

# Nye omega-3-kilder i fôr til laks

## Faglig sluttrapport

Bente Ruyter, Katerina Kousoulaki, Aleksei Krasnov, Nini Sissener, Cedric Simon, Turid Mørkøre, Marta Bou Mira, Tone Kari Østbye, Grethe Bæverfjord, Monica Sanden, Odd Helge Romarheim, Mats Carlehög, Trine Ytrestøyl, Esmail Lutfi Royo og Gerd Berge





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

Nofima har om lag 350 ansatte.

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

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

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

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunnalsøra:**

Sjølsengvegen 22  
NO-6600 Sunndalsøra

**Alta:**

Kunnskapsparken, Markedsgata 3  
NO-9510 Alta

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140  
E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)  
Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**

# Rapport

<p><i>Tittel:</i> <b>Nye omega-3-kilder i fôr til laks</b></p>	<p>ISBN: 978-82-8296-593-4 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> New omega-3 sources in diets of Atlantic salmon</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 14/2019</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Bente Ruyter (prosjektleder), Katerina Kousoulaki, Aleksei Krasnov, Nini Sissener (HI), Cedric Simon (CSIRO), Turid Mørkøre, Marta Bou Mira, Tone Kari Østbye, Grethe Bæverfjord, Monica Sanden (HI), Odd Helge Romarheim, Mats Carlehög, Trine Ytrestøyl, Esmail Lutfi Royo og Gerd Berge</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> <b>Konfidensiell</b></p> <p><i>Dato:</i> 16. mai 2019</p>
<p><i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 74</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF 901037</p>
<p><i>Stikkord:</i> Omega 3 fettsyrer, laks,</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 11230</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Dette prosjektet har hatt som hovedmål å skaffe kunnskap om utnyttelse av to nye DHA-kilder i fôr til laks, henholdsvis olje fra genmodifisert raps og mikroalgen <i>Schizochytrium sp.</i> Prosjektet har hatt et spesielt fokus på eventuelle effekter på fiskens ytelse, kvalitet og helse.</p> <p>Samlet sett tyder resultatene på at både omega-3 fettsyrerik olje fra genmodifisert raps, omega-3 canola og DHA rik <i>Schizochytrium sp.</i> (heterotrof mikroalge) er trygge nye alternative kilder til omega-3 fettsyrer i fôr til laks, som fører til god ytelse, kvalitet, sammensetning og helse.</p>	
<p><i>English summary:</i></p> <p>The main goal of this project was to acquire knowledge about the utilization of two new DHA sources, respectively, oil from genetically modified rapeseed and microalgae <i>Schizochytrium sp.</i> in diet of Atlantic salmon. The project has focused on fish performance, quality and health.</p> <p>Overall, the project results suggest that both oil from genetically modified rapeseed, omega-3 canola and <i>Schizochytrium sp.</i> (heterotrophic microalgae) are safe new alternative sources of omega-3 fatty acids in feed for salmon, which essentially lead to good performance, quality, composition and health of the fish</p>	

## **Forord**

Prosjektet ble opprettet som et resultat av fellesutlysningen NFR/FHF 2014 "Joint call for research proposals: future sources of EPA and DHA for fish feed".

<http://www.fhf.no/nyheter/2014/july/1207/joint-call-for-proposals-future-sources-of-epa-and-dha-for-fish-feed-research-projects/>»

Prosjektet ble vurdert av forskningsrådets ekspertpanel.

Prosjektet har hatt et totalt budsjett på ca 15, 5 mill NOK, hvorav 10 mill NOK er finansiert av FHF som oppdragsgiver.

# Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b>	<b>3</b>
2.1	Faglig bakgrunn for prosjektet	3
2.2	Prosjektets omfang	4
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b>	<b>7</b>
3.1	Prosjektets effektmål	7
3.2	Prosjektets resultatmål	7
3.2.1	Hovedmål	7
3.2.2	Resultatmål	7
3.2.3	Nytteverdi	7
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b>	<b>8</b>
4.1	Arbeidspakker	8
4.2	Metodebeskrivelse WP 1 og WP 3	8
4.2.1	WP 3, analyse av næringsstoffer og fremmedstoff i DHA-CA olje og en standard canolaolje	8
4.2.2	WP 1, Produksjon og sammensetning av forsøksfôr til ferskvannsforskene	9
4.2.3	Fiskeforsøk ferskvann Norge, lav vanntemperatur, 12°C	13
4.2.4	Fiskeforsøk ferskvann Australia, høy vanntemperatur, 16°C	14
4.3	Metodebeskrivelse WP 2, Forsøk med DHA-CA fôr til stor laks i sjøvann i kar på land	14
4.3.1	Forsøksfôr til stor laks i sjøvann	14
4.3.2	Fiskeforsøk i sjøvann	17
4.4	Metodebeskrivelse WP 4. Forsøk med <i>Schizochytrium sp.</i> i fôr til laks i sjø	17
4.4.1	Produksjon og sammensetning av fôr til sjøforsøk	17
4.4.2	Forsøk med mikroalge i fôr til laks i merder i sjø	19
4.4.3	Miljøbetingelser i forsøksperiode i sjø	20
4.4.4	Kvalitetsanalyser av muskel	21
4.4.5	Sensorisk analyse	21
4.5	Metodebeskrivelse for analyser av fiskematerialet i WP1, WP 2 og WP 4:	21
4.5.1	Vekst og organindeks	21
4.5.2	Kjemiske analyser	22
4.5.3	Enzymanalyser	22
4.5.4	Genuttrykk	22
4.5.5	Microarray analyse	22
4.5.6	Lever metabolomics	22
4.5.7	Astaxanthin i muskel	23
4.5.8	Skinnfarge	23
4.5.9	Statistikk	23
<b>5</b>	<b>Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon</b>	<b>24</b>
5.1	Forsøk med olje fra modifisert raps (DHA-CA) i fôr til liten laks i ferskvann	24
5.1.1	Næringsstoffer og fremmedstoff i DHA-CA	24
5.1.2	Vekst og biometri av forsøksfisk	25
5.1.3	Fett og fettsyresammensetning av vev og organer	27

5.1.4	Helsemarkører i lever og tarm .....	33
5.1.5	Generell diskusjon og konklusjon ferskvannsforsøk .....	36
5.2	Olje fra modifisert raps i fôr til stor laks i sjøvann .....	37
5.2.1	Fettsyresammensetning av diettgruppene .....	37
5.2.2	Vekst, fôrfaktor, slakteparametere .....	37
5.2.3	Fordøyelighet av fett, fettsyrer og nitrogen.....	38
5.2.4	Retensjon av næringsstoff i helkropp.....	40
5.2.5	Fettsyresammensetning .....	42
5.2.6	Muskelkvalitet .....	46
5.2.7	Immunstimulering med LPS og Poly-IC.....	47
5.2.8	Prostaglandiner og resolviner i plasma .....	49
5.2.9	Generell diskusjon og konklusjon av dose respons forsøket med DHA-CA i sjøvann .....	50
5.3	WP 4: Langtidseffekter av å erstatte fiskeolje med DHA rik <i>Schizochytrium sp.</i> i fôr til Atlantisk laks.....	51
5.3.1	Vekst og fôrutnyttelse .....	51
5.3.2	Fordøyelighet av fett, protein og energi: .....	52
5.3.3	Fettsyresammensetning av filet og lever .....	53
5.3.4	Muskelkvalitet .....	55
5.3.5	Microarray analyse av lever og midttarm .....	57
5.3.6	Histologisk undersøkelse av tarm.....	60
5.3.7	Generell diskusjon og konklusjon av forsøket med mikroalge i merder i sjø.....	63
<b>6</b>	<b>Hovedfunn .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Leveranser .....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>REFERANSER .....</b>	<b>68</b>

# 1 Sammendrag

Etterspørselen etter marine oljer med de helsefremmende omega-3 fettsyrene EPA og DHA øker på det internasjonale markedet. Produksjonen av disse marine oljene har imidlertid vært relativt stabil helt siden 1970-tallet. Tilgjengeligheten av omega-3 fettsyrer er i dag en av de største begrensningene for videre vekst i akvakulturnæringen. Nye kilder til de flerumettede omega-3 fettsyrene, som for eksempel olje fra genmodifiserte plantevekster og naturlige mikroalger, er viktige for å møte akvakultur-industriens behov for EPA og DHA i fremtiden. Dette prosjektet har hatt som hovedmål å skaffe kunnskap om utnyttelse av to svært lovende nye DHA-kilder, henholdsvis olje fra genmodifisert raps, omega-3 canola fra Nuseed Pty Ltd (Australia) og *Schizochytrium sp.* (heterotrof mikroalge) fra Alltech Inc som begge vil være tilgjengelig i kommersiell skala i nær fremtid. Prosjektet har et spesielt fokus på fiskens ytelse, kvalitet og helse.

Resultater så langt viser at den modifiserte rapsoljen har en gunstig fettsyreprofil sammenlignet med konvensjonelle planteoljer, med høye nivåer av omega-3 fettsyrene 18:3n-3 og DHA. Nivåer av fytosteroler, vitamin E og mineraler i den omega-3 modifiserte rapsoljen faller innenfor den naturlige variasjonen for kommersielle rapsoljer. Det ble ikke funnet nivåer over LOQ av fremmedstoffer som plantevern-midler, mykotoksiner og PAH. Det ble heller ikke påvist plante-DNA.

Det er gjennomført to fôringsforsøk med laks i ferskvann hvor formålet har vært å evaluere eventuell risiko ved bruk av omega-3 rik modifisert rapsolje på fiskens ytelse, sammensetning og helse ved to vanntemperaturer. Fisken økte vekten ca 20 ganger ved 16°C og 10 ganger ved 12°C. Begge forsøkene viste høy overlevelse på tvers av alle diettgrupper og tilsvarende tilvekst i laks fôret med en fiskeoljediett som i laks fôret med omega-3 modifisert rapsolje. Laksen fôret med omega-3 modifisert rapsolje hadde samme EPA + DHA nivå i helkropp som laks som ble fôret med fiskeolje. Analyser av genuttrykk viste ingen dietteffekter på gener assosiert med toksiske effekter og stress. Noen gener relatert til lipid og sterol metabolisme var forskjellig uttrykt, men det var kun var effekt av hvor mye olje som var tilsatt, ikke av type olje. Forsøket viste i tillegg at det ikke var noen forskjell i uttrykk og enzymaktivitet av ulike helsemarkører i lever, tarm og muskel mellom de ulike diettgruppene.

Det er også gjennomført et forsøk med laks fra 500 g til 1,2 kg i kar på land i sjøvann hvor målet var å studere hvordan omega-3 modifisert rapsolje i fôret påvirket vekst, sammensetning og filetkvalitet. Laksen fikk fôr med økende innblanding av omega-3 modifisert rapsolje, og tilsvarende redusert innblanding av standard rapsolje. Tilnærmet lik vekst og fôrintak mellom de ulike diettgruppene ble observert. Økende innblanding av omega-3 modifisert rapsolje i dietten førte til økte filetnivåer av 18:3n-3, EPA, DHA og økt ratio av n3 / n6 fettsyrer og bedret skinn- og filetfarge.

I et samarbeid med prosjektet «A til omega-3, Forskningsråd prosjekt nr 234057» har vi studert langtids effekter av å erstatte fiskeolje, som kilde til omega-3 fettsyrene EPA og DHA, med *Schizochytrium sp.* biomasse, som kilde til DHA i dietten (6 % i fôret) til Atlantisk laks fra startfôring i ferskvann og frem til slaktestørrelse på 3,5 kg i sjø. Forsøksperioden varte i 2 år, men kun den siste perioden på 13 måneder i sjø rapporteres her. De to eksperimentelle diettene inneholdt relativt lave nivåer av fiskemel (10 %) og lik mengde fordøyelig protein, lipid og energi, like nivåer av EPA + DHA (ca 1,3 % i fôret) og likt forhold mellom n-3/n-6-fettsyrer. Fiskens vekst, sammensetning, muskelkvalitet og helse ble evaluert ved slakt når fisken var ca 3,5 kg. Forsøket viste ingen forskjeller i overlevelse eller fôrutnyttelse mellom de to diettgruppene, men laks fôret mikroalgedietten hadde høyere vekstrate i forsøket sammenlignet med laksen fôret med fiskeolje. Sensorisk panel bedømte lukt, farge,

smak og konsistens Resultatet viste at muskel til laksen fôret med mikroalge i dietten hadde noe rødere filet, høyere pigmentinnhold, fastere tekstur og mindre saftig muskel enn laksen i fiskeoljegruppen. Det ble ikke funnet forskjeller i smak og lukt.

Samlet sett tyder resultatene på at både olje fra genmodifisert rapsolje, omega-3 canola og *Schizochytrium sp.* (heterotrof mikroalge) er trygge nye alternative kilder til omega-3 fettsyrer i fôr til laks og som bidrar til god ytelse, kvalitet, sammensetning og helse i fisken.



## 2 Innledning

### 2.1 Faglig bakgrunn for prosjektet

Prosjektet har hatt som hovedmål å skaffe kunnskap om utnyttelse av to svært lovende nye omega-3 fettsyre-kilder, henholdsvis olje fra genmodifisert raps og biomasse fra mikroalgen *Schizochytrium sp.* i fôr til laks

Etterspørselen etter marine oljer med de helsefremmende omega-3 fetttsyrene EPA (eicosapentaensyre; 20:5n-3) og DHA (docosaheksaensyre; 22:6n-3) øker på det internasjonale markedet. Produksjonen av disse marine oljene har imidlertid vært relativt stabil helt siden 1970-tallet. Tilgjengeligheten av omega-3 fettsyrer er i dag en av de største begrensningene for videre vekst i akvakulturnæringen. Tradisjonelle fiskemel og fiskeoljer har en god næringsstoffsammensetning for oppdrettsfisk og er rike på EPA og DHA. Dagens råvaresituasjon tilsier at det er vanskelig å videreutvikle en bærekraftig produksjon av laks og ørret med et fôr som hovedsakelig er basert på marine oljer (FAO 2004-2010). I dag er fiskemel og fiskeolje produsert fra villfisk en stabil, men begrenset ressurs. En global vekst i sjømatproduksjonen forutsetter lavere andel villfisk som råvare i fiskefôr. En naturlig konsekvens av en reduksjon av fiskemel og fiskeolje i fôr har hittil vært reduksjon av EPA og DHA i oppdrettsfisken. Erstatning av fiskeolje med vegetabiliske alternativer, primært med rapsolje, i fôret til oppdrettslaksen har vært nødvendig. Årsaken er enkel; inntil nylig har det ikke vært tilgjengelig reelle alternative kilder til EPA og DHA til bruk i fiskefôr. I dag består ca 70 % av oljefraksjonen i dietten til laks i Norge av rapsolje og 30 % fiskeolje (Ytrestøyl, et al., 2014). Den største ulempen ved denne endringen er reduksjonen i n-3 langkjedet flerumettede fettsyrer LC-PUFA i laksefileten (fra 2,5 % til 1,3 %) og økningen i n-6-fettsyrer (FA) (Thomassen and Røsjø, 1989; Torstensen, et al., 2005; Ytrestøyl, et al., 2014). N-6 / n-3-forholdet i laksefilet er for første gang høyere enn en (Nichols, et al., 2014), og en ytterligere økning er en bekymring både for fiskens helse og for humant konsum. Grunnen er at fett og fettsyrer er helt sentrale for en rekke biologiske funksjoner, som for eksempel regulering av cellenes oppbygging og avlesing av arvematerialet. Det er også viktig i forhold til ernæringsmessig sammensetning av laksens filet i forhold til humant konsum. Enkelte norske næringsaktører har de siste årene igjen økt det totale nivået av omega-3 fettsyrer i fôret til laksen (Aas et al., 2019) for å motvirke ugunstig økning i n-6/n-3 ratio fileten til laksen.

Publiserte data tyder på at laksen har behov for minst 1 % EPA og DHA i fôret, et nivå som tidligere var ansett som nedre behovsnivå, for å opprettholde god helse under krevende miljøbetingelser. Laks fôret på 0,2 % og 1 % EPA og DHA, døde i betydelig større grad enn laks fôret med 1,6 % av disse fetttsyrene i fôret når fisken ble utsatt for gjentatt håndteringsstress som avlusning ved høye vanntemperaturer. Lave nivå av EPA og DHA i fôret førte bl.a. også til redusert nivå av astaxanthin i muskel, økt mengde fett i lever og rundt innvoller, manglende virvelmellomrom i ryggrad og histologiske endringer i midttarm (Bou et al., 2017 a,b). For å sikre en robust laks i sjø som tåler den håndteringen den møter under naturlig variasjoner i oppdrettsbetingelser, så tyder dataene på at oppdrettslaksen må ha over 1 % EPA+DHA i fôret for å dekke sitt behov. Dagens realitet er at fiskens ernæringsmessige minimumsbehov for EPA og DHA for optimal vekst og for å unngå redusert helse og velferd vil angi hvor lite fiskeolje og fiskemel fôret kan inneholde. I nær fremtid vil det veldig sannsynlig være nok tilgjengelig EPA og/eller DHA fra nye kilder i form av oljer fra marine mikroalger og genmodifiserte planter som kan brukes i fiskefôr.

Omega-3 canola oljen fra Nuseed Pty Ltd ble nylig godkjent av regulatoriske myndigheter i både USA og Australia for produksjon, for bruk til humant konsum, og i fôr til dyr. Dette betyr at denne olje i nær fremtid vil være kommersielt tilgjengelig. Oljen er rik på omega-3 fettsyrene 18:3n-3 og DHA, og inneholder også noe EPA. Ved å erstatte konvensjonelle fôringredienser med nye, er det viktig å sikre at de er like sikre som tradisjonelle produkter og ikke inneholder høyere nivåer av uønskede fremmedstoffer. I GM-planter med forbedrede ernæringsmessige egenskaper er sammensetningsanalyse og DNA-sporbarhet en av hjørnesteinene i sikkerhetsvurderingene (EFSA, 2008). Men raffinerte produkter som GM vegetabiliske oljer inneholder ingen eller svært lave nivåer av DNA (Gryson, et al., 2004). Prosjektet har undersøkt sikkerhetsspørsmål i forhold til DHA-canolaoljen spesielt ut fra et fiskehelseperspektiv.

Mikroalger er de naturlige primære produsentene av marine n-3 fettsyrer, og er anerkjent som en av de mest lovende kildene til n-3 LC-PUFA i fiskefôr. Et eksempel er den heterotrofiske mikroalgen *Schizochytrium sp.*, som har høyt fettinnhold (55-75 % i tørrstoff), hvorav så mye som 30 % er DHA (Ren, et al., 2010). Denne heterotrofiske arten er allerede dyrket ved etablert gjæringsteknologi med stort oppskaleringspotensial i industriell skala og representerer et realistisk ikke-GM alternativ som kilde til n-3 LC-PUFA for akvakulturindustrien. *Schizochytrium sp.* olje (Glencross, et al., 2014) og hel biomasse (Kousoulaki, et al., 2015) har tidligere blitt testet i småskala karforsøk med atlantisk laks. Denne algen produseres allerede i industriell skala og er tatt i bruk av kommersielle selskaper i Norge som en fiskeoljesteratter (Aas et al., 2019).

## 2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet har hatt et totalt budsjett på ca 15,5 mill NOK, hvorav 10 mill NOK er finansiert av FHF og 5,5 mill NOK er egeninnsats fra ulike partnere i prosjektet. Forskningsinstituttet CSIRO har bidratt med 2,3 mill NOK i egeninnsats for vitenskapelig kompetanse rundt GMO canola olje, produksjon og analyse av oljen. Alltech (tidligere Probus Aqua) har bidratt med 0,145 mill NOK egenfinansiering for å skaffe til veie mikroalger til fôringsforsøk. Salmon Group har bidratt med 0,300 mill NOK til fôringsforsøk med mikroalger på Averøy forskningsstasjon. Nuseed har bidratt med 2,6 mill NOK egenfinansiering for produksjon av GMO Canola olje.

I arbeidspakke 1 og 2, er det utført fôringsforsøk med tilsetning av DHA-rik modifisert rapsolje i laksedietter i ferskvann (både i Norge og Australia) og i sjøvann for å studere effekter på tilvekst, fettsyresammensetning, kvalitet og helse på fisken. I arbeidspakke 3 er det undersøkt hvorvidt det er ernæringsmessig sikkerhetsrisiko knyttet til bruk av olje fra genmodifisert raps i fiskefôr. I arbeidspakke 4 er det gjennomført fôringsforsøk for å teste hvordan mikroalger som DHA kilde i fiskefôr gjennom hele livet påvirker, ytelse, kvalitet og helse til laksen.

### Prosjektorganisering

Prosjektet er ledet av Nofima, og er et samarbeid mellom flere partnere; Nofima, HI (tidligere NIFES) CSIRO, Nuseed, Salmongroup, og Alltech (tidligere (Probus Aqua)). Prosjektet har en referansegruppe, men ikke styringsgruppe.

