, L., BÆVERFJORD, G., KARLSEN, C., KRASNOV, A., ØGAARD, J., SUNDELL, K., PEDERSEN, M., HALVORSEN, B., & RUYTER, B., 2019, Importance of nutrition for skin, intestine and gill health in Atlantic salmon,
- COUSINS, R. J., 1979, Regulatory aspects of zinc metabolism in liver and intestine, *Nutrition Reviews*, 37, 97-103,
- DUFNER-BEATTIE, J., WANG, F., KUO, Y.-M., GITSCHIER, J., EIDE, D., & ANDREWS, G. K., 2003, The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 33474-33481,
- EFSA 2014, Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed, *Efsa Journal*, 12, 3668,
- Farrell, A. P. (2002). Coronary arteriosclerosis in salmon: growing old or growing fast?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 723-735.
- Gamperl, A. K., & Farrell, A. P. (2004). Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *Journal of Experimental Biology*, 207(15), 2539-2550.
- GIUGLIANO, R., & MILLWARD, D. J., 1984, Growth and zinc homeostasis in the severely Zn-deficient rat, *British Journal of Nutrition*, 52, 545-560,
- Gammoh, N.Z.; Rink, L. Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients* **2017**, 9, 624. <https://doi.org/10.3390/nu9060624>
- JENSEN, L. B., WAHLI, T., MCGURK, C., ERIKSEN, T. B., OBACH, A., WAAGBØ, R., HANDLER, A., & TAFALLA, C., 2015, Effect of temperature and diet on wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Fish Physiology and Biochemistry*, 41, 1527-1543,
- KING, J. C., 1990, Assessment of Zinc Status, *The Journal of Nutrition*, 120, 1474-1479,
- KRÓL, E., KREJPCIO, Z., & CHMURZYNSKA, A., 2011, Folic Acid and Protein Content in Maternal Diet and Postnatal High-Fat Feeding Affect the Tissue Levels of Iron, Zinc, and Copper in the Rat, *Biological Trace Element Research*, 144, 885-893,
- Kryvi, Poppe, and T. Poppe. "Fiskeanatomy, 2. utgave. ed." *Fagbokforlaget, Bergen* (2021).
- KUCUKBAY, Z., YAZLAK, H., SAHIN, N., TUZCU, M., NURI CAKMAK, M., GURDOGAN, F., JUTURU, V., & SAHIN, K., 2009, Zinc picolinate supplementation decreases oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture*, 257, 465-469,
- LARSSON, Thomas, et al. Fillet quality and gene transcriptome profiling of heart tissue of Atlantic salmon with pancreas disease (PD). *Aquaculture*, 2012, 330: 82-91.
- Lutfi, E., Berge, G. M., Bæverfjord, G., Sigholt, T., Bou, M., Larsson, T., ... & Ruyter, B. (2023). Increasing dietary levels of the n-3 long-chain PUFA, EPA and DHA, improves the growth, welfare, robustness and fillet quality of Atlantic salmon in sea cages. *British Journal of Nutrition*, 129(1), 10-28.
- MA, S., & WANG, W.-X., 2024, Significance of zinc re-absorption in Zn dynamic regulation in marine fish revealed by pharmacokinetic model, *Environmental Pollution*, 363, 125106,
- MAAGE, A., & JULSHAMN, K., 1993, Assessment of zinc status in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) by measurement of whole body and tissue levels of zinc, *Aquaculture*, 117, 179-191,

- Mørkøre T (2012) Filet av oppdrettslaks: Kvalitetsavvik og årsakssammenhenger. FHF-prosjekt 900339. *Report 17/2012*, Nofima, Ås.
- OLSVIK, P., LIE, K., JORDAL, A.-E., NILSEN, T., & HORDVIK, I, 2005, Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon, *BMC Mol Biol*, 6, 21,
- Magdalena Ogluszka 1, Paweł Lipiński 2, Rafał Radosław Starzyński (2020) Interaction between iron and omega-3 fatty acids metabolisms: where is the cross-link? DOI: 10.1080/10408398.2020.1862047
- Poppe, T. T., Johansen, R., & Tørud, B. (2002). Cardiac abnormality with associated hernia in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*, 50(2), 153-155.
- PRABHU, A, J, P., LOCK, E.-J., HEMRE, G.-I., HAMRE, K., ESPE, M., OLSVIK, P, A., SILVA, J., HANSEN, A.-C., JOHANSEN, J., SISSENER, N, H, & WAAGBØ, R, 2019, Recommendations for dietary level of micro-minerals and vitamin D3 to Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt when fed low fish meal diets, *PeerJ*, 7, e6996,
- PRABHU, P, A, J., HOLEN, E., ESPE, M., SILVA, M, S., HOLME, M.-H., HAMRE, K., LOCK, E.-J, & WAAGBØ, R, 2020, Dietary selenium required to achieve body homeostasis and attenuate pro-inflammatory responses in Atlantic salmon post-smolt exceeds the present EU legal limit, *Aquaculture*, 526, 735413,
- RIDER, S, A., DAVIES, S, J., JHA, A, N., FISHER, A, A., KNIGHT, J, & SWEETMAN, J, W, 2009, Supra-nutritional dietary intake of selenite and selenium yeast in normal and stressed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): implications on selenium status and health responses, *Aquaculture*, 295, 282-291,
- Kjell-Arne Rørvik, Jens-Erik Dessen, Magnus Åsli, Magny S Thomassen, Kjellrun G Hoås, Turid Mørkøre (2018) Low body fat content prior to declining day length in the autumn significantly increased growth and reduced weight dispersion in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. <https://doi.org/10.1111/are.13650>
- SELVAM, C., ANTONY J PRABHU, P., LUTFI, E., SIGHOLT, T., NORBERG, B., BÆVERFJORD, G., ROSENlund, G., RUYTER, B, & SISSENER, N, H, 2022, Long-term feeding of Atlantic salmon with varying levels of dietary EPA+DHA alters the mineral status, but does not affect the stress responses after mechanical delousing stress, *British Journal of Nutrition*, 1-42,
- Sissener, N. H., Rosenlund, G., Larsson, T., Sæle, Ø., Ruyter, B., Philip, A. J. P., & Stubhaug, I. Saturated Fat and Cholesterol in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Feeds are Important for Fish Performance, Fillet Quality and Colour. *Fillet Quality and Colour*.
- Saunders, R. L., Farrell, A. P., & Knox, D. E. (1992). Progression of coronary arterial lesions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a function of growth rate. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(5), 878-884.
- TENAUD, I., SAINTE-MARIE, I., JUMBOU, O., LITOUX, P, & DRENO, B, 1999, In vitro modulation of keratinocyte wound healing integrins by zinc, copper and manganese, *British Journal of Dermatology*, 140, 26-34,
- VERA, L, M., HAMRE, K., ESPE, M., HEMRE, G.-I., SKJÆRVEN, K., LOCK, E.-J., PRABHU, A, J., LEEMING, D., MIGAUD, H, & TOCHER, D, R, 2020, Higher dietary micronutrients are required to maintain optimal performance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed a high plant material diet during the full production cycle, *Aquaculture*, 528, 735551,
- WEAVER, B, P., DUFNER-BEATTIE, J., KAMBE, T, & ANDREWS, G, K, 2007, Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse *Slc39a4* and *Slc39a5* zinc transporters (*Zip4* and *Zip5*),
- YARAHMADI, S, S., SILVA, M, S., HOLME, M.-H., MORKEN, T., REMØ, S., ARAUJO, P., LOCK, E.-J., WAAGBØ, R, & PRABHU, P, A, J, 2022, Impact of dietary zinc and seawater transfer on zinc status, availability, endogenous loss and osmoregulatory responses in Atlantic salmon smolt fed low fish meal feeds, *Aquaculture*, 549, 737804,

- ZHENG, L., FENG, L., JIANG, W.-D., WU, P., TANG, L., KUANG, S.-Y., ZENG, Y.-Y., ZHOU, X.-Q. & LIU, Y, 2018a, Selenium deficiency impaired immune function of the immune organs in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Fish & shellfish immunology*, 77, 53-70,
- ZHENG, L., JIANG, W.-D., FENG, L., WU, P., TANG, L., KUANG, S.-Y., ZENG, Y.-Y., ZHOU, X.-Q. & LIU, Y, 2018b, Selenium deficiency impaired structural integrity of the head kidney, spleen and skin in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), *Fish & shellfish immunology*, 82, 408-420,