Partnerne i NewOmega-3 besitter bred kompetanse innen i) produksjon av ALA og DHA rike planteoljer (CSIRO / Nuseed) og ii) DHA rike mikroalger (Alltech, Probus Aqua), iii) fiskefôrprosessering og -teknologi (Nofima, CSIRO), iv) fôringsforsøk med laks (Nofima, Salmon Group, CSIRO), v) evaluering av

fiskens ytelse, helse, filetkvalitet og sammensetning (Nofima, CSIRO, Salmon Group, HI), vi) vurdering av sikkerhetsspørsmål knyttet til bruk av nye fôrråvarer (HI, CSIRO).

### **Nøkkelkompetanse, ansvar og roller til personer i prosjektgruppen**

**Nofima:** Prof. B. Ruyter: Prosjektleder; kompetanse innen fiskeernæring, lipidmetabolisme og essensielt fettsyrebehov. Dr. K. Kousoulaki: Biolog - fiskeernæringsfysiolog med erfaring i vurdering av nye råvarer i fiskefôr. Hun har vært ansvarlig koordinator for det Forskningsråd-finansierte prosjektet "A til omega-3" som produserte fisk som videre ble fulgt på fôr med mikroalge i dietten fram til slakt. Dr. T. Ytrestøyl og T. Mørkøre har vært ansvarlige for analyser relatert til muskelkvalitet. Dr. G.M. Berge har bred kompetanse innen ernæring av laks og har hatt ansvar for å følge opp fiskeforsøkene. Dr. T.K. Østbye, lipidmetabolisme og molekylærbiologi, Dr. A. Krasnov, transkriptomanalyser, bioinformatikk. BSC. Mats Carlehög og Dr. M. Hersleth, ansvar for sensoriske analyser. Dr. Grete Bæverfjord, fiskehelseansvarlig og utførelse av mikroskopianalyser.

**Commonwealth Scientific og Industrial Research Organization (CSIRO)** er det føderale regjeringsorganet for vitenskapelig forskning i Australia. Nøkkelkompetansepersoner involvert: Dr S. Singh har 25 års erfaring i Plante «Metabolic Engineering» og er konsernleder, Plant Oil Engineering i Crop Improvement for Novel Plant Products Program for CSIRO Agriculture Flagship. Dr. J. Petrie er en plantemetabolisk ingeniør og er seniorforsker i avdeling for *Novel Plant Products Group*. Dr. P. Nichols og Dr. Cedric Simons er seniorforskerforskere i CSIRO Oceans med kompetanse innen lipidkjemi og nye kilder til marine oljer i akvakulturfôr.

**Nuseed Australia Pty Ltd.** er en heleid divisjon av Nufarm Limited, et Australia-basert selskap som utvikler og selger landbruksprodukter. Nuseed er et frøfirma som spesialiserer seg på utvikling av nye canola-, sorghum- og solsikkevarianter. Nøkkelkompetansepersoner involvert: Dr M. Devine som er Innovasjons leder globalt for Nuseed.

**Grain Research and Development Corporation (GRDC)** er en av verdens ledende kornforskningsorganisasjoner, ansvarlig for planlegging, investering og overvåking av RD & E for å levere forbedringer i produksjon, bærekraft og lønnsomhet over hele australske kornindustrien. GRDC bidro med kompetanse og veiledning om dyrking av GM rapsfrø samt kommunikasjon knyttet til prosjektet. Nøkkelkompetanse personer involvert: Dr. Ron Osmond, leder Commercial Technology Delivery.

**Produs Aqua AS (tidligere Alltech):** Leverandør av mikroalger fra Alltech Inc. Nøkkelpersoner involvert: B. Ravnøy.

**Salmon Group** er et landsdekkende nettverk av lokale og familieeide selskaper med erfaring i laks og ørretbruk, som representerer 46 aksjonærer (113 lisenser) for lakseproduksjon på rundt 50 millioner smolt. Nøkkelpersoner involvert: Nils Inge Hitland: Konsernsjef med 30 års erfaring fra akvakultursektoren.

**HI:** (tidl NIFES) har bred erfaring innen fiskeernæring, førsikkerhet, og er ansvarlig for sikkerhetsanalyser av oljer og fisk. Nøkkelkompetansepersoner involvert Dr. M. Sanden har mer enn 10 års erfaring i fiskeernæring og sikkerhetsvurderinger av GM-produkter i fôr til atlantisk laks. Hun er medlem av det vitenskapelige panelet på GM i Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM). Dr. Nini Sissener har bred erfaring innen fiskeernæring og lipidmetabolisme.

**Referansegruppe:** Nils Inge Hitland (Salmon Group), Leiv Tvenning (Marine Harvest), senere erstattet av Ragna Heggebø (Marine Harvest), Harald Sveier (Lerøy Seafood Group), Olai Einen (Cermaq), Eldar Bendiksen (SalMar), senere erstattet av Merete Sandberg (Salmar), Tor Eirik Homme (Grieg Seafood).

## **3 Problemstilling og formål**

### **3.1 Prosjektets effektmål**

Tilgangen på fiskeolje som kilde til de essensielle fettsyrene EPA og DHA i laksefôr er begrenset. Dette krever at laksenæringen tar i bruk nye bærekraftige omega-3-kilder for å sikre videre vekst i næringen. Dette krever økonomisk innsats til forskning for å sikre fremtidig bruk av nye EPA og DHA kilder i laksefôr. Samarbeidspartnere i prosjektet bidrar med betydelig egeninnsats i prosjektet, noe som også bidrar til merverdi i forhold til FHF's finansiering. Resultater fra prosjektet forventes å føre til kunnskap som vil gjøre næringsaktørene innenfor lakseoppdrett bedre rustet til å vurdere potensiale for å ta i bruk nye omega-3-kilder i fremtidens fiskefôr.

### **3.2 Prosjektets resultatmål**

#### **3.2.1 Hovedmål**

Å frembringe ny kunnskap om potensial for å ta i bruk to kommersielt lovende kilder, henholdsvis modifisert planteolje og heterotrofe mikroalger, som EPA og DHA kilder i fremtidens laksefôr. Det er et viktig fokus å sikre næringsbehov, helse, ytelse og kvalitet til laksen.

#### **3.2.2 Resultatmål**

- Bestemme hvordan dietter tilsatt planteolje rik på 18:3n-3 og DHA påvirker vekst, ytelse, metabolisme, ernæringskvalitet og helse hos Atlantisk laks i ferskvann og sjøvann.
- Bestemme hvordan dietter med mikroalge som kilde til DHA gjennom hele livet påvirker fettsyresammensetning i muskel, kvalitet, lukt, smak og helse til Atlantisk laks på 4 kg.
- Formidle resultater fra prosjektet og overføre kunnskap til relevante aktører, herunder spesielt fôrindustrien og havbruksnæringen.

#### **3.2.3 Nytteverdi**

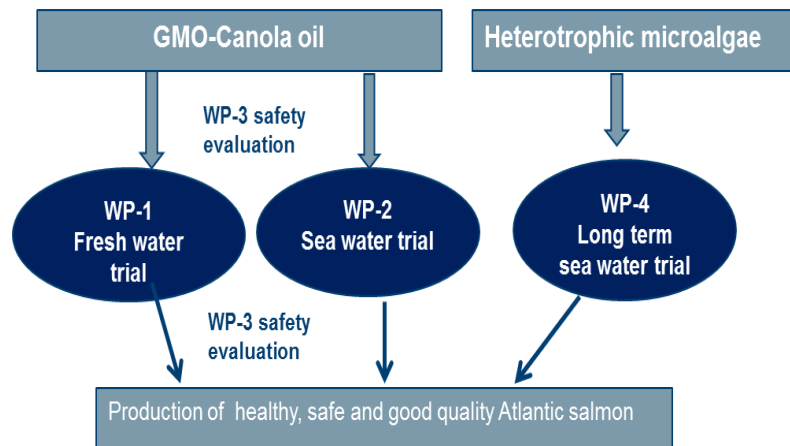
Prosjektet har bidratt med ny kunnskap som gjør næringsaktørene innen lakseoppdrett bedre rustet til å ta i bruk de nye omega-3 kildene i fremtidens fiskefôr.

*Leveranser forøvrig er beskrevet i avsnitt 7 under leveranser.*

## 4 Prosjektgjennomføring

### 4.1 Arbeidspakker

Prosjektet har omfattet 4 arbeidspakker som skissert i figur 1.



Figur 1 Oversikt over arbeidspakker i NewOmega-3 prosjektet

I WP-1 og WP-2 er DHA-rik GM-canolaolje testet i fôr til Atlantisk laks i ferskvann og i sjøvann med hensyn til effekter på ytelse, kvalitet og helse. CSIRO / Nuseed har bidratt med GM canolaolje til forsøkene. Nuseed og GRDC har hatt ansvar for å videreutvikle og kommersialisere produksjonen av canolaolje rik på n-3 LC-PUFA.

I WP 3 har man evaluert om det er knyttet noen sikkerhetsrisiko til bruk av GM-canolaolje i fôr til laks, som for eksempel potensielt uønskede komponenter/fremmedstoffer.

I WP4 er mikroalgen *Schizochytrium sp.* gitt som en DHA-kilde i fôret til laksen gjennom hele livsløpet, for å undersøke eventuelle langtidseffekter på ytelse, kvalitet, sammensetning og helse. Alltech/Probus Aqua har bidratt med mikroalgen til sjøvannsforsøket.

Prosjektet «Nye omega-3 kilder» har kombinert fiskeforsøk i ulike livsfaser og miljø, og en stor bredde i analyse av både oljer, dietter og fiskevev for å oppnå en detaljert metabolsk og fysiologisk forståelse av virkningene/betydningen av de nye ingrediensene på fiskens ytelse, metabolisme, helse og kvalitet.

### 4.2 Metodebeskrivelse WP 1 og WP 3

#### 4.2.1 WP 3, analyse av næringsstoffer og fremmedstoff i DHA-CA olje og en standard canolaolje

Fettsyresammensetningen av oljene benyttet i forsøkene ble analysert som beskrevet av Torstensen, et al. (2011). Multi-elementbestemmelse av oljene ble utført av ICP-MS (induktivt koblet plasmamassespektrometri) (Julshamn and Brenna, 1999). Analyser av klorerte plantevernmidler (Aldrin; Chlordan, cis-; Chlordan, oksy-; Chlordan, trans-; Dieldrin; Endrin; gamma-HCH (Lindan); HCH, alfa-; HCH, beta-; HCH, delta-; Heptaklor; Heptaklor epoksyd, cis-, heptaklor epoksyd, trans-,

hexaklorbenzen (HCB); Mirex; Nonachlor, trans-o, p'-DDD; o, p'-DDE; o, p'-DDT; oktaklorstyren; -DDD; p, p'-DDE; p, p'-DDT; Pentachlorbenzen; Toxafen Parlar 26; Toxafen Parlar 50; Toxafen Parlar 62, endosulfan (-alfa, -beta, sulfat), toxafen -26, -50, -60) ble utført av Eurofins (GmbH, Hamburg) ved hjelp av en akkreditert metode (akkrediteringsnummer D-PL-14602-01-00). En liste over 119 forskjellige organofosfatpesticider ble bestemt av GC-FPD med en akkreditert metode (D-PL-14198-01-00) og to analytiske paralleller, fra Eurofins. PAH-analyser ble utført med en akkreditert metode fra Eurofins (akkrediteringsnummer D-PL-14602-01-00). Som anbefalt av EFSA ble følgende 16 PAH-forbindelser bestemt: benzo (a) anracen, benzo (a) pyren, benzo (b) fluoranten, benzo (c) fluoren, benzo (ghi) perylen, benzo (j) fluorantenbenzo (k) fluoranten, krysen, cyklopenta (cd) pyren, dibenz (ah) antracen, indeno (1,2,3-cd) pyren, 5-metylkrysen, dibenzo (a, e) pyren, dibenzo (a, h) pyren, dibenzo (a, i) pyren og dibenzo (a, l) pyren. De lipidoppløselige mykotoksinerne beauvericin og enniatin (A, A1, B og B1) ble analysert av LC-MS / MS med en akkreditert metode (D-PL-14602-01-00) med en LOQ på 10 ug/kg og to analytiske paralleller, av Eurofins (GmbH, Hamburg).

#### **4.2.2 WP 1, Produksjon og sammensetning av forsøksfôr til ferskvannsforskøkene**

Modifisert DHA rik canolaolje (DHA-CA) benyttet i forsøket stammer fra Event NS-B50027-4, som er en modifisert canola (*Brassica napus*) linje utviklet av Nuseed Pty. Ltd., og modifisert for å uttrykke de langkjedede fettsyrene ALA (18:3n-3) EPA (20:5n-3) og DHA (22:6n-3) i frø. Avlingen som ble benyttet i dette forsøket, ble dyrket i Australia i 2015 og 2016. Standardoljen som ble brukt i diettene, var en australsk variant (Garnet) med en oljeprofil som ligner den av den genmodifiserte linjen som NS-B50027- 4 ble utviklet fra. Oljen ble kaldpresset, filtrert og sendt til Nofimas fôrteknologisenter (Bergen, Norge) der forsøksfôrene ble produsert.

Forsøksfôr ble planlagt slik at de skulle inneholde like mengder av alle næringsstoffer, men med EPA og DHA fra forskjellige kilder. To fôr hadde lavt eller høyt nivå av fiskeolje, to hadde lavt eller høyt nivå av DHA-Canola, og målet var at det skulle være samme nivå av EPA+DHA i de to «lave» og de to «høye» fôrene. Sammensetning av fôrene er vist i Tabell 1, fettsyresammensetning i Tabell 2. Alle fôr ble produsert i flere pelletstørrelser, for å bruke etter hvert som fisken vokste. De fire forsøksfôrene ble gitt til triplikate kar med fisk.

## Sammensetning av forsøksfôr til forsøk i ferskvann Norge, lav temperatur 12°C

Tabell 1 Ingredienser og sammensetning av forsøksfôr, 12°C

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA
<b>Sammensetning, %</b>				
Fiskemel <sup>1</sup>	79,00	79,00	79,00	79,00
Hvete <sup>2</sup>	7,50	7,50	7,50	7,50
Mineral mix <sup>3</sup>	0,52	0,52	0,52	0,52
Vitamin mix <sup>4</sup>	2,00	2,00	2,00	2,00
Monoammonium fosfat <sup>5</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Carophyll Pink <sup>6</sup>	0,01	0,01	0,01	0,01
Vitamin D3, IU/kg <sup>7</sup>	2000	2000	2000	2000
Vitamin E <sup>8</sup>	0,03	0,03	0,03	0,03
Vitamin C <sup>9</sup>	0,14	0,14	0,14	0,14
Betafin <sup>10</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Soya lecitin <sup>11</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00
Fiskeolje <sup>12</sup>	1,72	3,41	0,00	0,00
Standard Canola <sup>13</sup>	6,08	4,39	3,88	0,00
DHA Canola	0,00	0,00	3,92	7,79
<b>Kilde til EPA+DHA, % i diett:</b>				
Fiskemel	1,62	1,62	1,62	1,62
Fiskeolje	0,32	0,63	0,00	0,00
DHA Canola	0,00	0,00	0,32	0,63
<b>Kjemisk sammensetning, %:</b>				
Tørrstoff	93,9	93,7	93,8	93,7
Fett	20,9	20,6	20,9	20,7
Protein	56,8	56,3	56,4	56,6
Aske	13,4	13,3	13,3	13,2
Brutto energi, MJ/kg	20,9	21,0	21,0	21,0

<sup>1</sup>Nordsildmel, <sup>2</sup>Norgesmøllene, <sup>3</sup>Mineraler innkjøpt fra Vilomix og blandet av Nofima, <sup>4-10</sup> Vilomix, <sup>11</sup>Denofa, <sup>12</sup>Nordsildmel, <sup>13</sup>(Australia, var. Garnet).



Tabell 2 Fettsyreprofil, % av alle fettsyrer, i forsøksfôr, 12°C

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA
<b>14:0</b>	3,7	4,3	3,1	3,2
<b>15:0</b>	0,3	0,3	0,3	0,2
<b>16:0</b>	11,2	12,2	10,4	10,6
<b>17:0</b>	0,2	0,5	0,1	0,2
<b>18:0</b>	1,9	2,1	2,0	2,0
<b>20:0</b>	0,3	0,3	0,4	0,4
<b>Sum SFA<sup>1</sup></b>	<b>17,7</b>	<b>19,7</b>	<b>16,6</b>	<b>16,8</b>
<b>16:1 n-7</b>	2,6	3,1	2,0	2,1
<b>17:1 n-7</b>	0,2	0,3	0,2	0,2
<b>18:1 n-7</b>	2,7	2,5	3,0	3,2
<b>18:1 n-9</b>	29,8	23,6	29,7	24,2
<b>18:1 n-11</b>	0,2	0,8	0,2	0,2
<b>20:1 n-9</b>	5,8	6,3	5,0	5,1
<b>22:1 n-7</b>	0,4	0,5	0,5	0,7
<b>22:1 n-11</b>	9,2	10,3	7,7	7,8
<b>22:1 n-9</b>	0,6	0,6	0,5	0,5
<b>24:1 n-9</b>	0,7	0,8	0,7	0,6
<b>Sum MUFA<sup>2</sup></b>	<b>52,2</b>	<b>49,1</b>	<b>49,8</b>	<b>44,8</b>
<b>16:2 n-6</b>	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>18:2 n-6</b>	6,5	5,2	6,6	5,7
<b>18:3 n-6</b>	0,1	0,1	0,3	0,4
<b>20:4 n-6</b>	0,3	0,4	0,3	0,3
<b>22:5 n-6</b>	0,0	0,1	0,0	0,3
<b>Sum N-6</b>	<b>7,1</b>	<b>5,9</b>	<b>7,4</b>	<b>6,6</b>
<b>16:2 n-3</b>	0,2	0,3	0,1	0,1
<b>18:3 n-3</b>	4,4	3,4	7,8	10,2
<b>20:4 n-3</b>	1,4	1,8	1,4	1,8
<b>18:4 n-3</b>	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>20:3 n-3</b>	0,1	0,0	0,2	0,4
<b>20:5 n-3</b>	5,0	6,2	3,9	4,0
<b>22:5 n-3</b>	0,6	0,7	0,7	0,8
<b>22:6 n-3</b>	8,1	8,7	9,0	11,0
<b>Sum N-3</b>	<b>19,7</b>	<b>20,9</b>	<b>23,2</b>	<b>28,4</b>
<b>EPA+DHA:</b>				
<b>% av alle fettsyrer</b>	<b>13,1</b>	<b>14,9</b>	<b>13,0</b>	<b>15,0</b>
<b>mg/g fôr</b>	<b>13,6</b>	<b>15,4</b>	<b>14,7</b>	<b>16,6</b>

<sup>1</sup>Sum metta fettsyrer (SFA) omfatter også 22:0 og 24:0. <sup>2</sup>Sum monometta fettsyrer (MUFA) omfatter også 14:1n-5 and 16:1n-5

### Forsøksfôr forsøk i ferskvann Australia, høy temperatur 16°C

Sammensetningen av fôret til høytemperaturforsøket var formulert tilsvarende som forsøket ved lav vanntemperatur beskrevet over med fire fôr med tilsvarende mengde av alle næringsstoffer. To dietter hadde lave eller høye nivåer av fiskeolje, og to dietter hadde lave eller høye nivåer av DHA-CA. Fôrene var planlagt med sikte på tilsvarende innhold av EPA + DHA i de respektive "lave" og "høye" diettene. Fiskeoljene som ble benyttet i de to forsøkene kom fra forskjellige kilder og dermed ble det litt høyere totalnivå av EPA+DHA i diettene til høytemperaturforsøket sammenlignet med lavtemperaturforsøket. Sammensetningen av dietter er presentert i tabell 3, og fettsyreprofil i tabell 4.

Tabell 3 Ingredienser og sammensetning av forsøksfôr, 16°

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA
<b>Sammensetning, %</b>				
Fiskemel	79,00	79,00	79,00	79,00
Hvete	7,00	7,00	7,00	7,00
Mineral mix	0,59	0,59	0,59	0,59
Vitamin mix	1,92	1,92	1,92	1,92
Carophyll Pink	0,01	0,01	0,01	0,01
choline chloride	0,5	0,5	0,5	0,5
Vitamin C	0,14	0,14	0,14	0,14
Vitaminc E (50 %)	0.03	0.03	0.03	0.03
CaHPO <sub>4</sub>	1,00	1,00	1,00	1,00
Betaine	1,00	1,00	1,00	1,00
Soy lecithin	1,00	1,00	1,00	1,00
Tuna oil	1,6	3,2	0,00	0,00
Control canola olje	6,2	4,6	3,9	0,00
DHA-CA olje	0,00	0,00	3,9	7,8
<b>Kilde til EPA+DHA, % i diettene</b>				
Fiskemel	1,90	1,90	1,90	1,90
Fiskeolje	0,47	0,95	0,00	0,00
DHA-CA olje	0,00	0,00	0,47	0,94
<b>Kjemisk sammensetning:</b>				
Tørrstoff	94,2	94,2	93,1	94,0
Fett	16,2	16,2	16,7	17,0
Protein	58,7	59,6	60,0	58,7
Aske	11,7	11,6	11,7	11,8
Energi, MJ/kg	21,4	21,5	21,6	21,5

Fiskemel fra Sør-Amerika (Peru og Chile) levert av Ridley Aquafeeds. Kilden til fiskeolje var tunfiskolje. Fôrpelletts (tre størrelser, 0,5-1,0 mm, 1,0-1,4 mm og 1,4-2,0 mm) ble produsert av CSIRO, sammensetningen er et gjennomsnitt av alle tre pelletstørrelser.