6 Sentrale hovedfunn fra hele prosjektet

Samspill Zn, fettnivå, EPA+DHA i fôret til laks i merder i sjø

- Redusert fettnivå og økt EPA +DHA i fôret er begge faktorer som forbedrer Zn-retensjon og Zn status i ulike vev i fisken, noe som er viktig på grunn av øvre grense for tilsetning.
 - Mekanismene bak dette er fortsatt uklare, da vi hovedsakelig ser effekt i langtidsforsøk og ikke i korttidsforsøk fokusert på opptak i tarm. Dette tyder på at effekt av fett og fettsyrer på regulering av Zn homeostase enten skjer på andre nivåer (deponering i vev, ekskresjon), eller at effekt i tarm er svært liten men akkumulerer over tid.
- Gruppen fôret 11 % EPA+DHA hadde høyere sluttvekt, bedre filèt-kvalitet og tendens til bedre hjertehelse enn gruppene fôret 6,6 % EPA+DHA.

Mettet fett og kolesterol

- Lavt mettet fett (10 % SFA av totale fettsyrer) er utilstrekkelig for optimal vekst hos atlantisk laks ved 12 °C, sammenlignet med 24 % SFA, mens tilsats av kolesterol i noen grad kan kompensere for lavt mettet fett.
- 15 % SFA virker tilstrekkelig for god vekst, men vi mangler data for å gi en minimumsanbefaling for filetkvalitet.
- Lavt SFA forårsaker høyt væsketap i fileten etter frysing og tining, mens lavt SFA og lavt kolesterol i kombinasjon reduserer filetenes fasthet og farge. Dette indikerer at kolesterol bør tilsettes til basisdietter som har <500 mg/kg.

In vitro forsøk og korttidsforsøk

- DHA fremmet sinkopptak i tarmceller, spesielt ved lavere temperaturer.
- Kombinasjon av høyt sink- og omega-3-nivå akselererte skjellutvikling, økte bentetthet og forbedret sårheling hos lakseparr.
- Sink og DHA sammen økte keratocyttenes migreringspotensiale.

RAS/FT

- Fisk i RAS hadde lavere tilvekst, økt stress (høyere kortisol og eikosanoider) og endret fosfolipidmetabolisme.
- EPA-tilskudd reduserte stressmarkører i begge systemer.
- RAS-fisk fôret EPA viste moderat svekket barrierefunksjon i tarm og skinn.

7 Leveranser

Frist	Administrative leveranser
15.2.2021	Referat fra oppstartsmøte med prosjekt og referansegruppen
30.6.2021	Statusrapport til FHF
30.11.2021	Dialogmøte digitalt
31.12.2021	Statusrapport til FHF
09.02.2021	Referat fra møte med referansegruppen
19.01.2022	Artikkel publisert på Nofima/HI sine nettsider
30.6.2022	Statusrapport til FHF
19.5.2022	Referat fra møte med referansegruppen
31.12.2022	Referat fra møte med referansegruppen
31.12.2022	Statusrapport FHF
16.2.2023	Referat fra møte med referansegruppen
30.6.2023	Statusrapport FHF
18-19 april 2023	Dialogmøte (Ås)
30.12.2023	Statusrapport FHF
18.09.2024	Referat fra møte med referansegruppen
31.12.2024	Statusrapport til FHF
31.3.2025	Manuskripter til 3 vitenskapelige publikasjoner
3.4.2025	Avsluttende møte med referansegruppen og gjennomgang av sluttrapport
30.4.2025	Faglig sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer
30.4.2025	Administrativ sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer

7.1 Resultatmål/leveranser

Prosjektgruppen, representert ved forskningsinstitutt, universitet og industri, har i løpet av prosjektperioden lagt til rette for overføring av ny kunnskap til aktuelle industriaktører i havbruksnæringen ved jevnlig muntlige presentasjoner på dialogmøter og faglige konferanser. Prosjektet har bidratt med ny kunnskap om betydningen av fettnivå, omega-3 fettsyrer, mettede fettsyrer, kolesterol og sink i dietten og samspill mellom disse for å sikre laksen god ytelse og fra prosjektet vil hjelpe næringen til å forbedre fôrrecepter som igjen vil bidra til å styrke laksens tilvekst, helse og muskelkvalitet.