Tabell 4 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) og totalt (mg / g) i forsøksdiettene, 16°C

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA
14:0	4,1	4,5	3,7	3,8
15:0	0,3	0,5	0,2	0,2
16:0	13,9	15,5	12,5	12,6
17:0	0,3	0,5	0,2	0,2
18:0	3,6	4,0	3,3	3,4
19:0	0,2	0,3	0,3	0,4
20:0	0,4	0,4	0,4	0,4
Sum SFA <sup>1</sup>	24,5	27,6	22,0	21,4
16:1 n-7	4,4	4,9	3,9	4,0
17:1 n-7	0,3	0,3	0,2	0,2
18:1 n-9	36,9	31,4	34,9	29,2
20:1 n-9	1,6	1,6	1,7	1,6
22:1 n-9	0,3	0,3	0,2	0,2
24:1 n-9	0,5	0,5	0,4	0,4
Sum MUFA	43,9	39,0	41,3	35,6
18:2 n-6	8,0	7,0	8,0	7,3
18:3 n-6	0,1	0,0	0,1	0,2
20:4 n-6	0,5	0,7	0,4	0,4
22:4n-6	0,3	0,4	0,2	0,2
Sum N-6	8,9	8,1	8,7	8,0
18:3 n-3	4,3	3,5	8,8	11,6
18:4 n-3	0,8	0,9	1,3	1,7
20:3 n-3	0,0	0,0	0,2	0,4
20:5 n-3	7,5	8,0	7,2	7,3
22:5 n-3	0,3	0,1	0,4	1,7
22:6 n-3	9,5	12,5	9,8	12,1
Sum N-3	22,4	25,0	27,7	34,8
EPA+DHA:				
% of total fa	17,0	20,5	17,0	19,4
mg/g (fôr/tørrstoffbasis)	23,7	28,6	24,3	29,1

#### 4.2.3 Fiskeforsøk ferskvann Norge, lav vanntemperatur, 12°C

Lakseyngel med gjennomsnittsvikt på 2,1 gram ble satt ut i 12 kar, 100 individer i hvert kar. Forsøksenhetene var 60x60 cm glassfiberkar, med belteautomater for utføring. Nivå på utføring ble bestemt ut fra veksttabeller og forventet vekstrate. Vanntemperaturen var 12,2°C (±0,1). Vanngjennomstrømming var 5 liter pr minutt ved start, men denne ble trinnvis oppregulert etterhvert som fisken vokste. Fisken ble bulkveid ved oppstart (dag 0) og dag 27, dag 41 og dag 83 ved avslutning av forsøket, når fisken hadde nådd en gjennomsnittsvikt på 24g. Ved avslutning ble det tatt ut 10 helfisk per kar til helkroppsanalyser, i tillegg det ble tatt ut prøver av lever, tarm og hjerte fra 5 fisk pr

kar. Organene ble veid, og leverprøver og tarmprøver ble frosset på flytende nitrogen for å analysere for enzymaktivitet og genuttrykk.

#### **4.2.4 Fiskeforsøk ferskvann Australia, høy vanntemperatur, 16°C**

Lakseyngel med gjennomsnittsvekt på 0,84 gram ble satt ut i 12 kar, 200 individer i hvert kar (300 L kar). Vanngjennomstrømming var 3 liter per minutt, ferskvann med vanntemperatur på 16°C. Vanntemperaturen ble målt daglig i 6 tilfeldige tanker. Fisken ble holdt under konstant lys og med kontinuerlig fôring. Fisk ble bulkveiet ved dag 34, 56 og 70. Laksens sluttvekt var ca 15 g. 10 fisk per kar ble samlet ved avslutning for helkroppsanalyser.

### **4.3 Metodebeskrivelse WP 2, Forsøk med DHA-CA fôr til stor laks i sjøvann i kar på land**

#### **4.3.1 Forsøksfôr til stor laks i sjøvann**

DHA-CA benyttet i forsøket stammer fra Event NS-B50027-4, modifisert canola (*Brassica napus*) -linje utviklet av Nuseed Pty. Ltd., tilsvarende oljen som ble benyttet til ferskvannsforsøkene. I dette forsøket ble det valgt et design med dose-respons med økende mengde DHA-CA i fôret. Økningen kom fra økende innblanding av DHA-CA og reduksjon i standard Canola-olje. Kontroll = basis oljeblanding (90 % konvensjonell canolaolje + 10 % fiskeolje). Fire fôrtyper ble produsert, med 0 % (kontroll), 25 %, 50 % og 100 % DHA-CA utbytting av konvensjonell canola olje i basis oljeblanding. Fôrsammensetning er vist i Tabell 5 og fetttsyresammensetning i Tabell 6. Alle fôr ble produsert med 7mm pelletstørrelse. De fire forsøksfôrene ble gitt til triplikate kar med fisk.

Tabell 5 Sammensetning av forsøksfôr

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA
<b>Sammensetning, %</b>				
Fiskemel	15,00	15,00	15,00	15,00
Hvete	9,22	9,22	9,22	9,22
Hvetegluten	12,00	12,00	12,00	12,00
Soyaproteinkonsentrat	20,00	20,00	20,00	20,00
Maisgluten	5,00	5,00	5,00	5,00
Horse beans	5,00	5,00	5,00	5,00
Fiskeolje	5,00	5,00	5,00	5,00
DHA-Canolaolje	0,00	5,50	11,00	22,00
Standard Canolaolje	22,00	16,50	11,00	0,00
Mineral mix	0,52	0,52	0,52	0,52
Vitamin mix	2,00	2,00	2,00	2,00
Mononatriumfosfat	2,50	2,50	2,50	2,50
Carophyll Pink	0,05	0,05	0,05	0,05
Yttriumoksyd	0,01	0,01	0,01	0,01
L-Lysin	1,00	1,00	1,00	1,00
Betafine	0,50	0,50	0,50	0,50
DL- Methionin	0,20	0,20	0,20	0,20
<b>Kilde til EPA og DHA, % i fôr, beregnet</b>				
EPA fra basisfôr	0,09	0,09	0,09	0,09
EPA fra fiskeolje	0,41	0,41	0,41	0,41
EPA fra DHA-Canola	0,00	0,03	0,06	0,11
DHA fra basisfôr	0,16	0,16	0,16	0,16
DHA fra fiskeolje	0,39	0,39	0,39	0,39
DHA fra DHA-Canola	0,00	0,51	1,02	2,05
<b>Sum EPA</b>	<b>0,50</b>	<b>0,53</b>	<b>0,56</b>	<b>0,61</b>
<b>Sum DHA</b>	<b>0,55</b>	<b>1,06</b>	<b>1,57</b>	<b>2,59</b>
<b>Sum EPA + DHA</b>	<b>1,05</b>	<b>1,59</b>	<b>2,13</b>	<b>3,21</b>
<b>Kjemisk analyse, % av fôr</b>				
<b>Tørrstoff</b>	<b>92,71</b>	<b>92,70</b>	<b>92,54</b>	<b>92,62</b>
<b>Lipid</b>	<b>30,60</b>	<b>30,00</b>	<b>29,00</b>	<b>30,10</b>
<b>Råprotein (N*6,25)</b>	<b>38,02</b>	<b>38,77</b>	<b>38,13</b>	<b>38,56</b>
<b>Aske</b>	<b>6,94</b>	<b>6,93</b>	<b>6,99</b>	<b>7,04</b>

Tabell 6 Fettsyreprofil, % av alle fettsyrer, i forsøksfôr

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA
14:0	1,5	1,4	1,4	1,4
16:0	7,3	7,0	6,9	6,4
18:0	1,9	1,8	2,0	2,1
20:0	0,4	0,5	0,5	0,5
22:0	0,3	0,3	0,2	0,2
24:0	0,1	0,1	0,2	0,2
SUM SFA <sup>1</sup>	11,7	11,2	11,3	11,0
16:1 n-7	1,4	1,2	1,3	1,3
17:1 n-7	0,1	0,1	0,1	0,1
18:1 n-11	0,3	0,2	0,3	0,3
18:1 n-9	42,5	40,3	38,0	32,9
18:1 n-7	2,8	2,7	2,6	2,4
20:1 n-11	0,8	1,2	1,7	2,6
20:1 n-9	3,3	3,1	3,1	3,1
20:1 n-7	0,1	0,1	0,1	0,1
22:1 n-7	0,1	0,4	0,6	1,1
22:1 n-11	3,2	2,9	3,0	3,0
22:1 n-9	0,6	0,5	0,4	0,2
24:1 n-9	0,3	0,2	0,2	0,2
SUM MUFA <sup>2</sup>	55,6	53,0	51,6	47,5
16:2 n-6	0,2	0,1	0,2	0,2
18:2 n-6	20,0	17,4	14,7	8,9
18:3 n-6	0,1	0,2	0,2	0,4
20:2 n-6	0,1	0,1	0,1	0,1
20:4 n-6	0,1	0,1	0,1	0,1
SUM n-6	20,5	17,9	15,3	9,7
16:2 n-3	0,1	0,1	0,1	0,1
18:3 n-3	7,0	9,4	11,6	16,4
20:4 n-3	0,2	0,2	0,2	0,2
20:3 n-3	0,0	0,1	0,3	0,5
20:5 n-3	2,0	2,0	2,1	2,2
22:5 n-3	0,2	0,4	0,6	1,1
22:6 n-3	2,1	3,7	5,6	9,2
SUM n-3	11,6	15,9	20,5	29,7
EPA+DHA, % av alle	4,1	5,7	7,7	11,4
EPA+DHA, % av fôr	1,12	1,54	2,00	3,09

<sup>1</sup> SFA: Inkluderer 15:0 og 17:0 <sup>2</sup> MUFA: Inkluderer 14:1n-5, 16:1T, 16:1n-9, 16:1n-5

#### 4.3.2 Fiskeforsøk i sjøvann

Laks med gjennomsnittsvekt på 466 gram ble fordelt i 12 kar, 25 individer i hvert kar. Forsøksenhetene var 2m<sup>2</sup> glassfiberkar, med skiveautomater for utfôring og utstyr for oppsamling av fôrspill. Vanndybde var 60 cm, vanngjennomstrømming var 25 liter pr minutt og temperaturen var 9,8 °C (±1,0). Individvekter ble registeret ved oppstart og ved avslutning når fisken hadde nådd en sluttvekt på ca 1,5 kg. Ved avslutning ble det tatt blodprøver av 5 fisk pr kar, deretter ble fiskene åpnet og lever, tarm og hjerte ble tatt ut og veid. Prøver av serum, lever og muskel ble frosset på flytende nitrogen for forskjellige analyser. Helfisk til kjemisk analyse ble tatt ut ved oppstart (3 x 5 fisk) og avslutning (5 fisk pr kar), for å beregne retensjon av fettsyrer. Resterende fisk ble strøket for å samle opp gjødselprøver for å bestemme fordøyelighet. Til slutt ble det skåret fileter fra 5 fisk pr kar, for å vurdere kvalitet.

#### 4.4 Metodebeskrivelse WP 4. Forsøk med *Schizochytrium sp.* i fôr til laks i sjø

##### 4.4.1 Produksjon og sammensetning av fôr til sjøforsøk

*Schizochytrium sp.*, algen som ble brukt i dette fôringsforsøket, er en heterotrof mikroalge som inneholder omkring 60 % fett, og ca 25 % av fettsyrene er DHA. Produktet som ble brukt var et fullmel av algen, produsert av Alltech (62,5 g algemel/kg fôr). Det ble produsert to forsøksfôr, pelletstørrelse 7 og 10 mm, med enten heterotrofisk microalgemel (HM) eller en standard fiskeolje som kilde for DHA og /eller og EPA. Sammensetning av fôr er vist i Tabell 7, tabell 8 viser kjemisk sammensetning analysert i begge pelletstørrelser for begge fôrtypene. Tabell 9 viser fettsyresammensetning i forsøksfôrene.

Tabell 7 *Sammensetning av forsøksfôr*

	Fiskeolje	Heterotrof mikroalge
	FO	HM
<b><i>Ingredienser, %</i></b>		
Fiskemel	10,00	10,00
Hvetegluten	5,15	5,45
Soyaproteinkonsentrat	25,00	25,00
Hestebønner	16,60	13,40
Alltech algemel	.	6,25
Palmeolje	3,55	.
Fiskeolje	4,30	.
Linolje	9,75	11,10
Rapsolje	14,84	18,00
Krill hydrolysat	2,50	2,50
Soyalecithin	0,50	0,50
Vitaminmiks	3,00	3,00
Monokalsiumfosfat	2,00	2,00
Lysin (79 %)	0,50	0,50
Metionin (99 %)	0,25	0,25
Carophyll pink (10 % Astaxanthin)	0,05	0,05
Aquate	0,40	0,40
Organiske mineraler	0,64	0,64
Yttriumoksyd	0,01	0,01
Kolesterol	0,50	0,50
Cholin	0,50	0,50

Tabell 8 *Kjemisk sammensetting av forsøksfôr, %*

	FO 7 mm	HM 7 mm	FO 10 mm	HM 10 mm
Tørrstoff	93,5	94,4	93,4	93,4
Råprotein	34,6	35,0	35,1	34,4
Fett	33,6	34,9	32,4	33,9



Tabell 9 Fettsyrer i fôr, 5 av alle fettsyrer

	Fiskeolje	Heterotrof mikroalge
	FO	HM
14:0	1,36	0,89
16:0	13,04	13,51
18:0	2,78	2,34
20:0	0,34	0,34
22:0	0,23	0,22
<b>Sum metta fettsyrer</b>	<b>17,74</b>	<b>17,31</b>
16:1 n-7	1,25	0,34
18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	39,06	38,64
20:1 (n-9)+(n-7)	1,02	0,95
22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	0,68	0,5
24:1 n-9	0,11	0,11
<b>Sum monoumetta</b>	<b>42,12</b>	<b>40,53</b>
16:2 n-4	0,17	nd
16:3 n-4	0,23	nd
18:2 n-6	16,04	16,75
18:3 n-6	nd	nd
20:2 n-6	0,11	0,05
20:3 n-6	nd	nd
20:4 n-6	0,11	nd
22:4 n-6	nd	nd
22:5 n-6	nd	nd
18:3 n-3	19,1	21,56
18:4 n-3	0,28	0,11
20:3 n-3	nd	nd
20:4 n-3	0,11	0,05
20:5 n-3	2,15	0,28
21:5 n-3	0,11	nd
22:5 n-6	0,23	nd
22:5 n-3	nd	nd
22:6 n-3	1,47	3,35
<b>EPA+DHA</b>	<b>3,62</b>	<b>3,63</b>
<b>Sum PUFA (n-6)</b>	<b>16,27</b>	<b>16,81</b>
<b>Sum PUFA (n-3)</b>	<b>23,47</b>	<b>25,35</b>
<b>Sum PUFA totalt</b>	<b>40,14</b>	<b>42,16</b>

#### 4.4.2 Forsøk med mikroalge i fôr til laks i merder i sjø

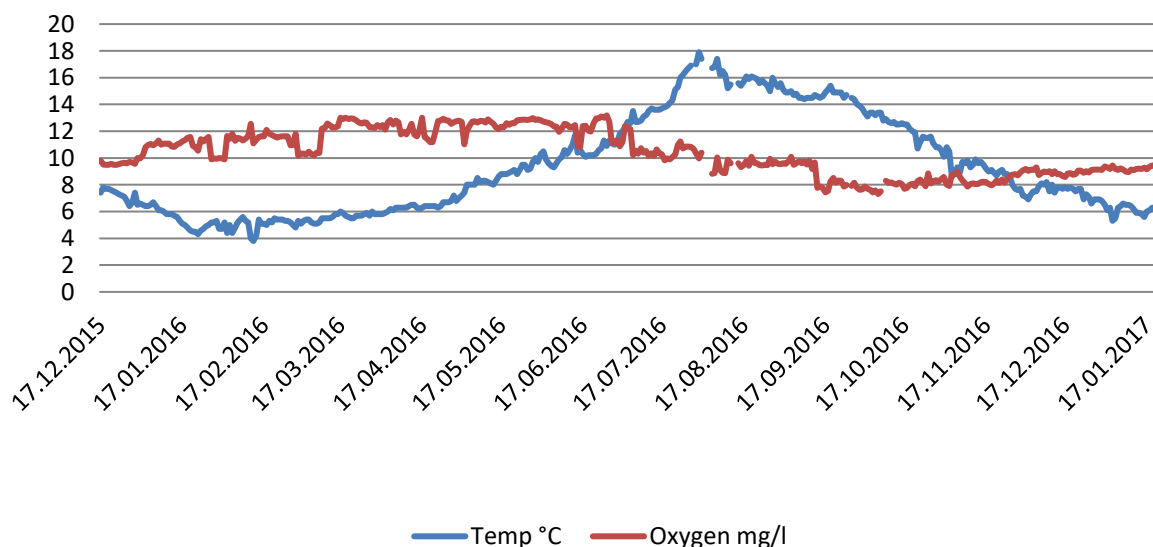
Fisken benyttet i dette forsøket hadde en forhistorie som gjorde det spesielt interessant å bruke den videre i merdforsøk i sjø. Forsøksfisken hadde tidligere gått i fôringsforsøk i kar på land (Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra), helt fra 18 gram, gjennom ferskvannsperioden med smoltifisering og videre som postsmolt i kar med sjøvann fram til en størrelse på 800 gram. I løpet av karforsøksperiodene hadde forsøksfisken fått samme fôrtyper som i merdforsøket i dette prosjektet. I

tillegg til fôr med HM (mikroalge) eller FO (fiskeolje) som kilde til de lange omega-3 fettsyrene EPA og/eller DHA, var det en diett som hadde en blanding av de to kildene HM/FO (mikroalge + fiskeolje). I og med tilgangen til disse fiskegruppene, kunne vi studere langtidseffekter av en mikroalgediett som kilde til DHA helt fram til slaktestørrelse sammenlignet med en kontrolldiett hvor tradisjonell fiskeolje var kilden til EPA + DHA i fôret. All fisk var individmerket med PIT-tags fra oppstart av det første forsøket, slik at vi kunne følge individrespons på tilvekst. Laks med en gjennomsnittsvekt på 800 gram ble flyttet fra kar på land, til seks forsøksmerder hos Marine Harvest Fish Feed sin forskningsstasjon på Averøy.

I merdforsøket gikk vi kun videre med to av forsøksfôrene. Fisk fra alle tre pre-dietter fra karforsøkene på land ble likt fordelt i seks merder i sjø, 27 fisk fra hver Pre-diett til hver av merdene. Tre og tre merder fikk samme fôr, enten HM eller FO. Siden fiskene var individmerket og vi kunne blande fisk fra forskjellige pre-dietter i samme merd, kunne vi også studere effekter av å bytte av fôrtyper når de ble satt i sjø i dette forsøket. Forsøksperioden i sjø varte i ca 1 år fra desember 2015 til januar 2017. I resultatavsnittet vises kun effekter av hoveddietter i sjøvann, siden vi bare observerte marginale effekter av prediett.

#### 4.4.3 Miljøbetingelser i forsøksperiode i sjø

Merdene var på 125 m<sup>3</sup>, og hadde fôringsautomater (Betten-automat). Det ble fôret 3 x 30 minutter hver dag. Forsøket ble avsluttet når fisken hadde nådd en vekt på omkring 3 kg. Fisken ble satt i merder i sjø i desember, mens vanntemperaturen var 7,4 °C, og på vei nedover. Minimumstemperatur i løpet av vinteren var 3,8 °C, og maksimum i løpet av sommeren var 17,9 °C. Det var nødvendig å avluse fisken 6 ganger mellom februar og oktober, og notposene ble skiftet 6 ganger. «Slice» ble brukt en uke i september, med positiv respons. I september ble det også satt ut berggyllt i merdene, til 24 % innblanding. Miljøproblemer og lus gjorde at fisken hadde utfordrende forhold, og fôrintak og vekst var relativt dårlig. I tillegg oppsto det gjelleproblemer på sensommeren. Det ble vurdert å stanse forsøket, men alle problematiske forhold bedret seg på høsten, etter som temperaturen i vannet gikk ned. Det ble da bestemt å fortsette forsøket fram til planlagt sluttvekt.



Figur 2 Temperatur og oksygeninnhold i vann, målt på 3 meters dyp, gjennom hele forsøksperioden

Avslutning med prøveuttak ble gjort når fisken var ca 3 kg. Tre tilfeldig valgt fisk fra hver pre-diettgruppe (9 fisk per merd med gjennomsnittsvikt på 3209 g) ble tatt ut til vevsprøver i hver merd. Prøvefiskene ble avlivet med en overdose bedøvelse, og det ble tatt blodprøver. Deretter ble fiskene åpnet, og scoring av mengde leverfett og leverfarge ble gjort før organer ble tatt ut og veid. Vevsprøver av tarm, lever og muskel ble frosset ned på flytende nitrogen og senere holdt frosset på -70°C inntil analyse. Lever og tarmprøver ble også fiksert på formalin for seinere histologiske analyser. Deretter ble totalt tre fisk per pre-diettgruppe i hver merd tatt ut (9 fisk per merd med gjennomsnittsvikt på 3122g) for helkroppsanalyser (frosset ned som helkropp ved -20°C). Tre ytterligere fisk per pre-diettgruppe (9 fisk per merd med gjennomsnittlig kroppsvekt på 4149 g) fikk gjellene bløgget og deretter overført til isvann for å bløt ut i 10 minutter. Fisk til kvalitetsanalyser ble etter bløgging filetert. Hele fileter ble frosset ved -20°C for senere analyse av sensorisk og teknisk kvalitet. All prøvefisk ble tilfeldig valgt ut for å representere gjennomsnittet av hver merd, bortsett fra prøvefisk til sensorisk og teknisk kvalitet. Laks i de to diettgruppene hadde signifikant forskjellig sluttvekt, en faktor som vil påvirke sensorisk og teknisk kvalitet. Til teknisk og sensorisk kvalitet ble det derfor valgt ut prøvefisk med omtrent samme størrelse på 4149 g og med en vekt som var nærmere kommersiell slaktestørrelse. Dette innebærer at laksen til kvalitetsanalysene er større enn gjennomsnittslaksen i de ulike merdene.

#### **4.4.4 Kvalitetsanalyser av muskel**

Fasthet (tekstur), rødfarge (fargevifte) og astaxanthinnivåer ble evaluert i norsk kvalitetssnitt, NQC. Filetfarge ble evaluert visuelt ved bruk av DSM SalmonFan™ (score 21-34). Teksturanalyse ble utført ved bruk av en teksturanalysator, TA-XT2 (Stable Microsystem Ltd, Surrey, Storbritannia) utstyrt med en sylinder (12,5 mm diameter, type p / 0,5) og en 30 kg lastcelle. Fasthet målt ved hjelp av denne metoden, korrelerer godt med sensorisk vurdering av fasthet av rå og røkt laksefilet (Mørkøre and Einen, 2003). Forekomst av mørke melaninflekker ble evaluert visuelt (antall misfargede muskelsegmenter). Homogeniserte fileter fra individuell fisk ble tint, og karotenoider ble ekstrahert og analysert ved bruk av en metode av Bjerkeng, et al. (1997).

#### **4.4.5 Sensorisk analyse**

Et trent panel bestående av 10 dommere (10 kvinner i alderen 37-64 år) ved Nofima (Ås, Norge) utførte en sensorisk beskrivende analyse i henhold til "Generisk Beskrivende Analyse" som beskrevet av LawlessHeymann (2010) og ISO\_13299 (2016) Sensory analyses - Metodikk - Generell veiledning for å etablere en sensorisk profil. Dommerne har blitt testet, valgt og opplært i henhold til ISO-standarder (ISO\_8586, 2012), og det sensoriske laboratoriet følger ISO-standarder (ISO\_8589, 2007). Dommerne ble enige om totalt 20 egenskaper som beskriver lakseprøvene. Rå laks ble vurdert for henholdsvis; frisklukt, sjølukt, agurklukt, algelukt, fôrlukt, fiskelukt, harsklukt, fargetone, fargestyrke og hvithet. Varmebehandlet (køkt) laks ble vurdert for: frisksmak, bittersmak, sjøsmak, agurksmak, fôrsmak, fiskesmak, harsksmak, hardhet, saftighet og sammenhengbarhet.

### **4.5 Metodebeskrivelse for analyser av fiskematerialet i WP1, WP 2 og WP 4:**

#### **4.5.1 Vekst og organindeks**

Vekstrate ble beregnet ut fra gjennomsnittsvikter I hvert kar/merd:

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

Vekstfaktor (Thermal growth coefficient) (TGC) =  $(W1^{1/3} - W0^{1/3}) * 1000 / d^{\circ}$

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

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

Cardiosomatisk index (CSI) = hjertevekt / vekt helfisk \*100;

#### 4.5.2 Kjemiske analyser

Prøver av fôr og helfisk ble analysert for tørrstoff (tørking ved 105°C, 16-18 timer, til konstant vekt), nitrogen (Kjeltech Auto Analyser, Tecator, Höganäs, Sweden), totallipid (Folch, et al., 1957), fettsyrer (Mason and Waller, 1964; Røsjø, et al., 1994), energi (bombekalorimeter; Parr 1271, Parr, Moline, IL, USA), aske (forbrenning, deretter 3-4 timer ved 550°C til konstant vekt).

#### 4.5.3 Enzymanalyser

Lever og midttarm frosset på flytende nitrogen og senere lagret ved -70°C ble analysert for aktivitetene av antioksidantenzymene katalase, glutationperoxidase og superoksid-dismutase. Aktiviteten av katalase ble målt i henhold til en fremgangsmåte beskrevet i Baudhuin, et al. (1964). Superoksyddismutase (SOD) (Biovision, California, USA) og Glutathione Peroxidase (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) ble målt i henhold til produsentens protokoll.

#### 4.5.4 Genuttrykk

QPCR: Totalt RNA ble isolert i henhold til produsentens protokoll (Invitrogen). RNA ble behandlet med PureLink DNase1 (ThermoFisher, MA, USA) for å fjerne eventuell forurensende DNA. RNA-konsentrasjonen ble målt med et NanoDrop® ND-1000 spektrofotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Total RNA (900 ng) ble omvendt transkribert til cDNA ved bruk av et TaqMan® Reverse Transcription Reagents kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i henhold til produsentens protokoll. Kvantitativ PCR ble utført i et QuantStudio5-instrument (ThermoFisher, MA, USA) Relative uttrykk av mRNA ble beregnet ved  $\Delta\Delta CT$ -metoden ved bruk av etif3 som referansegene (Livak and Schmittgen, 2001).

#### 4.5.5 Microarray analyse

Nofimas 44 k mikroarray Salgeno inneholder oligonukleotidprober til alle identifiserte gener av atlantisk laks. Nofimas bioinformatikk pipeline STARS ble brukt til databehandling. Differensiell forskjell i uttrykk av gener (DEG) ble valgt med lave streghetskriterier som vanligvis brukes på fôringsforsøk:  $\log_2$ -ekspressjonsforhold > | 0,6 | (1,5 ganger) og p < 0,05.

#### 4.5.6 Lever metabolomics

Metabolomicsarbeidet ble utført av Metabolon (Durham, NC, USA) som tidligere beskrevet (Evans, et al., 2009; Reitman, et al., 2011).

#### 4.5.7 Astaxanthin i muskel

Homogeniserte fileter fra individuell fisk ble tint, og karotenoider ble ekstrahert og analysert ved bruk av en metode av Bjerkeng, et al. (1997).

#### 4.5.8 Skinnfarge

Skinnfargeanalyser ble utført et Minolta Chroma Meter (CR-400 Minolta, Konica Minolta Sensing, ink. Japan). Tristimulus CIE  $L^* a^* b^*$  1976 fargespekter ble benyttet, hvor  $L^*$ -variabelen representerer lyshet ( $L^* = 0$  for svart,  $L^* = 100$  for hvit) og  $a^*$  og  $b^*$  angir fargeretninger:  $+a^*$  er den røde retningen,  $-a^*$  er den grønne retningen,  $+b^*$  er den gule retningen, og  $-b^*$  er den blå retningen. Analyser ble utført fremfor og bak dorsalfinnen, under og over sidelinjen.

#### 4.5.9 Statistikk

Data fra alle forsøk ble statistisk analysert for å undersøke effekt av diett på en rekke egenskaper. I forsøkene med DHA-raps til liten laks hadde vi ingen individdata, bare gjennomsnittsdata for hver forsøksenhet (kar). Enveis variansanalyse (ANOVA) ble brukt for å vise forskjeller mellom behandlingene. I forsøket med DHA-raps til stor laks hadde vi gjennomsnittsdata for vekst, fôrutnyttelse og fordøyelighet, og individdata fra prøvefisk for slakteparametere og enkelte analyser. Enveis variansanalyse ble brukt for gjennomsnittstall, og en "nested" ANOVA, med diett som fast effekt og kar som tilfeldig effekt, ble brukt for individobservasjoner. I forsøket med alger til stor laks fram til slaktestørrelse ble det satt inn fisk som hadde fått ulike predieter før de to hoveddiettene som ble brukt i sjøforsøket. Vi kjørte først en variansanalyse for å se på effekt av predieter innen hver hoveddiett. Det var minimal effekt av predieter, så statistisk analyse ble også her enveis variansanalyse for gjennomsnittstall, og en "nested" ANOVA for individobservasjoner.

For deskriptive sensoriske parametere ble det brukt en toveis ANOVA, "mixed model", med dommer og samspill som tilfeldige effekter, og prøver og diett som faste effekter, for å undersøke om noen av de valgte sensoriske egenskapene viste forskjell mellom behandlinger. For å påvise forskjeller i signifikante egenskaper ble Tukey's test gjennomført. Forskjeller ble definert som signifikante ved p-verdier  $<0,05$ .

Programvare brukt til statistisk behandling:

SAS® System for Windows Release 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)

EyeOpenR (Logic8 BV)

Unscrambler X Version 10.4.1.

Statistica (version 13.1, Statsoft, Tulsa, OK, USA)

IBM SPSS statistics 24

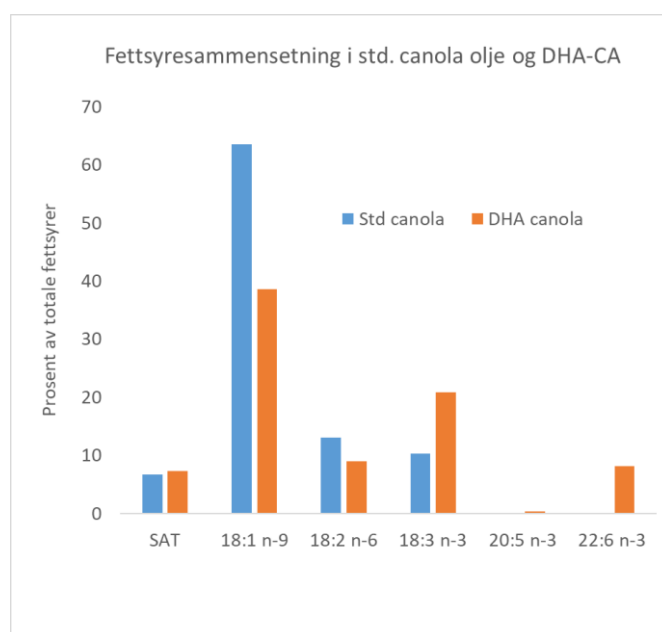
## 5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

### 5.1 Forsøk med olje fra modifisert raps (DHA-CA) i fôr til liten laks i ferskvann

Målet med forsøkene i ferskvann var å undersøke egnethet og eventuell sikkerhetsrisiko knyttet til bruk av oljer fra genmodifisert oljeplante i fôr til laks. Forsøkene ble gjennomført med Atlantisk laks fra en startvekt på henholdsvis 2 gram fram til sluttvekt på 25 gram fiskestørrelse ved vanntemperatur på 12°C og fra en startvekt på henholdsvis 0,8 gram til sluttvekt på 15 gram fiskestørrelse ved vanntemperatur på 16°C. I denne tidlige fasen av livet vokser laksen meget raskt ved at den på kort tid mangedobler vekten, og den er spesielt følsom, i et fiskehelseperspektiv, for eventuelle negative effekter av nye fôrmidler. Forut for dette prosjektet var det ikke tidligere utført forsøk med DHA-CA i fôr til laks, noe som understreket behovet for ny kunnskap om hvordan denne modifiserte oljen påvirker vekst, ytelse, helse og fettsyre-sammensetning. Derfor ble det gjennomført to fôringsforsøk med to veksthastigheter med atlantisk lakseparr, et forsøk i Australia ved høy vanntemperatur (16°C) og et i Norge ved lav vanntemperatur (12°C).

#### 5.1.1 Næringsstoffer og fremmedstoff i DHA-CA

Figur 3. sammenligner nivåene av noen sentrale fettsyrer i DHA-CA -oljen sammenlignet med en konvensjonell canolaolje. DHA-CA oljen har lavere nivåer av fettsyrene 18: 1n-9 og 18:2n-6, og økte nivåer av omega-3 fettsyrene 18 :3n-3 (ALA) og 22:6n-3 (DHA), og inneholder også noe 20:5n-3 (EPA). Kontroll canolaolje er spesielt rik på 18:1n-9, den inneholder mer 18:2 n-6 enn DHA-CA oljen, den inneholder ikke EPA og DHA. Oljene ble også analysert for eventuell forekomst av fremmedstoffer. Tabell 10. viser at det ikke ble funnet nivåer over LOQ (Limit Of Quantification) av plantevernmidler, mykotoksiner og PAH i DHA-CA. Det ble heller ikke påvist plante-DNA fra genmodifisert raps i DHA-CA oljen (ikke vist). Dataene viser at DHA-CA oljen totalt sett har en ernæringsmessig gunstig sammensetning sammenlignet med konvensjonelle canola oljer.



Figur 3 Sammenligning av fettsyresammensetningen (% av totale fettsyrer) i standard canolaolje og DHA-CA olje

Tabell 10 Utvalgte fremmedstoffer og fytosteroler analysert i DHA-CA, Garnet canolaolje (kontroll) og i 10 canolaoljer som ble benyttet i kommersielle fiskefôr i Norge i 2015. For kommersielle oljer vises gjennomsnitt og (min / maks) og øvre LOQ ble brukt ved beregning av middelverdier

	DHA-CA	Garnet canola olje	Canola oljer brukt i kommersielle fiskefôr*
<b>Tungmetaller, mg kg<sup>-1</sup></b>			
Total arsen	<0,009	<0,009	0,17 (<0,009-1,60)**
<b>Polyaromatiske hydrocarboner, PAH µg kg<sup>-1</sup></b>			
Benzo(a)antracen	<0,5	<0,5	2,2 (0,7-3,6)
Benzo(a)pyren	<0,5	<0,5	1,8 (<0,5-3,0)***
Benzo(b)fluoranthen	<0,5	<0,5	2,0 (<0,5-3,0)***
Chrysene	<0,5	<0,5	2,8 (0,7-4,4)
<b>Organofosfat pesticider, µg kg<sup>-1</sup></b>			
Pirimiphos-methyl	<20	<20	32 (<20-65)****
<b>Lipid-løselige mycotoksiner, µg kg<sup>-1</sup></b>			
Enniatin B	<10	<10	60 (<10-210)***
<b>Phytosteroler</b>			
Sum fytosteroler, mg kg <sup>-1</sup>	9659	7878	8653 (8406-9032)
Campesterol, % av sum	39,6 %	34,2 %	36,7 % (34,9-39,9)
β-sitosterol, % av sum	43,0 %	44,5 %	46,1 % (45,3-46,7)
Brassicasterol, % av sum	3,5 %	12,2 %	10,1 % (8,3-11,0)

n.d. – ikke detektert. \*Data på tungmetaller, PAH, pesticider og mycotoksiner er fra 10 canola oljer (Sanden, et al., 2016a) . Phytosterol verdiene er fra 5 kommersielle oljer (Sissener, et al., 2017). \*\*Detektert over LOQ i 5/10, \*\*\*Detektert over LOQ i 9/10 av de analyserte oljene. \*\*\*\*Detektert over LOQ i 5/10 av oljene.

### Fettsyresammensetning av diettene

Tabellene 2 og 4 i metodeavsnittet viser fettsyresammensetningen av fôrene til fiskeforsøkene i ferskvann ved 12°C og 16°C. Fettsyresammensetningen av de fire diettgruppene reflekterte sammensetningene av diettoljene, når 50 og 100 % av fiskeoljen ble byttet ut med DHA-CA oljen, ble nivåene av de typiske plantefettsyrene 18: 1n-9 og 18: 2n-6 redusert og nivåene av 18: 3n-3 og nivået av DHA økt, EPA økte også noe.

#### 5.1.2 Vekst og biometri av forsøksfisk

Forsøkene ble gjennomført med Atlantisk laks med en startvekt på henholdsvis 2 gram fram til sluttvekt på 25 gram ved vanntemperatur på 12° C og med en startvekt på 0,8 gram fram til en sluttvekt på 15 gram fiskestørrelse ved vanntemperatur på 16 °C. Overlevelsen var høy (>98 %) i alle forsøksgrupper både ved 12°C og ved 16°C. Gjennomsnittsvekter og vekstrate for fisk i forsøket ved 12°C (Tabell 11) var lik i alle diettgrupper og det var ingen signifikante forskjeller i leverindeks (HSI) eller hjerteindeks (CSI). I forsøket ved 16°C (Tabell 12) var det heller ingen signifikante forskjeller i tilvekst mellom diettgruppene. Fisk i forsøket ved lav vanntemperatur viste ca 10 ganger økning i kroppsvekten fra start til slutt av forsøket, mens fisk ved høyere vanntemperatur viste ca 18 ganger økning i kroppsvekten. Forsøksfisken var mindre ved oppstart i forsøket ved 16°C, noe som sammen med høyere vanntemperatur resulterte i høyere vekstrate enn ved 12°C. Det var ingen signifikante forskjeller i kjemisk sammensetning; lipid, protein, aske og energiinnhold i helkropp til fisk i de ulike

diettgruppene i lavtemperaturforsøket, mens det var en liten økning i totalt lipidinnhold i fisk i DHA-CA gruppene i høytemperaturforsøket (Tabell 13.)

Tabell 11 Vekter og vekstrater i forsøket ved 12°C, og organindekser ved avslutning. (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Vekt0</b>	2,04 ± 0,09	2,16±0,04	2,08±0,04	2,05±0,01	0,46
<b>Vekt1</b>	4,47 ± 0,19	4,79±0,07	4,52±0,10	4,38±0,03	0,14
<b>Vekt2</b>	6,82 ± 0,29	7,33±0,10	6,81±0,16	6,67±0,03	0,11
<b>Vekt3</b>	23,82±0,94	25,41±0,80	23,28±0,62	23,74±1,02	0,38
<b>SGR1</b>	2,95±0,03	3,01±0,12	2,93±0,07	2,87±0,03	0,64
<b>SGR2</b>	3,05±0,03	3,08±0,03	2,97±0,07	3,03±0,08	0,57
<b>SGR3</b>	3,02±0,03	3,00±0,05	2,97±0,01	3,07±0,11	0,73
<b>SGR total</b>	3,01±0,01	3,02±0,07	2,96±0,02	3,00±0,04	0,76
<b>TGC1</b>	1,16±0,01	1,21±0,05	1,16±0,03	1,13±0,01	0,37
<b>TGC2</b>	1,46±0,03	1,51±0,02	1,43±0,03	1,44±0,04	0,28
<b>TGC3</b>	1,91±0,03	1,95±0,04	1,87±0,02	1,93±0,08	0,72
<b>TGC total</b>	1,59±0,02	1,63±0,04	1,57±0,02	1,59±0,04	0,50
<b>HSI</b>	1,28±0,07	1,21±0,04	1,24±0,02	1,17±0,04	0,43
<b>CSI</b>	0,14±0,01	0,14±0,01	0,15±0,01	0,23±0,09	0,50

Tabell 12 Vekter og vekstrater i forsøket ved 16°C (mean±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Vekt0</b>	0,83 ± 0,01	0,84 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,83 ± 0,02	0,74
<b>Vekt1</b>	4,63±0,12	4,49±0,06	4,49±0,14	4,44±0,13	0,68
<b>Vekt2</b>	10,35±0,08	10,14±0,28	10,17±0,09	9,94±0,20	0,48
<b>Vekt3</b>	15,49 ± 0,47	15,29 ± 0,31	16,22 ± 0,77	15,25 ± 0,22	0,47
<b>SGR1</b>	5,04±0,09	4,94±0,02	4,90±0,04	4,94±0,03	0,18
<b>SGR2</b>	3,66±0,08	3,72±0,05	3,73±0,10	3,67±0,06	0,90
<b>SGR3</b>	2,87±0,26	2,91±0,12	3,18±0,20	3,06±0,04	0,65
<b>SGR total</b>	4,17±0,04	4,20±0,02	4,20±0,02	4,16±0,02	0,72
<b>TGC total</b>	1,36±0,02	1,35±0,01	1,38 ± 0,03	1,35±0,00	0,73
<b>Overlevelse</b>	99,7±0,40	99,0±0,40	98,0±0,49	99,3±0,40	0,14



Tabell 13 Kjemisk sammensetning og energiinnhold i helkropp til forsøksfisken ved avslutning lav temperatur forsøk, 12°C (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Tørrstoff</b>	27,2 ± 0,36	27,6 ± 0,15	27,1 ± 0,06	27,2 ± 0,18	0,43
<b>Protein</b>	16,1 ± 0,05	16,2 ± 0,07	16,4 ± 0,19	16,1 ± 0,07	0,16
<b>Lipid</b>	10,7 ± 0,53	11,0 ± 0,15	10,4 ± 0,07	10,4 ± 0,09	0,44
<b>Aske</b>	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,15	2,3 ± 0,06	0,74
<b>Energi, MJ/kg</b>	7,27 ± 0,12	7,52 ± 0,03	7,21 ± 0,05	7,25 ± 0,05	0,06

Tabell 14 Kjemisk sammensetning og energiinnhold i helkropp til forsøksfisken ved avslutning høy temperatur forsøk, 16°C (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Tørrstoff</b>	25,9 ± 0,55	25,8 ± 0,66	27,3 ± 0,3	27,3 ± 0,20	0,09
<b>Protein</b>	15,3 ± 0,36	15,6 ± 0,61	16,2 ± 0,22	15,8 ± 0,17	0,60
<b>Lipid</b>	9,6 ± 0,31 <sup>a</sup>	9,5 ± 0,13 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,28 <sup>b</sup>	10,9 ± 0,40 <sup>b</sup>	0,03
<b>Aske</b>	1,6 ± 0,07	1,6 ± 0,09	1,5 ± 0,08	1,6 ± 0,07	0,87
<b>Energi, MJ/kg</b>	7,18 ± 0,15	7,16 ± 0,19	7,56 ± 0,19	7,76 ± 0,16	0,10

### 5.1.3 Fett og fettsyresammensetning av vev og organer

Fett og fettsyresammensetning av helkropp til fisk i forsøket ved 12°C er vist i Tabell 15. og til fisk i forsøket ved 16°C er vist i Tabell 16. Generelt for begge forsøk var en lavere prosent av mettede fettsyrer og høyere prosent av totale n-3-fettsyrer i begge DHA-CA-gruppene sammenlignet med FO-gruppene, noe som reflekterer sammensetningen av de ulike diettene. De to lave diettgruppene (Lav FO vs Lav DHA-CA) og de to høye diettgruppene (Høy FO vs Høy DHA-CA) hadde lik prosentandel av EPA + DHA i helkropp, selv om det faktiske nivået var høyere i fisk fra høytemperaturforsøket på grunn av høyere nivå i disse fettsyrene i deres dietter. Videre detaljerte analyser av vev og organer er kun utført på prøver fra fisk i 12 ° C forsøket.