7.1.1 Presentasjoner

To dialogmøter har vært arrangert et i 2021 og et i 2023.

Presentasjoner Dialogmøte 18-19 april 2023, Nofima Ås.

- Elisabeth Ytteborg, Interaksjonseffekter mellom omega-3 fettsyrer og Zn på skinnhelse og sårtilheling.
- Esmail Lutfi, Effects of omega-3 fatty acids and Zn on fat metabolism in the liver.
- Gerd Berge, Effekter av økt EPA-nivå i fôr til laks i RAS versus FT på vekst og helse.
- Bente Ruyter, Laks i merder i sjø og samspill mellom fett, fettsyrer og Zn: Vekst, velferd, kvalitet, fettsyreretensjon.
- Anthony Prabhu Philip, Samspill mellom fett, fettsyrer og Zn: opptakskinetikk fra korttidsforsøk.
- Philip/IMR, Samspill mellom fett, fettsyrer og Zn: Sink status i ryggvirvler og helfisk fra laks i merder i sjø.

- Thea Morken/Skretting, Mettet fett og kolesterol i dietten og effekter på vekst og muskelkvalitet.
- Øystein Sæle/IMR, Mettet fett og kolesterol i dietten og effekter på fettsyresammensetning og helse.

7.1.2 Muntlige presentasjoner konferanser

- Bente Ruyter et al., Ulike nivåer av Zn og omega-3 fettsyrer i dietten til laks i ferskvann påvirker mineralisering av helkropp, fettdeponering, bein- og skinnhelse. Havbrukskonferansen 2022, Tromsø.
- Interaction between dietary fat and zinc on zinc utilization in Atlantic salmon, *Salmo salar*, Haohang Fang, Nini H. Sissener, Øystein Sæle, Trygve Sigholt, Bente Ruyter, Antony Prabhu Philip. Aquaculture Europe, Vienna. 18.-21. September 2023.
- Mettet fett og kolesterol i fôret er viktig for vekst, filetkvalitet og farge hos Atlantisk laks, Nini H. Sissener et al., Havbruk2024, Tromsø, 22.-24. Oktober 2024.
- Må vi tenke nytt rundt basisdietten til laksen? Nini H. Sissener og Bente Ruyter. AquaNext, Stavanger 10.-13. Juni 2024.
- Saturated fat and cholesterol in Atlantic salmon feeds are important for fish performance, fillet colour and quality. Nini H. Sissener et al. Det 15. Norske Fiskeernæringsseminar, Bergen 11.-12. Mars, 2024.
- B. Ruyter*, N. Sissener, T. Sigholt, T.K. Østbye, M. Bou, T. Larsson and G.M. Berge., EFFECT OF DIFFERENT DIETARY LEVELS OF FAT, FATTY ACIDS AND ZN ON GROWTH, HEALTH AND FILLET QUALITY OF SALMON IN SEA CAGES (FHF PROSJEKT NR 901566) Oral presentation European Aquaculture Society by Thomas Larsson. EAS Congress 2024, Copenhagen.
- Bente Ruyter et al. Omega-3 fatty acids in Atlantic salmon are important for fish performance, fillet colour and quality. Det 15. Norske Fiskeernæringsseminar, Bergen 11.-12. Mars, 2024.
- Maria Kristina Solvang et al., Effekter av fettnivå og omega-3 fettsyrer i dietten på hjertehelse i Atlantisk laks i merder i sjø. Det 15. Norske Fiskeernæringsseminar, Bergen 11.-12. Mars, 2024.
- B. Ruyter, N. Sissener, T. Larsson, T.K. Østbye, M. Bou, T. Sigholt and G.M. Berge (2024)
- Effekt av ulike fôringsnivåer av fett, fettsyrer og Zn på vekst, helse og filetkvalitet hos laks i merder Laks i merder i sjø (FHF prosjekt nr. 901566) Havbruk2024, Tromsø, 22.-24. Oktober 2024.
- Gerd Marit Berge¹, Kiran Subash, Elisabeth Ytteborg, Nini Sissener, Pedro Araujo, Tone-Kari Østbye, Bente, RAS og gjennomstrømming – effekt av system og ulike nivå av EPA i fôr til laks (FHF prosjekt nr. 901566) 6. norske fiskeernæringsseminaret, HI, Grand Hotel Terminus i Bergen 11.–12. Mars 2024.
- Bente Ruyter. RAS og gjennomstrømming – effekt av system og ulike nivå av EPA i fôr til laks. Smolt production converence Sunndalsøra 16 – 17 October, in Norway, 2024.
- Gerd Marit Berge, Kiran Subash, Elisabeth Ytteborg, Nini Sissener, Pedro Araujo, Tone-Kari Østbye, Bente Ruyter, RAS og gjennomstrømming – effekt av system og ulike nivå av EPA i fôr til laks.