Tabell 15 Fettsyreprofil i helkropp, % av alle fettsyrer, 12°C (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>14:0</b>	3,4±0,03 <sup>b</sup>	3,9±0,09 <sup>a</sup>	3,0±0,03 <sup>c</sup>	3,0±0,03 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>16:0</b>	13,0±0,03 <sup>b</sup>	13,7±0,03 <sup>a</sup>	12,2±0,23 <sup>c</sup>	12,1±0,03 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>18:0</b>	2,9±0,03	2,9±0,03	2,9±0,03	3,0±0,03	0,44
<b>20:0</b>	0,3±0	0,3±0,03	0,3±0,03	0,3±0	0,33
<b>Sum SFA<sup>1</sup></b>	20,0±0,06 <sup>b</sup>	21,3±0,13 <sup>a</sup>	18,9±0,30 <sup>c</sup>	19,0±0,07 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>16:1 n-7</b>	3,2±0,15 <sup>b</sup>	3,6±0,10 <sup>a</sup>	2,3±0,09 <sup>c</sup>	2,2±0 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>18:1 n-7</b>	3,7±0,07 <sup>c</sup>	3,6±0 <sup>c</sup>	4,0±0,03 <sup>b</sup>	4,3±0,03 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>18:1 n-9</b>	31,6±0,20 <sup>a</sup>	26,7±0,20 <sup>b</sup>	31,3±0,12 <sup>a</sup>	26,2±0,07 <sup>b</sup>	< ,0001
<b>20:1 n-9</b>	6,3±0,06 <sup>b</sup>	6,8±0,03 <sup>a</sup>	5,6±0,03 <sup>c</sup>	5,4±0 <sup>d</sup>	< ,0001
<b>20:1 n-11</b>	1,1±0 <sup>c</sup>	1,3±0 <sup>b</sup>	1,2±0,03 <sup>b</sup>	1,6±0,03 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>22:1 n-7</b>	0,6±0 <sup>c</sup>	0,6±0,10 <sup>c</sup>	0,8±0 <sup>b</sup>	1,1±0 <sup>a</sup>	0,0003
<b>22:1 n-9</b>	0,0±0	0,6±0,27	0,4±0,20	0,0±0	0,13
<b>22:1 n-11</b>	6,1±0,06 <sup>a</sup>	6,5±0,24 <sup>a</sup>	4,8±0,24 <sup>b</sup>	5,3±0,06 <sup>b</sup>	0,0005
<b>24:1 n-9</b>	0,7±0	0,6±0,10	0,7±0	0,6±0,10	0,60
<b>Sum MUFA<sup>2</sup></b>	54,0±0,23 <sup>a</sup>	51,3±0,26 <sup>b</sup>	51,9±0,18 <sup>b</sup>	47,8±0,09 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>18:2 n-6</b>	5,4±0,06 <sup>a</sup>	4,5±0 <sup>c</sup>	5,5±0,10 <sup>a</sup>	4,9±0 <sup>b</sup>	< ,0001
<b>18:3 n-6</b>	0,2±0,03 <sup>c</sup>	0,2±0 <sup>bc</sup>	0,3±0,03 <sup>ab</sup>	0,3±0 <sup>a</sup>	0,01
<b>20:2 n-6</b>	0,4±0,03	0,4±0,03	0,5±0	0,4±0	0,09
<b>20:3 n-6</b>	0,2±0	0,2±0,03	0,2±0	0,2±0	0,44
<b>20:4 n-6</b>	0,3±0	0,3±0	0,3±0	0,3±0	
<b>Sum n-6<sup>3</sup></b>	6,8±0,03 <sup>a</sup>	5,9±0,09 <sup>c</sup>	6,9±0,09 <sup>a</sup>	6,4±0,03 <sup>b</sup>	< ,0001
<b>18:3 n-3</b>	3,2±0,06 <sup>c</sup>	2,6±0 <sup>d</sup>	5,7±0,10 <sup>b</sup>	7,8±0,03 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>20:3 n-3</b>	0,2±0 <sup>b</sup>	0,2±0 <sup>b</sup>	0,5±0,03 <sup>a</sup>	0,6±0,12 <sup>a</sup>	0,003
<b>20:4 n-3</b>	0,6±0,10 <sup>b</sup>	0,8±0 <sup>a</sup>	0,6±0 <sup>b</sup>	0,6±0 <sup>b</sup>	0,05
<b>20:5 n-3</b>	2,8±0 <sup>b</sup>	3,5±0,03 <sup>a</sup>	2,4±0 <sup>c</sup>	2,5±0,03 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>22:5 n-3</b>	0,9±0,03 <sup>b</sup>	1,2±0 <sup>a</sup>	0,9±0,03 <sup>b</sup>	0,9±0,03 <sup>b</sup>	0,0002
<b>22:6 n-3</b>	9,7±0,19 <sup>d</sup>	10,8±0,07 <sup>b</sup>	10,4±0,12 <sup>c</sup>	12,2±0,03 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>Sum n-3</b>	17,6±0,15 <sup>d</sup>	19,3±0,20 <sup>c</sup>	20,6±0,23 <sup>b</sup>	24,7±0,17 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>EPA+DHA:</b>	12,5±0,19 <sup>b</sup>	14,3±0,10 <sup>a</sup>	12,8±0,12 <sup>b</sup>	14,7±0,06 <sup>a</sup>	< ,0001

<sup>1</sup>Sum mettede fettsyrer (SFA) inkluderer 15:0 og 17:0, <sup>2</sup>Sum MUFA inkluderer 14:1n-5, 15:1, 16:1n-5, 16:1n-9, 17:1n-7 og 18:1n-11 <sup>3</sup>Sum n-6 inkluderer 16:2n-6

Tabell 16 Fettsyreprofil i helkropp, % av alle fettsyrer, 16°C (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>14:0</b>	3,72 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,07 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,42 ± 0,03 <sup>c</sup>	3,49 ± 0,02 <sup>c</sup>	< ,001
<b>16:0</b>	14,28 ± 0,12 <sup>a</sup>	15,54 ± 0,15 <sup>b</sup>	13,29 ± 0,08 <sup>c</sup>	13,46 ± 0,11 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>18:0</b>	4,39 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,42 ± 0,06 <sup>a</sup>	< ,001
<b>20:0</b>	0,33 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,00 <sup>a</sup>	< ,001
<b>Sum SFA<sup>1</sup></b>	24,14 ± 0,22 <sup>a</sup>	26,42 ± 0,22 <sup>b</sup>	22,79 ± 0,36 <sup>c</sup>	23,03 ± 0,22 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>16:1n-7</b>	4,15 ± 0,06 <sup>a</sup>	4,61 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,80 ± 0,03 <sup>c</sup>	3,82 ± 0,01 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>17:1</b>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>18:1n-7</b>	2,82 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,80 ± 0,00 <sup>ab</sup>	2,78 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,76 ± 0,01 <sup>b</sup>	< ,01
<b>18:1n-9</b>	35,08 ± 0,18 <sup>a</sup>	30,36 ± 0,21 <sup>b</sup>	34,17 ± 0,07 <sup>c</sup>	28,39 ± 0,11 <sup>d</sup>	< ,0001
<b>20:1n-7</b>	0,02 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,09
<b>20:1n-9</b>	2,43 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,23 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,34 ± 0,03 <sup>c</sup>	2,11 ± 0,00 <sup>d</sup>	< ,0001
<b>22:1n-9</b>	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,24 ± 0,02	0,30
<b>24:1n-9</b>	0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,01 <sup>b</sup>	< ,0001
<b>Sum MUFA</b>	45,50 ± 0,29 <sup>a</sup>	41,15 ± 0,32 <sup>b</sup>	44,02 ± 0,19 <sup>c</sup>	37,87 ± 0,17 <sup>d</sup>	< ,0001
<b>18:2n-6</b>	6,71 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,93 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,70 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,15 ± 0,07 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>18:3n-6</b>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,22 ± 0,03 <sup>b</sup>	< 0,05
<b>20:2n-6</b>	0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,47 ± 0,00 <sup>bc</sup>	0,49 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,00 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>20:4n-6</b>	0,49 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,01 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>22:4n-6</b>	0,30 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>Sum n-6</b>	8,01 ± 0,07 <sup>a</sup>	7,46 ± 0,11 <sup>b</sup>	7,84 ± 0,04 <sup>a</sup>	7,32 ± 0,11 <sup>b</sup>	< ,0001
<b>18:3n-3</b>	3,33 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,78 ± 0,06 <sup>b</sup>	6,28 ± 0,03 <sup>c</sup>	9,02 ± 0,12 <sup>d</sup>	< ,0001
<b>18:4n-3</b>	0,66 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,41 ± 0,02 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>20:3n-3</b>	0,22 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,51 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,79 ± 0,00 <sup>d</sup>	< ,0001
<b>20:5n-3</b>	3,16 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,55 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,07 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,38 ± 0,04 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>22:5n-3</b>	1,03 ± 0,00	1,16 ± 0,01	0,91 ± 0,16	1,02 ± 0,17	0,55
<b>22:6n-3</b>	13,94 ± 0,20 <sup>a</sup>	16,58 ± 0,18 <sup>b</sup>	13,55 ± 0,06 <sup>a</sup>	16,18 ± 0,11 <sup>b</sup>	< ,0001
<b>Sum n-3</b>	22,34 ± 0,32 <sup>a</sup>	24,97 ± 0,29 <sup>b</sup>	25,35 ± 0,28 <sup>b</sup>	31,79 ± 0,47 <sup>c</sup>	< ,0001
<b>EPA+DHA:</b>	17,10 ± 0,25 <sup>a</sup>	20,14 ± 0,20 <sup>b</sup>	16,62 ± 0,08 <sup>a</sup>	19,55 ± 0,15 <sup>b</sup>	< ,0001

<sup>1</sup>Sum mettede fettsyrer (SFA) inkluderer 15:0, 17:0, 19:0, 21:0, 23:0

### Fettsyre og sterolsammensetning av lever og fettsyresammensetning av muskel og erythrocytter

Det var ingen forskjeller i total fettnivå i lever mellom diettgruppene (Tabell 17). Imidlertid ble nivåene av nøytrale lipider påvirket av inklusjonsnivået av oljene, men ikke av oljekilde. Både total triacylglycerid (TAG) ( $p = 0,01$ ) og total diacylglycerid (DAG) ( $p = 0,03$ ) var signifikant lavere i begge diettgruppene med høye EPA og DHA nivåer sammenlignet med gruppene med lave nivåer av disse

fettsyrene (ikke vist). Dette er i overenstemmelse med tidligere publisert informasjon, som viser at økende nivåer av EPA og DHA reduserer TAG nivået i lever (Jordal, et al., 2007; Leaver, et al., 2008; Ruyter, et al., 2006; Sanden, et al., 2016b).

Det var ingen forskjell i prosentandelen av mettede fettsyrer mellom diettgruppene i lever. Prosentandelen av MUFA og n-6-FA var lavere i de høye gruppene sammenlignet med de lave gruppene. Det motsatte resultatet ble funnet for innholdet av totalt n-3-fettsyrer, der de to høye diettene hadde de høyeste prosentandelene av n-3-fettsyrer. Prosentandelen av EPA var lavere i leveren til de to gruppene som fikk DHA-CA dietter sammenlignet med FO dietter, mens 18:3n-3 var høyere. Totalnivå av EPA+DHA var generelt kun påvirket av oljenivå i fôr og ikke av type olje (FO vs DHA-CA).

Tabell 17 Totalfett og fettsyreprofil (% av totale fettsyrer) i lever (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Total fett</b>	6,3±0,66	6,4±0,25	6,3±0,23	5,8±0,27	0,65
<b>14:0</b>	1,62±0,07 <sup>ab</sup>	1,76±0,12 <sup>a</sup>	1,40±0,03 <sup>b</sup>	1,43±0,04 <sup>b</sup>	0,02
<b>16:0</b>	18,80±0,54	18,53±0,17	18,51±0,23	18,31±0,21	0,76
<b>18:0</b>	4,39±0,20	4,40±0,16	4,52±0,07	4,73±0,13	0,39
<b>Sum SFA<sup>1</sup></b>	25,56±0,87	25,61±0,28	25,54±0,32	25,68±0,27	0,99
<b>16:1 n-7</b>	1,78±0,10 <sup>a</sup>	1,54±0,10 <sup>ab</sup>	1,41±0,07 <sup>b</sup>	1,34±0,06 <sup>b</sup>	0,02
<b>16:1 n-9</b>	0,40±0,04	0,39±0,0	0,40±0,02	0,38±0,01	0,93
<b>18:1 n-9</b>	23,26±0,59 <sup>a</sup>	19,14±0,47 <sup>c</sup>	21,72±0,29 <sup>ab</sup>	20,31±0,59 <sup>bc</sup>	0,002
<b>20:1 n-7</b>	3,34±0,07 <sup>b</sup>	3,70±0,07 <sup>a</sup>	3,18±0,12 <sup>bc</sup>	3,01±0,10 <sup>c</sup>	0,004
<b>22:1 n-11</b>	0,49±0,08 <sup>c</sup>	0,55±0,03 <sup>bc</sup>	0,76±0,13 <sup>ab</sup>	0,96±0,03 <sup>a</sup>	0,01
<b>Sum MUFA<sup>2</sup></b>	30,34±0,87 <sup>a</sup>	26,68±0,35 <sup>b</sup>	28,37±0,29 <sup>b</sup>	26,94±0,65 <sup>b</sup>	0,008
<b>18:2 n-6</b>	3,02±0,04 <sup>a</sup>	2,31±0,07 <sup>b</sup>	2,96±0,07 <sup>a</sup>	2,59±0,16 <sup>b</sup>	0,003
<b>20:2 n-6</b>	0,66±0,05	0,64±0,04	0,83±0,06	0,68±0,01	0,06
<b>20:3 n-6</b>	1,10±0,06 <sup>a</sup>	0,75±0,07 <sup>b</sup>	1,10±0,11 <sup>a</sup>	0,98±0,03 <sup>ab</sup>	0,03
<b>20:4 n-6</b>	1,52±0,09	1,80±0,09	1,65±0,13	1,48±0,05	0,13
<b>Sum n-6<sup>3</sup></b>	6,29±0,12 <sup>a</sup>	5,52±0,14 <sup>b</sup>	6,58±0,11 <sup>a</sup>	5,77±0,16 <sup>b</sup>	0,002
<b>18:3 n-3</b>	1,02±0,06 <sup>c</sup>	0,81±0,04 <sup>c</sup>	1,71±0,08 <sup>b</sup>	2,38±0,18 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>20:3 n-3</b>	0,00±0 <sup>b</sup>	0,21±0,16 <sup>ab</sup>	0,33±0,07 <sup>a</sup>	0,48±0,05 <sup>a</sup>	0,03
<b>20:5 n-3</b>	5,12±0,06 <sup>a</sup>	5,47±0,14 <sup>a</sup>	4,68±0,14 <sup>b</sup>	4,58±0,07 <sup>b</sup>	0,002
<b>22:5 n-3</b>	1,76±0,13	1,68±0,21	1,79±0,16	1,72±0,03	0,95
<b>22:6 n-3</b>	28,12±0,86 <sup>b</sup>	32,54±0,55 <sup>a</sup>	29,97±0,84 <sup>ab</sup>	31,30±1,11 <sup>a</sup>	0,03
<b>Sum n-3<sup>4</sup></b>	36,03±0,85 <sup>b</sup>	40,72±0,68 <sup>a</sup>	38,49±0,62 <sup>ab</sup>	40,46±0,96 <sup>a</sup>	0,01
<b>EPA+DHA</b>	33,24±0,90 <sup>b</sup>	38,01±0,47 <sup>a</sup>	34,65±0,70 <sup>b</sup>	35,88±0,15 <sup>ab</sup>	0,02

<sup>1</sup>Sum (SFA) inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0 and 24:0. <sup>2</sup>Sum (MUFA) inkluderer 14:1n-5, 16:1n-5, 17:1n-7, 18:1n-7, 20:1n-11, 20:1n-9 and 22:1n-9. <sup>3</sup>Sum n-6 inkluderer 18:3n-6 og <sup>4</sup>Sum n-3 inkluderer 16:2n-3.

Tabell 18. viser at kolesterolnivået var likt i lever i alle diettgrupper, mens DHA-CA diettgruppene hadde økte nivåer av fytosteroler, hovedsakelig campesterol og sitosterol sammenlignet med FO gruppene, noe som også gjenspeilet forskjellene i fôrljene.

Tabell 18 Utvalgte steroler i lever i mg kg<sup>-1</sup>. Ulike superskript viser statistisk signifikante forskjeller p<0,05). (snitt±s.e.m.)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>kolesterol</b>	3780 (425)	3894 (241)	3840 (262)	3715 (437)	0,69
<b>Sum fytosterol</b>	52,1 (7,9) <sup>A</sup>	51,8 (15,2) <sup>A</sup>	67,8 (13,4) <sup>B</sup>	58,2 (10,6) <sup>AB</sup>	0,03
<b>β-Sitosterol</b>	15,6 (5,4)	16,7 (9,2)	16,6 (7,5)	14,4 (5,2)	0,90
<b>Campesterol</b>	16,2 (5,1) <sup>A</sup>	12,1 (5,5) <sup>A</sup>	26,1 (9,2) <sup>B</sup>	21,7 (5,8) <sup>B</sup>	0,0005
<b>Brassicasterol</b>	5,2 (2,8)	5,9 (1,9)	7,7 (2,0)	5,9 (1,7)	0,39
<b>Sitostanol</b>	2,5 (0,8) <sup>A</sup>	2,6 (1,3) <sup>AB</sup>	3,4 (1,0) <sup>B</sup>	3,3 (0,6) <sup>B</sup>	0,04

Fett og fettsyresammensetning av muskel til fisk i forsøket ved 12°C er vist i Tabell 19. Det var en lavere prosent av mettede fettsyrer og høyere prosent av totale n-3-fettsyrer i begge DHA-CA-gruppene sammenlignet med FO-gruppene, noe som reflekterer sammensetningen av de ulike diettene. EPA prosent var lavere og DHA høyere i DHA-CA gruppene sammenlignet med FO gruppene.

Tabell 19 Totalfett og fettsyreprofil (% av totale fettsyrer) i muskel (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Totalfett</b>	5,02±0,14	5,30±0,18	4,71±0,32	5,54±0,20	0,12
<b>14:0</b>	3,40±0,02 <sup>b</sup>	3,83±0,02 <sup>a</sup>	3,09±0,17 <sup>c</sup>	2,94±0,01 <sup>c</sup>	0,0004
<b>16:0</b>	13,66±0,07 <sup>ab</sup>	14,20±0,22 <sup>a</sup>	13,20±0,29 <sup>b</sup>	13,09±0,06 <sup>b</sup>	0,01
<b>18:0</b>	2,72±0,04	2,55±0,39	2,69±0,03	2,86±0,06	0,76
<b>20:0</b>	1,12±0,02 <sup>c</sup>	1,29±0,01 <sup>b</sup>	1,30±0,02 <sup>b</sup>	1,59±0,06 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>Sum SFA<sup>1</sup></b>	21,47±0,10 <sup>ab</sup>	22,49±0,48 <sup>a</sup>	20,75±0,44 <sup>b</sup>	20,92±0,16 <sup>b</sup>	0,03
<b>16:1 n-7</b>	2,57±0,03 <sup>ab</sup>	2,95±0,05 <sup>a</sup>	2,28±0,31 <sup>b</sup>	2,11±0,03 <sup>b</sup>	0,03
<b>18:1 n-9</b>	29,48±0,43 <sup>a</sup>	25,29±0,21 <sup>b</sup>	28,47±1,11 <sup>a</sup>	27,23±0,71 <sup>ab</sup>	0,01
<b>18:1 n-7</b>	3,87±0,36	3,61±0,45	4,07±0,92	3,39±0,41	0,85
<b>20:1 n-9</b>	6,30±0,01 <sup>b</sup>	7,05±0,08 <sup>a</sup>	5,98±0,20 <sup>bc</sup>	5,56±0,20 <sup>c</sup>	0,0006
<b>22:1 n-11</b>	0,80±0,03 <sup>c</sup>	0,85±0,01 <sup>bc</sup>	0,96±0,04 <sup>b</sup>	1,22±0,07 <sup>a</sup>	0,0007
<b>Sum MUFA<sup>2</sup></b>	44,10±0,31 <sup>a</sup>	41,23±0,44 <sup>bc</sup>	42,70±0,09 <sup>ab</sup>	40,62±0,83 <sup>c</sup>	0,005
<b>18:2 n-6</b>	5,06±0,03 <sup>a</sup>	4,25±0,02 <sup>c</sup>	5,10±0,16 <sup>a</sup>	4,69±0,12 <sup>b</sup>	0,001
<b>20:2 n-6</b>	0,44±0,00	0,42±0,02	0,47±0,02	0,44±0,02	0,19
<b>20:4 n-6</b>	0,27±0,01 <sup>b</sup>	0,22±0,00 <sup>c</sup>	0,29±0,01 <sup>ab</sup>	0,32±0,00 <sup>a</sup>	0,0006
<b>Sum n-6<sup>3</sup></b>	5,92±0,03 <sup>a</sup>	5,10±0,06 <sup>b</sup>	6,00±0,17 <sup>a</sup>	5,63±0,15 <sup>a</sup>	0,003
<b>18:3 n-3</b>	3,21±0,05 <sup>c</sup>	2,69±0,03 <sup>c</sup>	5,10±0,50 <sup>b</sup>	7,18±0,31 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>20:3 n-3</b>	0,30±0,01 <sup>c</sup>	0,25±0,00 <sup>c</sup>	0,50±0,06 <sup>b</sup>	0,71±0,03 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>20:5 n-3</b>	9,14±0,09 <sup>b</sup>	10,76±0,04 <sup>a</sup>	8,37±0,47 <sup>bc</sup>	7,89±0,15 <sup>c</sup>	0,0002
<b>22:5 n-3</b>	1,14±0,06	1,43±0,21	0,96±0,04	0,98±0,03	0,06
<b>22:6 n-3</b>	12,23±0,32	13,28±13,28	13,43±0,28	13,88±0,37	0,06
<b>Sum n-3</b>	26,02±0,44 <sup>c</sup>	28,41±0,55 <sup>b</sup>	28,35±0,34 <sup>b</sup>	30,63±0,77 <sup>a</sup>	0,003
<b>EPA+DHA</b>	21,37±0,37 <sup>b</sup>	24,04±0,40 <sup>a</sup>	21,79±0,22 <sup>b</sup>	21,77±0,44 <sup>b</sup>	0,003

<sup>1</sup>Sum (SFA) inkluderer 15:0, 17:0 and 24:0. <sup>2</sup>Sum (MUFA) inkluderer 14:1n-5, 16:1n-5, 16:1n-9, 17:1n-7, 20:1n-11, og 22:1n-9

<sup>3</sup>Sum n-6 inkluderer 18:3n-6.

Tabell 20 viser totalt fettnivå og fettsyreprofil i erythrocytter. Totalt fettinnhold var likt i alle grupper. Prosentandelen av mettede FA var generelt høyere i FO-gruppene enn i de to DHA-CA-gruppene, mens de enumettede fettsyrer og totale n-6-FA var like i alle diettgrupper. De totale n-3-FA var lavere i FO-gruppene i forhold til de tilsvarende DHA-CA-grupper (Lav FO vs Lav DHA-CA og Høy FO vs Høy DHA-CA). Økningen i total n-3 skyldtes høyere innhold av 18:3n-3 i DHA-CA diettene. EPA var høyere i FO-gruppene enn i DHA-CA-gruppene på grunn av høyere innhold av EPA i FO dietter. Imidlertid var det ingen signifikant forskjell i DHA i erythrocytter.

Tabell 20 Total fett og fettsyreprofil (% av alle fettsyrer) i erythrocytter (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Totalfett</b>	2,64±0,13	2,61±0,03	2,43±0,05	2,61±0,26	0,74
<b>14:0</b>	1,33±0,05 <sup>b</sup>	1,55±0,09 <sup>a</sup>	1,25±0,03 <sup>b</sup>	1,25±0,03 <sup>b</sup>	0,01
<b>16:0</b>	15,05±0,16 <sup>ab</sup>	15,25±0,10 <sup>a</sup>	14,54±0,46 <sup>ab</sup>	14,19±0,22 <sup>b</sup>	0,08
<b>18:0</b>	2,59±0,09	2,39±0,08	2,56±0,07	2,62±0,09	0,25
<b>Sum SFA<sup>1</sup></b>	20,21±0,12 <sup>ab</sup>	20,63±0,29 <sup>a</sup>	19,60±0,29 <sup>b</sup>	19,54±0,06 <sup>b</sup>	0,02
<b>16:1 n-7</b>	1,46±0,03 <sup>a</sup>	1,45±0,08 <sup>a</sup>	1,17±0,04 <sup>b</sup>	1,15±0,05 <sup>b</sup>	0,005
<b>18:1 n-11</b>	1,34±0,07 <sup>b</sup>	1,52±0,01 <sup>a</sup>	1,24±0,02 <sup>b</sup>	1,32±0,01 <sup>b</sup>	0,005
<b>18:1 n-9</b>	18,14±0,36 <sup>a</sup>	14,47±0,73 <sup>c</sup>	17,59±0,33 <sup>ab</sup>	15,51±1,07 <sup>bc</sup>	0,02
<b>18:1 n-7</b>	1,85±0,01 <sup>b</sup>	1,85±0,05 <sup>b</sup>	1,99±0,05 <sup>ab</sup>	2,07±0,08 <sup>a</sup>	0,05
<b>20:1 n-9</b>	4,15±0,06 <sup>ab</sup>	4,32±0,12 <sup>a</sup>	3,83±0,15 <sup>bc</sup>	3,62±0,15 <sup>c</sup>	0,02
<b>22:1 n-11</b>	3,45±0,17 <sup>a</sup>	3,74±0,12 <sup>a</sup>	2,99±0,10 <sup>b</sup>	2,97±0,12 <sup>b</sup>	0,008
<b>Sum MUFA<sup>2</sup></b>	33,87±0,61	30,91±1,16	32,66±0,10	30,90±1,12	0,11
<b>18:2 n-6</b>	2,98±0,11 <sup>a</sup>	2,39±0,02 <sup>c</sup>	3,16±0,05 <sup>a</sup>	2,66±0,08 <sup>b</sup>	0,0003
<b>20:4 n-6</b>	0,89±0,05	0,86±0,10	0,87±0,11	0,79±0,09	0,85
<b>Sum n-6<sup>3</sup></b>	6,42±0,05	5,58±0,25	6,70±0,56	6,05±0,33	0,21
<b>18:3 n-3</b>	1,32±0,05 <sup>c</sup>	1,07±0,01 <sup>c</sup>	2,44±0,11 <sup>b</sup>	3,28±0,15 <sup>a</sup>	< ,0001
<b>20:5 n-3</b>	6,07±0,10 <sup>b</sup>	6,84±0,29 <sup>a</sup>	5,17±0,08 <sup>c</sup>	5,23±0,10 <sup>c</sup>	0,0003
<b>22:5 n-3</b>	1,60±0,15	1,72±0,06	1,44±0,24	1,13±0,52	0,56
<b>22:6 n-3</b>	27,27±0,54	30,13±0,66	28,31±1,11	30,07±0,62	0,08
<b>Sum n-3<sup>4</sup></b>	37,38±0,66	40,59±1,04	38,60±0,88	40,83±0,90	0,07
<b>EPA+DHA</b>	33,35±0,64	36,97±0,94	33,49±1,19	35,30±0,63	0,06
<b>Omega-3 index<sup>5</sup></b>	33,4±0,6 <sup>b</sup>	37,1±0,9 <sup>a</sup>	33,7±1,1 <sup>b</sup>	35,6±0,6 <sup>ab</sup>	0,05

<sup>1</sup>Sum (SFA) inkluderer 15:0, 17:0, 20:0, 22:0 og 24:0. <sup>2</sup>Sum (MUFA) inkluderer 14:1n-5, 16:1n-5, 16:1n-9, 17:1n-7, 20:1n-11, 20:1n-7, 22:1n-7 og 24:1n-9. <sup>3</sup>Sum n-6 inkluderer 16:2n-6, 18:3n-6, 20:2n-6, 20:3n-6 og 22:4n-6. <sup>4</sup>Sum n-3 inkluderer 18:4n-3, 20:3n-3 og 20:4n-3. <sup>5</sup>Omega-3 index: mengde EPA+DHA i % av total fettsyrer

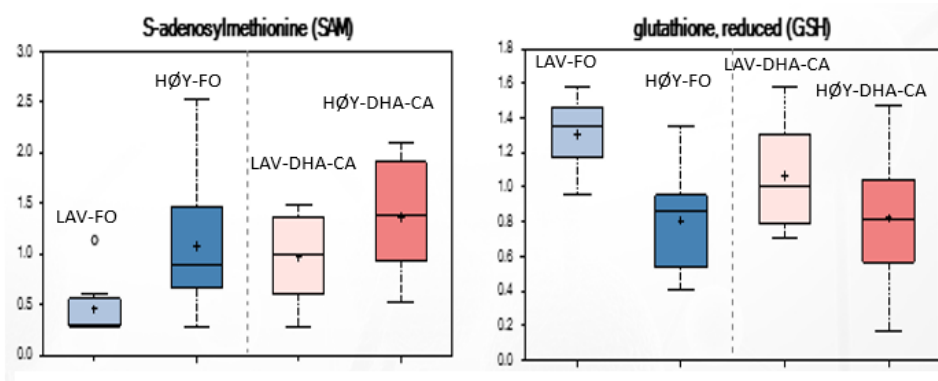
#### 5.1.4 Helsemarkører i lever og tarm

Tabell 21 viser aktivitet av noen antioksidantzymer involvert i oksidativ stressrespons i lever. Det var ingen signifikante forskjeller i aktivitetene til enzymene katalase, glutation peroxidase (GPX) og superoxide dismutase (SOD) mellom de ulike diettgruppene. Redusert glutathion (GSH) var påvirket av oljenivået, med høyere nivåer i Lav gruppene sammenlignet med Høy gruppene ( $p = 0,003$ ,  $q = 0,04$ ), uavhengig av oljekilde. Oksidert glutation var konstant (ikke vist). Da oksidert glutation var konstant, ble forholdet oksidert til redusert glutation økt ved høye oljeinklusjonsnivåer, noe som indikerer høyere cellulært oksidativt stress i lever til fisk i begge Høy grupper sammenlignet med Lav grupper uavhengig av oljekilde, noe som er i overensstemmelse med tendens til høyere katalaseaktivitet i de samme gruppene. Flerumettede fettsyrer er mer utsatt for lipidperoksidering enn monoumettede og mettede fettsyrer, og det er vist i flere publikasjoner at høye nivåer av flerumettede fettsyrer i vev og

organer fører til oppregulering av kroppens antioksidant forsvar som dermed bidrar til å hindre lipidperoksidering (Kjær, et al., 2008).

Tabell 21 Aktivitet av enzymer involvert i oksidative stressresponser (snitt±s.e.m., n=3)

	LAV FO	HØY FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Katalase (U/µg protein)</b>	83,7 ± 11,8	101,6 ± 9,3	76,3 ± 11,0	83,6 ± 3,4	0,34
<b>GPX (nmol/min/mg protein)</b>	10,7 ± 0,7	9,8 ± 0,9	10,1 ± 2,8	9,5 ± 0,8	0,96
<b>SOD (% inhibition rate/mg protein)</b>	4,6 ± 0,1	3,9 ± 0,1	3,9 ± 1,4	4,6 ± 0,1	0,12



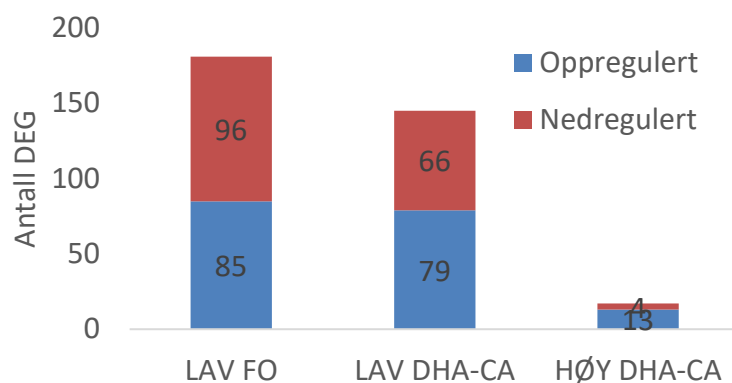
Figur 4 Nivå av metabolittene S-adenosylmethionine (SAM) og glutathionone (GSH) relatert til redoksprosesser i lever

### Genuttrykk lever

Microarray-analyse av genuttrykksprofilene i lever til laks i de ulike diettgruppene viste at profilene til fisk fôret med høy DHA-CA og Høy FO var nesten identiske, kun et veldig lite antall gener viste forskjell i genuttrykk (DEG, differentially expressed genes) (17 gener totalt) (Figur 5). Sammenligning av profilene til fisk fôret med Lav DHA-CA og lav FO var også relativt like. Forskjeller i genuttrykk var hovedsakelig relatert til nivåene av EPA og DHA i dietten, flere gener var forskjellig uttrykt når man sammenligner de to Lav gruppene med Høy gruppene (mer enn 150 gener). Forskjellene i genuttrykk var dermed ikke relatert til oljekilde, kun til nivå av oljekildene i dietten.

I Lav gruppene, med lave nivåer av EPA og DHA i diettene, så var en del gener relatert til lipidmetabolisme, kolesterol og steroid metabolisme oppregulert sammenlignet med Høy gruppene (Tabell 22). Mikroarray-analysen viste ingen signifikante forskjeller i uttrykk av gener forbundet med stress, apoptose, betennelse, xenobiotisk metabolisme eller andre prosesser som kan indikere bivirkninger av DHA-CA oljen.





Figur 5 Differensielt uttrykte gener (DEG) i lever fra laks i forhold til Høy FO gruppen

Tabell 22 Genuttrykk i lever fra fisk gitt de forskjellige forsøksfôrene. HØY FO brukes som referanse, data fra de andre diettene er oppgitt relativt til HØY FO

	LAV FO	LAV DHA-CA	HØY DHA-CA
Diphosphomevalonate decarboxylase	1,88	2,05	1,29
Endothelial lipase	3,14	2,44	1,45
Farnesyl diphosphate synthase 1	2,94	3,32	1,68
Farnesyl diphosphate synthase 2	2,94	3,27	1,65
Fatty acid-binding protein, brain	2,50	1,88	1,15
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	2,40	2,80	1,52
Insulin-induced gene 1	1,82	2,01	1,68
Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	2,52	2,50	1,36
7-dehydrocholesterol reductase	1,65	1,44	1,41
7-dehydrocholesterol reductase	1,79	1,91	1,61
Lanosterol 14-alpha demethylase 1	2,04	1,54	1,22
Lanosterol 14-alpha demethylase 2	1,53	1,81	1,26
Lanosterol synthase	2,14	1,90	1,47
Lipin 1	1,80	1,58	1,63
Mevalonate kinase	1,50	1,94	1,22
Squalene monooxygenase 1	1,34	1,73	1,30
Squalene monooxygenase 2	2,26	2,42	1,61
Squalene synthase	1,90	2,00	1,40
Stearoyl-CoA desaturase b	3,10	2,73	2,69
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase 1	1,77	1,58	1,26
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase 2	1,44	1,69	1,39
Sterol-C5-desaturase	1,69	1,75	1,56

## Genuttrykk tarm

Tabell 23. viser at det var ingen signifikante forskjeller i genuttrykk av markører for fetttsyreoksidasjon (aco, cpt1), fetttsyresyntese (fas, scd1, scd2), stress (hsp70), betennelse (cox2), apoptose (bax) og oksidativt stress (nrf2, katalase (cat), sod1s, gpx2) i midttarm, noe som indikerer at de ulike fôrljene ikke påvirker tarmhelse og funksjon..

Tabell 23 Genuttrykk tarm (snitt $\pm$ s.e.m., n=5). Genuttrykksnivåene ble sammenlignet i de lave og de høye gruppene av FO og DHA-CA. Det var ingen signifikante forskjeller mellom genuttrykk i de ulike diettgruppene  $p>0,05$

	LAV FO	LAV DHA-CA	HØY FO	HØY DHA-CA
<i>scd1</i>	0,0 $\pm$ 0,1	-0,2 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1
<i>scd2</i>	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,1	0,0 $\pm$ 0,1
<i>fas</i>	0,0 $\pm$ 1,1	1,0 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 1,1	0,1 $\pm$ 0,4
<i>aco</i>	0,0 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1
<i>cpt1</i>	0,0 $\pm$ 1,0	2,8 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,8	-0,7 $\pm$ 0,9
<i>cox2</i>	0,0 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,3	0,0 $\pm$ 0,4	-0,3 $\pm$ 0,2
<i>hsp70</i>	0,0 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
<i>bax</i>	0,0 $\pm$ 0,3	-0,2 $\pm$ 0,2	-0,2 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,1
<i>gpx2</i>	0,0 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,2
<i>cat</i>	0,0 $\pm$ 1,6	1,5 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,5	-0,2 $\pm$ 1,1
<i>sod1s</i>	0,0 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,2	-0,1 $\pm$ 0,1
<i>nrf2</i>	0,0 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1

### 5.1.5 Generell diskusjon og konklusjon ferskvannsforsøk

Resultater så langt viser at den modifiserte rapsoljen (DHA-CA) har en gunstig fetttsyreprofil sammenlignet med konvensjonelle planteoljer, med høye nivåer av omega-3 fetttsyrene 18:3n-3 og DHA. Nivåer av fytosteroler, vitamin E og mineraler i den omega-3 modifiserte rapsoljen faller innenfor den naturlige variasjonen for kommersielle rapsoljer. Det ble ikke funnet nivåer over LOQ av fremmedstoffer som plantevern-midler, mykotoksiner og PAH. Det ble heller ikke påvist plante-DNA.

Det er gjennomført to fôringsforsøk med laks i ferskvann hvor formålet har vært å evaluere eventuell risiko ved bruk av omega-3-rik modifisert rapsolje på fiskens ytelse, sammensetning og helse ved to vanntemperaturer. Fisken økte vekten ca 20 ganger ved 16° C og 10 ganger ved 12 °C. Begge forsøkene viste høy overlevelse på tvers av alle diettgrupper og tilsvarende tilvekst i laks fôret med en fiskeoljedielt som i laks fôret med omega-3 modifisert rapsolje. Laksen fôret med omega-3 modifisert rapsolje hadde samme EPA + DHA nivå i helkropp som laks som ble fôret med fiskeolje. Analyser av genuttrykk viste at det kun var effekt av hvor mye olje som var tilsatt, ikke av type olje. Forsøket viste i tillegg at det ikke var noen forskjell i ulike helsemarkører i lever, tarm og muskel mellom de ulike diettgruppene pga. olje kilde, kun av dose.

## 5.2 Olje fra modifisert raps i fôr til stor laks i sjøvann

Det er også gjennomført et forsøk med laks fra 500 g til 1,2 kg i kar på land i sjøvann hvor målet var å studere hvordan omega-3 modifisert rapsolje i fôret påvirket vekst, sammensetning og muskelkvalitet når laksen fikk fôr med økende innblanding av DHA-CA olje og redusert nivå av standard rapsolje.

### 5.2.1 Fettsyresammensetning av diettgruppene

Det var fire ulike diettgrupper med økende innblanding av DHA-CA, henholdsvis 0 %, 25 %, 50 % og 100 % erstatning av rapsolje i diettene. Fettsyresammensetningen av diettene gjenspeiler fettsyresammensetningen av fôroljene (Tabell 4. i material og metode). Med økende innblanding av DHA-CA olje i diettene reduseres nivået av n-6 fettsyrer fra 20,5 % av total fettsyrer til 9,7 % av totale fettsyrer. Sum n-3 fettsyrer øker fra 11,6 til ca 30 % av totale fettsyrer i fôret. EPA er relativt stabil i alle diettene fra (2,0 til 2,2 %), mens DHA øker fra 2,1 til 9,2 % og 18:3n-3 fra 7 til 16 %.