7.1.3 Vitenskapelige artikler publisert knyttet til PhD grad av Fang (vedlegg 1-3)

Fang, H., Sissener, N. H., Philip, A. J. P., Rosenlund, G., Stubhaug, I., & Sæle, Ø. (2025). Interaction between dietary saturated fatty acids and cholesterol on mineral and fatty acid availability and postprandial lipids absorption kinetics in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 742250.

Fang, H., Sissener, N. H., Sæle, Ø., Sigholt, T., & Philip, A. J. P. (2024). The Interaction Between Dietary Fat Level, n-3 LC-PUFA, and Zinc on Their Postprandial Absorption Kinetics in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, 2024(1), 6173690.

7.1.4 Artikkel submitted til *Aquaculture*, tilgjengelig som pre-print gjennom SSRN

Sissener, N. H., Rosenlund, G., Larsson, T., Sæle, Ø., Ruyter, B., Philip, A. J. P., & Stubhaug, I. Saturated Fat and Cholesterol in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) Feeds are Important for Fish

Performance, Fillet Quality and Colour. Fillet Quality and Colour. Preprint available through SSRN

7.1.5 Planlagte artikler etter prosjektavslutning

- B. Ruyter*, N. H. Sissener, T. Sigholt, T.K. Østbye, M. Bou, T. Larsson and G.M. Berge., EFFECT OF DIFFERENT DIETARY LEVELS OF FAT, FATTY ACIDS AND ZN ON GROWTH, HEALTH AND FILLET QUALITY OF SALMON IN SEA CAGES.
- B. Ruyter et al., Gerd Marit Berge, Kiran Subash, Elisabeth Ytteborg, Nini H. Sissener, Pedro Araujo, Tone-Kari Østbye, RAS and FT – effect of production system and different dietary levels of EPA on growth and health.
- B. Ruyter et al., Different dietary levels of Zn and omega-3 fatty affects skin health in Atlantic salmon parr.
- N.H. Sissener et al. Effects of low dietary cholesterol and saturated fatty acids on tissue fatty acid composition, nutrient retention and liver lipid accumulation in Atlantic salmon.
- HaoHang Fang, Antony J. Prabhu Philip, Øystein Sæle, Bente Ruyter, Trygve Sigholt, Elisabeth Ytteborg, Nini H. Sissener. The long-term effect of dietary fat level, zinc and n-3 LC-PUFA on mineral status and intestinal zinc and fat transport of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reared in net pens.

7.1.6 Medieoppslag

Innhold (artikler fra 2022 to 17. sep. 2024)

- 17. sep. What is required for successful smolt production in the future? Fish Focus
- 16. sep. Nofima announces smolt production conference, The fish site
- 11. sep. Effect of eicosapentaenoic acid on innate immune responses in Springer Link
- 09. sep. Hva kreves for vellykket smoltproduksjon i fremtiden? Landbasedaq
- 25. mars 2024 Omega-3 futures in aquafeeds, Asua Culture Asia Pacific
- 04. jan. 2024 Nofima's research shows improved fillet quality, Aquafeed – Headline News
- 28. des. 2023 Long-chain marine fatty acids benefit health. Fish Focus – Exhibitions & Events
- 06. juni 2023 Insights into omega-3s in aquafeeds. The fish site
- 20. jan. 2022 DHA promotes salmon fillet quality reducing dark spots, Aquafeed – News
- 20. jan. 2022 DHA fatty acids can reduce melanin spots and. The fish site – The Fish Site
- 19. jan. 2022 DHA-fettsyren fremmer kvalitet på laksefilet, NTB Kommunikasjon