### 5.2.2 Vekst, fôrfaktor, slakteparametere

Tabell 24. viser ingen signifikante forskjeller i vekst og fôrfaktor (FCR) mellom diettgruppene. Det var tendens til dårligere vekst i 25 % DHA-CA gruppen. Dette har ingen opplagt forklaring, men fôrintaket for 25 % DHA-CA gruppen var noe lavere i første fase av forsøket, mens fôrintaket for 50 % og 100 % DHA-CA gruppene var lik kontrollen (data ikke vist). Redusert fôrintak innledningsvis i 25 % gruppen tyder dermed ikke på forskjeller i smakelighet av dietter med og uten DHA-CA. Det var god overlevelse i alle diettgrupper (>98 %). Det var ingen signifikante forskjeller mellom grupper i kondisjonsfaktor (K-faktor) og hepatosomatisk index (HSI) (Tabell 25).

Tabell 24 Vekt, vekstrate og fôrfaktor (snitt±s.e.m.)

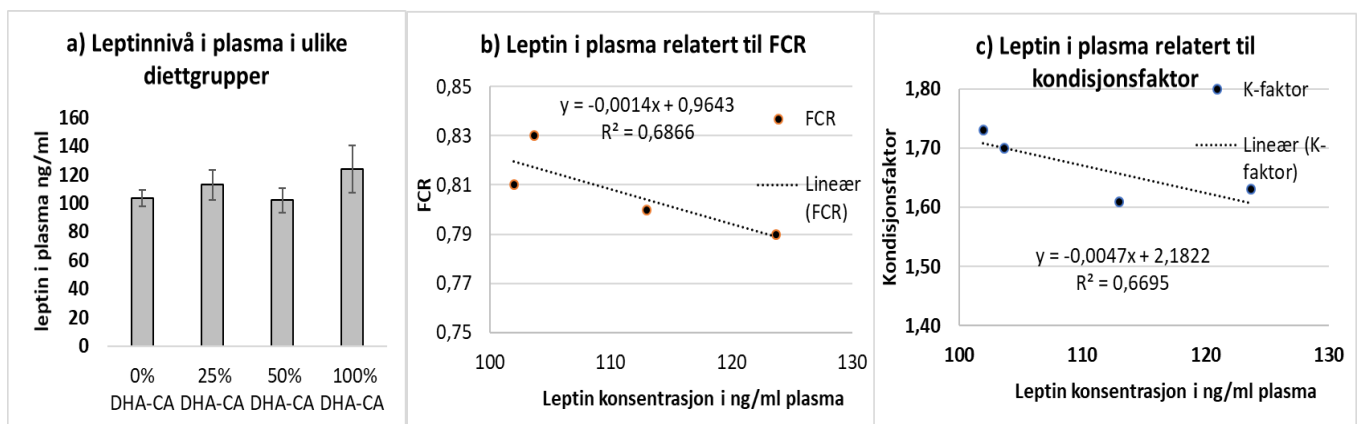
	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA	ANOVA p-verdi
Startvekt, g	462 ± 2	470 ± 10	466 ± 2	462 ± 3	0,69
Sluttvekt, g	1525 ± 35	1373 ± 34	1495 ± 3	1451 ± 55	0,12
SGR, %	1,18 ± 0,01	1,06 ± 0,01	1,16 ± 0,01	1,14 ± 0,04	0,06
TGC	3,78 ± 0,07	3,36 ± 0,04	3,70 ± 0,02	3,61 ± 0,15	0,06
FCR	0,81 ± 0,01	0,83 ± 0,02	0,79 ± 0,0	0,80 ± 0,01	0,14

Tabell 25 Slakteparametere i prøvefisk, individuelle observasjoner (snitt±s.e.m.)

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA	ANOVA p-verdi
Vekt	1564 ± 43	1339 ± 48	1511 ± 47	1415 ± 63	0,13
K-faktor	1,70 ± 0,03	1,61 ± 0,03	1,73 ± 0,03	1,63 ± 0,04	0,25
HSI	1,64 ± 0,05	1,89 ± 0,11	1,83 ± 0,06	1,85 ± 0,08	0,33
CSI	0,11 ± 0,002	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,004	0,12 ± 0,002	0,68

Vår studie viste ingen signifikante effekter på leptinkonsentrasjonen i plasma mellom de ulike diettgruppene (Figur 6.).

Det finnes en del motstridene resultater vedrørende leptins rolle og funksjon i laks, men resultater fra en studie av Murashita et al., 2011 tyder på at økt leptin i plasma til laks fører til redusert vekst ved å påvirke fôrintaket (Murashita, et al., 2011). Vi har tidligere vist at leptin produseres i fettvev til laks (Bou, et al., 2018). Det er ikke kjent for laks, men det antas at leptin skilles ut proporsjonalt med mengde fettvev og dermed tar del i langtidsreguleringen av fôrintak. Dersom vi ser bort i fra diettgrupper og kun sammenligner fôrintak mot leptin i plasma og kondisjonsfaktor mot leptin i plasma, så indikerer dataene en lineær sammenheng mellom fôrutnyttelse (FCR) og leptinkonsentrasjon i plasma ( $r^2 = 0,69$ ), dvs høye leptinnivåer i plasma sammenfaller med lavt fôrintak, noe som er i overensstemmelse med funnene av (Murashita, et al., 2011). Dersom vi ser på sammenhengen mellom leptin i plasma og kondisjonsfaktor, så finner vi også en lineær sammenheng ( $r^2 = 0,67$ ) (Figur 6.), dvs lave leptin-konsentrasjoner er korrelert til høy kondisjonsfaktor, noe som er i motsetning til funnene i pattedyr.



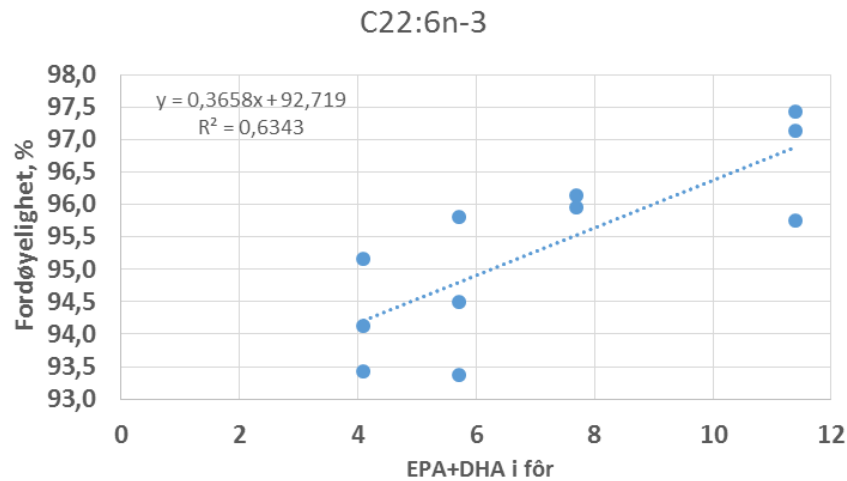
Figur 6 a) Leptinnivå i plasma i ng/ml (snitt±s.e.m., n=3), b) leptin relatert til FCR (basert på gjennomsnittstall per kar, n=3), c) leptin relatert til kondisjonsfaktor (basert på gjennomsnittstall per kar, n=3)

### 5.2.3 Fordøyelighet av fett, fettsyrer og nitrogen

Det var generelt god fordøyelighet av næringsstoff og ingen signifikante forskjeller i fordøyelighet av protein (nitrogen) og fett mellom diettgruppene (Tabell 26). Det var heller ingen forskjell i fordøyelighet av de fleste fettsyrer mellom de ulike diettgruppene, bortsett fra økt fordøyelighet av DHA og DPA 22:5n-3 med økende nivå av DHA-CA i dietten. Figur 7 viser fordøyelighet av DHA i forhold til innhold av EPA+DHA i fôr. Det er en signifikant regresjon, der bedret fordøyelighet sammenfaller med økende innhold av EPA + DHA i fôr. Dette sammenfaller også med økende % av DHA-CA olje i fôr. Samme mønster sees for DPA og DPA ( $r^2 = 0,80$ ) med høyere forklaringsgrad enn for DHA ( $r^2 = 0,63$ ).

Tabell 26 Apparent fordøyelighet

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Nitrogen</b>	89,3 ± 0,4	86,9 ± 0,5	88,8 ± 0,7	86,4 ± 1,5	0,17
<b>Lipid</b>	93,3 ± 0,4	93,2 ± 1,0	95,0 ± 0,2	93,3 ± 1,7	0,72
<b>14:0</b>	92,4 ± 0,7	91,9 ± 1,2	94,3 ± 0,7	91,4 ± 2,9	0,77
<b>16:0</b>	88,2 ± 0,7	86,9 ± 1,2	88,0 ± 0,9	85,9 ± 3,3	0,84
<b>18:0</b>	85,7 ± 0,7	83,1 ± 1,2	84,0 ± 1,0	83,0 ± 3,8	0,81
<b>20:0</b>	84,3 ± 0,8	81,8 ± 0,9	82,8 ± 1,5	82,5 ± 3,8	0,88
<b>22:0</b>	82,5 ± 0,8	80,4 ± 0,9	79,3 ± 0,5	77,9 ± 3,6	0,48
<b>24:0</b>	83,3 ± 0,6	80,1 ± 1,4	83,0 ± 2,5	85,7 ± 2,1	0,19
<b>SFA</b>	87,9 ± 0,7	86,3 ± 1,1	87,7 ± 0,8	85,8 ± 3,3	0,84
<b>18:1n9</b>	93,3 ± 0,4	93,5 ± 1,1	95,9 ± 0,3	93,2 ± 2,1	0,57
<b>18:1n7</b>	93,4 ± 0,3	93,3 ± 1,1	95,4 ± 0,1	92,7 ± 1,9	0,59
<b>20:1n11</b>	96,8 ± 0,6	97,3 ± 0,5	98,3 ± 0,1	98,0 ± 0,3	0,20
<b>20:1n9</b>	90,6 ± 0,5	89,7 ± 1,4	92,4 ± 0,2	89,8 ± 2,7	0,74
<b>22:1n11</b>	90,6 ± 0,6	88,6 ± 1,4	92,0 ± 0,1	88,6 ± 3,0	0,59
<b>MUFA</b>	93,0 ± 0,4	93,0 ± 1,1	95,4 ± 0,2	92,8 ± 2,1	0,60
<b>18:2n6</b>	95,8 ± 0,3	95,0 ± 0,7	96,1 ± 0,1	93,6 ± 1,2	0,21
<b>18:3n6</b>	86,9 ± 6,6	95,9 ± 2,0	96,5 ± 0,8	97,4 ± 0,6	0,25
<b>20:2n6</b>	62,5 ± 2,3	64,0 ± 7,1	68,1 ± 3,2	75,0 ± 5,5	0,37
<b>20:4n6</b>	89,3 ± 1,2	88,0 ± 1,6	93,4 ± 6,6	82,9 ± 17,1	0,91
<b>Sum n-6</b>	95,6 ± 0,3	94,8 ± 0,8	95,9 ± 0,2	93,5 ± 1,1	0,23
<b>18:3n3</b>	97,2 ± 0,3	96,7 ± 0,7	98,2 ± 0,2	96,8 ± 0,9	0,52
<b>20:4n3</b>	91,4 ± 0,1	92,1 ± 0,9	93,7 ± 0,5	91,2 ± 2,1	0,62
<b>20:5n3</b>	97,2 ± 0,3	95,9 ± 0,6	96,7 ± 0	96,2 ± 0,6	0,32
<b>22:5n3</b>	93,2 ± 0,9 <sup>c</sup>	94,7 ± 0,2 <sup>bc</sup>	96,0 ± 0,3 <sup>ab</sup>	97,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,004
<b>22:6n3</b>	94,2 ± 0,5 <sup>b</sup>	94,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	96,0 ± 0,1 <sup>ab</sup>	96,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,04
<b>Sum n-3</b>	96,5 ± 0,2	95,9 ± 0,6	97,3 ± 0,1	96,6 ± 0,8	0,54
<b>EPA+DHA</b>	95,6 ± 0,3	95,0 ± 0,6	96,2 ± 0,1	96,7 ± 0,5	0,18



Figur 7 Fordøyelighet av DHA i forhold til innhold av EPA+DHA i fôr (n=3)

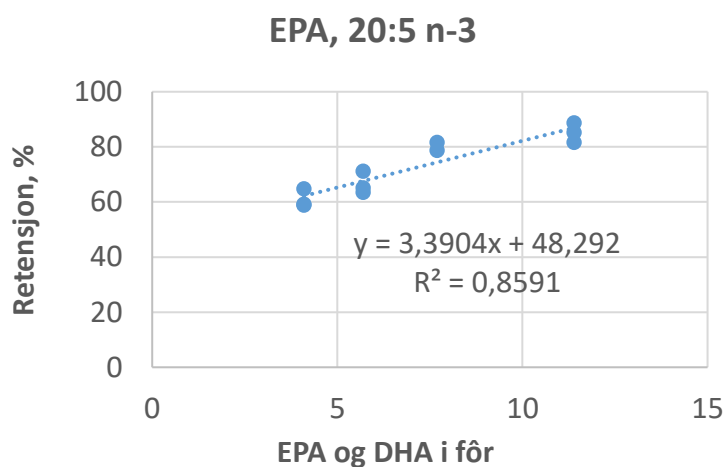
#### 5.2.4 Retensjon av næringsstoff i helkropp

Retensjon av fettsyrer er vist in Tabell 27. Retensjonen av mettede, mono-umettede og polyumettede fettsyrer var relativt lik mellom alle diettgruppene. Retensjon EPA økte betydelig med økende inkludering av DHA-CA i fôret. Den høyere retensjonen av EPA kan mest sannsynlig tilskrives omdannelse av ALA (18:3n-3) til EPA av fisken. I et eget eksperiment ble det vist at hepatocytter isolert fra fisk i fôringsforsøket, var i stand til å omdanne ALA til EPA. Det høye ALA-innholdet i DHA-CA oljen gir derfor en indirekte kilde til ytterligere EPA for fisken. DHA-retensjon var derimot høyere i kontrolldietten og ble redusert ettersom nivået av denne fettsyren økte i dietten. Dette er i overensstemmelse med tidligere kjent kunnskap om at når dietter inneholdt et tilstrekkelig innhold av DHA, blir overskytende DHA metabolisert av fisken og mindre retinert i helkropp (Bou, et al., 2017b; Glencross, et al., 2014)

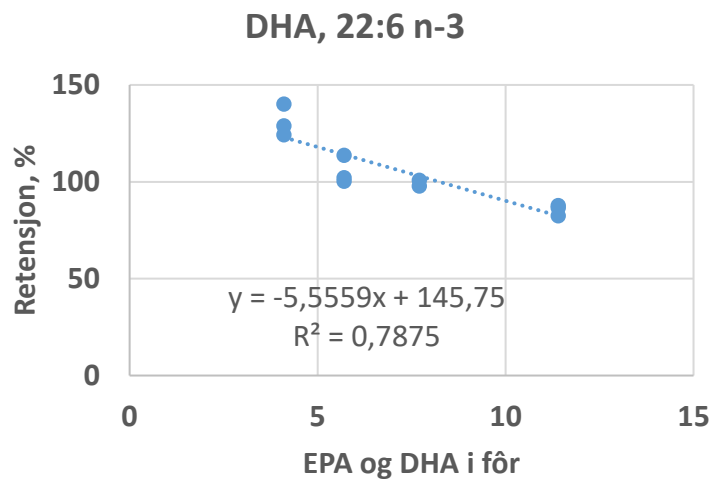
Tabell 27 Apparent retensjon av næringsstoff i helkropp

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA	ANOVA p-verdi
<b>Protein</b>	51,9 ± 0,7	50,2 ± 1,8	55,2 ± 0,3	52,0 ± 1,3	0,19
<b>Lipid</b>	79,2 ± 1,8	76,6 ± 2,2	85,4 ± 0,5	81,8 ± 2,6	0,13
<b>16:0</b>	92,1 ± 1,6	88,8 ± 3,1	101,6 ± 1,6	99,5 ± 3,3	0,04
<b>18:0</b>	104,2 ± 4,6	98,8 ± 3,2	105,3 ± 2,3	98,2 ± 3,2	0,47
<b>20:0</b>	59,4 ± 2,1	53,3 ± 0,9	63,4 ± 0,4	58,9 ± 2,3	0,04
<b>22:0</b>	69,9 ± 1,5	68,2 ± 2,0	78,8 ± 0,4	78,5 ± 12,9	0,65
<b>18:1n-9</b>	69,7 ± 8,9	75,7 ± 2,0	85,6 ± 0,5	83,3 ± 2,9	0,24
<b>18:1n-7</b>	79,8 ± 0,7	80,5 ± 2,6	87,8 ± 1,2	85,0 ± 2,3	0,10
<b>20:1n-9</b>	103,0 ± 2,5	103,5 ± 3,4	107,1 ± 3,1	95,2 ± 3,0	0,14
<b>22:1n-11</b>	62,3 ± 1,7	61,9 ± 2,1	68,4 ± 1,2	69,9 ± 2,7	0,07
<b>18:2n-6</b>	64,1 ± 0,8	65,7 ± 1,7	74,2 ± 0,5	74,4 ± 2,5	0,006
<b>18:3n-3</b>	44,0 ± 1,5	49,9 ± 1,7	58,6 ± 0,2	60,0 ± 2,6	0,002
<b>20:4n-3</b>	102,6 ± 6,2	93,8 ± 4,5	103,6 ± 0,8	99,9 ± 2,3	0,46
<b>20:4n-6</b>	254,3 ± 5,7	136,7 ± 2,1	121,8 ± 4,6	104,1 ± 11,4	<,0001
<b>20:3n-3</b>		377,7 ± 79,4	324,1 ± 19,7	239,6 ± 6,6	
<b>20:5n-3</b>	61,0 ± 1,9	66,7 ± 2,3	80,2 ± 1,4	85,2 ± 2,1	0,0002
<b>22:5n-3</b>	232,1 ± 13,8	137,7 ± 4,5	74,9 ± 50,1	94,4 ± 3,4	0,002
<b>22:6n-3</b>	131,1 ± 4,7	105,3 ± 4,2	99,2 ± 1,5	85,6 ± 1,6	0,0003
<b>EPA+DHA</b>	97,0 ± 3,3	92,1 ± 3,6	94,1 ± 0,7	85,5 ± 1,7	0,10

Det er en lineær sammenheng mellom mengde EPA and DHA i fôr og retensjon av disse fettsyrene, som vist i Figur 8 og Figur 9. Retensjon av EPA øker ( $r^2 = 0,86$ ) med økende innblanding av DHA-CA i fôr (dvs økende innhold av EPA+DHA), men retensjonen av DHA reduseres ( $r^2 = 0,79$ )



Figur 8 Retensjon av EPA i helkropp (n=3)



Figur 9 Retensjon av DHA i helkropp (n=3)

### 5.2.5 Fettsyresammensetning

Tabellene, 28, 29 og 30 viser total fettsyresammensetning av filet, lever og tarm i de ulike fôringsgruppene.

Totalt fettinnhold i filet var litt lavere i de tre DHA-CA diettgruppene sammenlignet med kontrollen, noe som tydet på en noe magrere filet med økende mengde DHA-CA i dietten. Fettsyresammensetningen av filetene viser at når ALA og DHA øker i dietten, økte nivåene av disse fettsyrene i muskel (Tabell 28). ALA og DHA nivåene økte begge fra henholdsvis 3,9 % og 4,8 % til over 10 % av totale fettsyrer. Dette resulterte i en økning i total EPA + DHA i filetene fra ca 7,5 mg EPA + DHA pr. gram filet i kontrollgruppen til 13,7 mg per g filet i 100 % DHA-CA gruppen. Totale omega-6 fettsyrer nivået i filetene ble redusert med økende nivå av DHA-CA i dietten, noe som resulterte i en signifikant endring i n3: n6 forhold fra <1 i kontroll dietten til 2,6 i 100 % DHA-CA gruppen. Nivået av mettet fett ble noe redusert med økt DHA-CA i dietten, noe som gjenspeiler nedgangen i mettet fett i de høye DHA-CA diettene. Fettsyresammensetningen av tarm og lever (Tabell 29 og 30) reflekterte også i stor grad fettsyresammensetningen av fôrene. Når ALA og DHA øker i dietten, økte nivåene av disse fettsyrene i lever og tarm. Totale omega-6 fettsyrer ble redusert i begge disse vevene med økende nivå av DHA-CA i dietten. Nivået av mettet fett ble noe redusert av økt DHA-CA i dietten, noe som gjenspeiler nedgangen i mettet fett i de høye DHA-CA diettene.



Tabell 28 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i fillet til Atlantic laks fôret de ulike diettene i 100 dager. (gjennomsnittsverdier med s.e.m., n = 3, 5 fisk per n, 15 fisk totalt)

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-A	ANOVA
Fett %	14,5 ± 0,58	13,1 ± 0,37	13,2 ± 0,35	13,1 ± 0,44	0,06
14:0	1,6 ± 0,02	1,6 ± 0,03	1,6 ± 0,02	1,6 ± 0,02	0,12
16:0	9,7 ± 0,06 <sup>a</sup>	9,4 ± 0,09 <sup>ab</sup>	9,3 ± 0,05 <sup>bc</sup>	9,1 ± 0,08 <sup>c</sup>	<0,0001
18:0	2,6 ± 0,04	2,5 ± 0,04	2,5 ± 0,02	2,6 ± 0,03	0,2
20:0	0,3 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,001
Σ SFA <sup>1</sup>	<b>14,8 ± 0,11<sup>a</sup></b>	<b>14,5 ± 0,12<sup>ab</sup></b>	<b>14,3 ± 0,08<sup>b</sup></b>	<b>14,2 ± 0,11<sup>b</sup></b>	<b>0,001</b>
16:1 n-9	1,8 ± 0,04	1,8 ± 0,05	1,7 ± 0,04	1,7 ± 0,03	0,9
18:1 n-9	39,0 ± 0,16 <sup>a</sup>	37,1 ± 0,17 <sup>b</sup>	35,7 ± 0,11 <sup>c</sup>	32,2 ± 0,14 <sup>d</sup>	<0,0001
18:1 n-7	2,9 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,01 <sup>c</sup>	<0,0001
20:1 n-11	1,3 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,4 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,6 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,05 <sup>a</sup>	<0,0001
20:1 n-9	4,0 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,9 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,4 ± 0,02 <sup>c</sup>	<0,0001
22:1 n-7	0,7 ± 0,04 <sup>d</sup>	1,1 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,4 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,04 <sup>a</sup>	<0,0001
22:1 n-11	2,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,02 <sup>c</sup>	2,5 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,5 ± 0,01 <sup>b</sup>	<0,0001
22:1 n-9	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>d</sup>	<0,0001
Σ MUFA <sup>2</sup>	<b>53,9 ± 0,17<sup>a</sup></b>	<b>51,9 ± 0,18<sup>b</sup></b>	<b>50,9 ± 0,15<sup>c</sup></b>	<b>47,8 ± 0,15<sup>d</sup></b>	<b>&lt;0,0001</b>
18:2 n-6	15,0 ± 0,09 <sup>a</sup>	13,8 ± 0,09 <sup>b</sup>	12,2 ± 0,04 <sup>c</sup>	8,5 ± 0,04 <sup>d</sup>	<0,0001
18:3 n-6	0,7 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>c</sup>	<0,0001
20:2 n-6	1,2 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,01 <sup>c</sup>	<0,0001
20:3 n-6	0,9 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>d</sup>	<0,0001
20:4 n-6	0,3 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,02 <sup>bc</sup>	<0,0001
Σ n-6 <sup>3</sup>	17,5 ± 0,12 <sup>a</sup>	15,9 ± 0,10 <sup>b</sup>	13,9 ± 0,04 <sup>c</sup>	10,0 ± 0,04 <sup>d</sup>	<0,0001
18:3 n-3	3,9 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,6 ± 0,06 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,06 <sup>c</sup>	10,4 ± 0,11 <sup>d</sup>	<0,0001
20:4 n-3	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,00	0,33
20:3 n-3	0,3 ± 0,01 <sup>d</sup>	0,6 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,03 <sup>a</sup>	<0,0001
20:5 n-3	1,8 ± 0,03 <sup>c</sup>	2,1 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,03 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,04 <sup>a</sup>	<0,0001
22:5 n-3	0,7 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,8 ± 0,05 <sup>c</sup>	1,0 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,02 <sup>a</sup>	<0,0001
22:6 n-3	4,8 ± 0,11 <sup>d</sup>	6,6 ± 0,12 <sup>c</sup>	7,8 ± 0,10 <sup>b</sup>	10,4 ± 0,10 <sup>a</sup>	<0,0001
Σ n-3	<b>11,8 ± 0,14<sup>d</sup></b>	<b>15,9 ± 0,18<sup>c</sup></b>	<b>19,2 ± 0,10<sup>b</sup></b>	<b>26,1 ± 0,14<sup>a</sup></b>	<b>&lt;0,0001</b>

<sup>1</sup>Inkluderer 15:0, 17:0, 22:0, og 24:0. <sup>2</sup>Inkluderer 14:1 n-5, 16:1 n-5, 17:1 n-7, 18:1 n-11, 20:1 n-7, og 24:1 n-9.

<sup>3</sup>Inkluderer 16:2 n-6 og 22:4 n-6.

Tabell 29 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i lever til Atlantic laks føret de ulike diettene i 100 dager. (gjennomsnittsverdier med s.e.m., n = 3, unntatt 50 % DHA-CA dietten hvor n = 2, hver prøve er representert med en pool av 5 fisk)

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-A	ANOVA
14:0	1,0 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,7 ± 0,00 <sup>b</sup>	<0,0001
16:0	5,8 ± 0,22 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,27 <sup>ab</sup>	4,6 ± 0,55 <sup>ab</sup>	4,0 ± 0,28 <sup>b</sup>	0,02
18:0	4,0 ± 0,14 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,13 <sup>ab</sup>	3,4 ± 0,23 <sup>ab</sup>	3,2 ± 0,15 <sup>b</sup>	0,03
20:0	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,24
Σ SFA <sup>1</sup>	<b>11,2 ± 0,29<sup>a</sup></b>	<b>9,4 ± 0,34<sup>b</sup></b>	<b>9,4 ± 0,68<sup>ab</sup></b>	<b>8,5 ± 0,37<sup>b</sup></b>	<b>0,01</b>
16:1 n-9	1,1 ± 0,21	1,0 ± 0,20	0,7 ± 0,69	0,9 ± 0,32	0,85
16:1 n-7	1,0 ± 0,48	0,8 ± 0,41	1,1 ± 1,12	0,8 ± 0,43	0,98
18:1 n-9	43,5 ± 0,99 <sup>a</sup>	43,6 ± 1,02 <sup>a</sup>	41,1 ± 0,19 <sup>ab</sup>	37,9 ± 0,49 <sup>b</sup>	0,005
18:1 n-7	3,2 ± 0,05	3,2 ± 0,06	3,0 ± 0,03	3,0 ± 0,09	0,09
20:1 n-9	6,5 ± 0,07 <sup>a</sup>	6,6 ± 0,06 <sup>a</sup>	6,1 ± 0,02 <sup>ab</sup>	5,6 ± 0,31 <sup>b</sup>	0,01
22:1 n-7	1,1 ± 0,03 <sup>c</sup>	1,5 ± 0,19 <sup>c</sup>	2,8 ± 0,11 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,21 <sup>a</sup>	<0,0001
22:1 n-11	0,8 ± 0,03	0,8 ± 0,01	0,7 ± 0,02	0,9 ± 0,05	0,08
Σ MUFA <sup>2</sup>	<b>58,1 ± 1,17</b>	<b>58,5 ± 1,15</b>	<b>56,5 ± 0,26</b>	<b>54,5 ± 0,71</b>	<b>0,07</b>
18:2 n-6	12,7 ± 0,18 <sup>a</sup>	12,6 ± 0,38 <sup>a</sup>	10,5 ± 0,31 <sup>b</sup>	7,2 ± 0,34 <sup>c</sup>	<0,0001
18:3 n-6	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,00	0,2 ± 0,06	0,38
20:2 n-6	3,0 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,9 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,10 <sup>c</sup>	<0,0001
20:3 n-6	1,6 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>c</sup>	<0,0001
20:4 n-6	0,6 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,03 <sup>bc</sup>	0,2 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,0001
Σ n-6 <sup>3</sup>	<b>16,6 ± 0,12<sup>a</sup></b>	<b>16,2 ± 0,39<sup>a</sup></b>	<b>13,5 ± 0,35<sup>b</sup></b>	<b>9,3 ± 0,42<sup>c</sup></b>	<b>&lt;0,0001</b>
18:3 n-3	2,6 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,4 ± 0,09 <sup>c</sup>	6,5 ± 0,40 <sup>b</sup>	10,6 ± 0,32 <sup>a</sup>	<0,0001
20:4 n-3	0,2 ± 0,04	0,2 ± 0,08	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,04	0,96
20:3 n-3	0,7 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,3 ± 0,06 <sup>c</sup>	2,1 ± 0,17 <sup>b</sup>	3,3 ± 0,21 <sup>a</sup>	<0,0001
20:5 n-3	1,7 ± 0,13 <sup>b</sup>	1,7 ± 0,14 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,00 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,003
22:5 n-3	0,5 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,0 ± 0,09 <sup>ab</sup>	1,3 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,01
22:6 n-3	5,0 ± 0,52	5,0 ± 0,43	6,1 ± 0,59	6,9 ± 0,74	0,12
Σ n-3	<b>10,6 ± 0,62<sup>c</sup></b>	<b>13,0 ± 0,61<sup>c</sup></b>	<b>18,0 ± 0,10<sup>b</sup></b>	<b>25,1 ± 0,62<sup>a</sup></b>	<b>&lt;0,0001</b>

<sup>1</sup>Inkluderer 15:0, 17:0, 22:0 og 24:0. <sup>2</sup>Inkluderer 14:1 n-5, 16:1 n-5, 16:1 n-7, 17:1 n-7, 20:1 n-7, 20:1 n-11, 22:1 n-9, and 24:1 n-9. <sup>3</sup>Inkluderer 16:2 n-6 og 22:4 n-6.

Tabell 30 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i tarm til Atlantic laks føret de ulike diettene i 100 dager. (gjennomsnittsverdier med s.e.m., n = 3, unntatt 50 % DHA-CA dietten hvor n = 2, hver prøve er representert med en pool av 5 fisk)

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA	ANOVA
14:0	1,6 ± 0,08	1,6 ± 0,03	1,7 ± 0,01	1,7 ± 0,02	0,84
16:0	8,5 ± 0,14	8,1 ± 0,38	6,6 ± 1,83	7,8 ± 0,37	0,37
18:0	2,3 ± 0,06	2,4 ± 0,22	2,6 ± 0,19	2,7 ± 0,25	0,65
20:0	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,03	0,5 ± 0,02	0,5 ± 0,05	0,21
Σ SFA <sup>1</sup>	<b>13,5 ± 0,27</b>	<b>13,1 ± 0,59</b>	<b>12,0 ± 1,96</b>	<b>13,2 ± 0,63</b>	<b>0,65</b>
16:1 n-7	1,3 ± 0,01	1,4 ± 0,08	1,5 ± 0,09	0,9 ± 0,45	0,49
18:1 n-9	39,8 ± 0,34 <sup>a</sup>	38,2 ± 0,84 <sup>a</sup>	37,6 ± 0,55 <sup>a</sup>	34,2 ± 0,40 <sup>b</sup>	0,001
18:1 n-7	3,0 ± 0,04	3,1 ± 0,07	3,0 ± 0,01	2,9 ± 0,06	0,28
20:1 n-11	1,2 ± 0,07 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,15 <sup>ab</sup>	1,9 ± 0,15 <sup>a</sup>	0,01
20:1 n-9	4,4 ± 0,07	4,3 ± 0,10	4,4 ± 0,10	4,1 ± 0,07	0,09
22:1 n-7	0,5 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,9 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,08 <sup>a</sup>	<0,0001
22:1 n-11	3,2 ± 0,10	2,8 ± 0,09	3,4 ± 0,07	3,2 ± 0,24	0,14
22:1 n-9	0,6 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,0002
Σ MUFA <sup>2</sup>	<b>54,7 ± 0,55<sup>a</sup></b>	<b>53,0 ± 1,03<sup>ab</sup></b>	<b>53,4 ± 0,65<sup>ab</sup></b>	<b>50,4 ± 0,42<sup>b</sup></b>	<b>0,02</b>
18:2 n-6	16,3 ± 0,06 <sup>a</sup>	15,1 ± 0,53 <sup>a</sup>	13,0 ± 0,27 <sup>b</sup>	9,1 ± 0,15 <sup>c</sup>	<0,0001
18:3 n-6	0,7 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,002
20:2 n-6	1,1 ± 0,07 <sup>ab</sup>	1,3 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,06 <sup>bc</sup>	0,6 ± 0,06 <sup>c</sup>	0,0007
20:3 n-6	1,0 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>bc</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,0001
20:4 n-6	0,5 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,01
Σ n-6 <sup>3</sup>	<b>18,9 ± 0,04<sup>a</sup></b>	<b>17,4 ± 0,43<sup>b</sup></b>	<b>14,9 ± 0,25<sup>c</sup></b>	<b>10,5 ± 0,15<sup>d</sup></b>	<b>&lt;0,0001</b>
18:3 n-3	3,4 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,3 ± 0,35 <sup>b</sup>	6,8 ± 0,29 <sup>b</sup>	11,0 ± 0,62 <sup>a</sup>	<0,0001
20:4 n-3	0,2 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,3 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,01
20:3 n-3	0,2 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,6 ± 0,03 <sup>bc</sup>	0,7 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,0004
20:5 n-3	1,8 ± 0,08	1,9 ± 0,18	1,8 ± 0,04	2,3 ± 0,04	0,06
22:5 n-3	0,4 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,6 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,009
22:6 n-3	4,5 ± 0,31 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,71 <sup>ab</sup>	6,1 ± 0,42 <sup>ab</sup>	8,1 ± 0,48 <sup>a</sup>	0,009
Σ n-3	<b>10,5 ± 0,43<sup>c</sup></b>	<b>14,4 ± 0,59<sup>b</sup></b>	<b>16,1 ± 0,25<sup>b</sup></b>	<b>23,5 ± 0,42<sup>a</sup></b>	<b>&lt;0,0001</b>

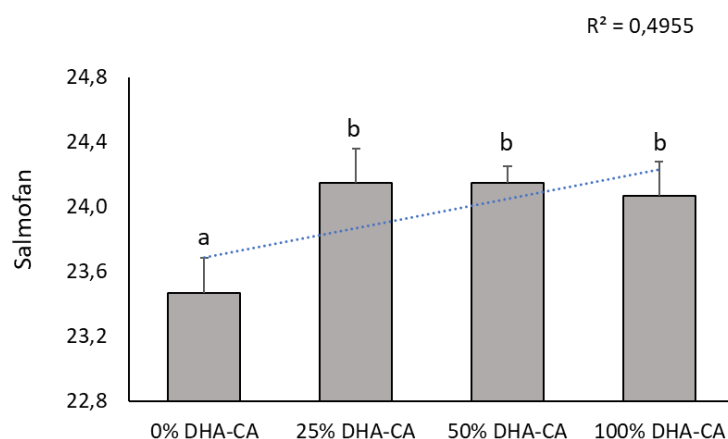
<sup>1</sup>Inkluderer 15:0, 17:0, 22:0, og 24:0. <sup>2</sup>Inkluderer 14:1 n-5, 16:1 n-5, 16:1 n-9, 17:1 n-7, 20:1 n-7, og 24:1 n-9.

<sup>3</sup>Inkluderer 16:2 n-6 og 22:4 n-6.

## 5.2.6 Muskelkvalitet

Fargen på fileten, målt med fargevifte, var signifikant rødere i gruppene føret med de tre DHA-CA diettene enn i kontrollgruppen, noe som er i overensstemmelse med tidligere resultater som har vist at økende nivå av DHA i dietten bedrer muskelfarge (Ruyter, et al., 2016) og også i overensstemmelse med observasjon i laks føret med mikroalge rik på DHA i WP 4 i dette prosjektet (pkt 5.3.3.)

Tabell 31 viser ingen signifikante effekter på astaxanthin nivå i muskel, men det var signifikant lavere nivå av astaxanthins reductive metabolitt idoxanthin med økende nivå av DHA-CA. Redusert omdanning av astaxanthin til idoxanthin ved økende nivåer av DHA i dietten er i samsvar med funn fra (Forskningsråds-prosjektet 224913).

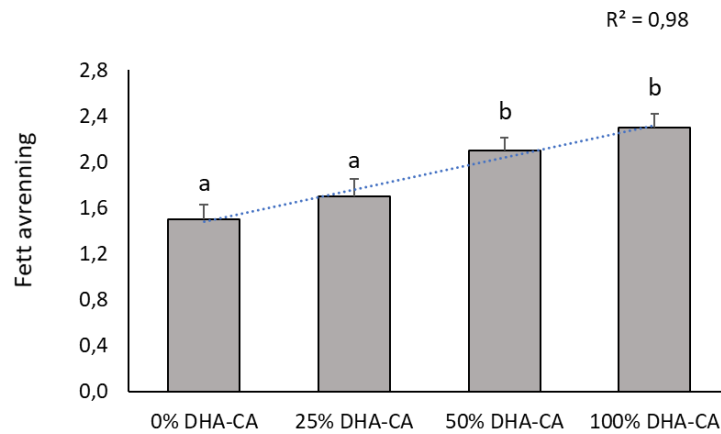


Figur 10 Farge av muskelfilet (målt med Salmofan) fra de ulike diettgruppene. (snitt±s.e.m.)

Tabell 31 Astaxanthin og idoxanthin i fileten fra prøvefisk, individuelle observasjoner, (snitt±s.e.m.)

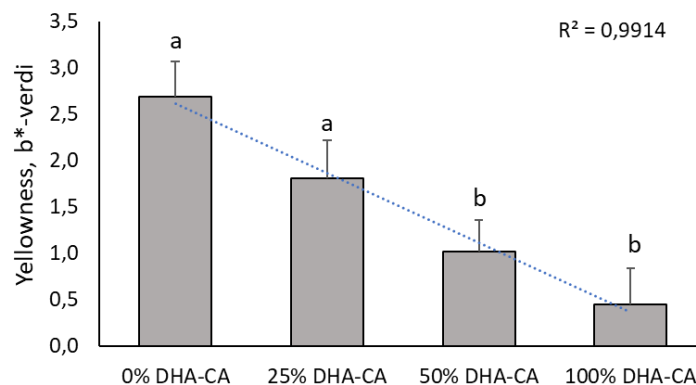
	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	50 % DHA-CA	100 % DHA-CA	ANOVA p-verdi
Astaxanthin	3,2 ± 0,12	3,1 ± 0,13	3,1 ± 0,12	3,1 ± 0,12	0,79
Idoxanthin	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,03

Det var lite fettavrenning fra muskel i alle grupper, men Figur 11. viser en moderat økning i fettavrenning fra fileten etter frysing og tining i gruppene 50 % og 100 % DHA-CA sammenlignet med 0 % (kontroll) og 25 % DHA-CA. Årsaken til dette er ikke kjent, en mulig årsak kan være endret smeltepunkt av fettene i fileten. Det er en liten reduksjon i mettede fettsyrer og en markant økning i nivå av n-3 PUFA. Det er kjent at økt nivå av flerumettede fettsyrer i en olje, senker smeltepunktet, hvorvidt dette gjelder muskel og dermed risiko for fettavrenning er ikke kjent.



Figur 11 Forskjell i fettslipp «score» i muskel mellom de ulike diettgruppene (etter frysing og tining) (snitt±s.e.m)

Figur 12 viser at fargen på skinnen til laksen virket mindre gulaktig og mer blå med økende nivåer av DHA-CA i dietten, noe som gav en mer sølvaktig farge. Dette er sett på som et positivt attributt av forbrukere.



Figur 12 Grad av gulfarge av skinn (Yellowness, målt med Minolta chromometer) (snitt±s.e.m.)

### 5.2.7 Immunstimulering med LPS og Poly-IC

Laks føret med kontrolldiett og dietter med 25 %, 50 % og 100 % av DHA-CA, ble injisert i buken med en blanding av immunstimulantene lipopolysaccharide (LPS) og poly-IC (Polyinosinic:polycytidylic acid) for å etterligne henholdsvis en bakterie- og en virusinfeksjon. En gruppe fisk ble kun injisert med PBS (saltvann) og anvendt som kontrollgruppe. LPS er store molekyler som består av et lipid og et polysakkarid molekyl som finnes i ytre membranen til gramnegative bakterier. Poly I: C er strukturelt lik dobbelttrådet RNA som er tilstede i noen virus og kjent for å interagere med toll-like reseptor 3 (TLR3) som uttrykkes i bl.a. membranen til immunceller.

Det ble utført microarray-analyse av makrofager isolert fra hodenyre i både immunstimulert og PBS injisert fisk i de ulike diettgruppene. Som forventet viste transkriptomanalysen en aktivering av immunsystemet i all LPS + poly-IC injisert fisk uavhengig av diettbehandling. Analyse av funksjonelle grupper av gener viste regulering av gener involvert i forskjellige aspekter av immunsystemet som vist i tabell 32.

Tabell 32 Antall differensielt uttrykte gener (DEG) i hodenyren fra laks injisert med LPS og poly-IC i forhold til saltvannsinjisert fisk

	DEG
<b>Immune Acute phase</b>	8
<b>Immune Antigen presentation</b>	8
<b>Immune B cell</b>	2
<b>Immune Chemokine</b>	15
<b>Immune Chemokine receptor</b>	4
<b>Immune Complement</b>	11
<b>Immune Cytokine</b>	2
<b>Immune Cytokine receptor</b>	8
<b>Immune Eicosanoid</b>	7
<b>Immune IFN-virus respons</b>	190
<b>Immune Ig</b>	5
<b>Immune Lectin</b>	15
<b>Immune Lymphocyte</b>	11
<b>Immune Platelet</b>	4
<b>Immune T cell</b>	9
<b>Immune TNF</b>	17

Tabell 33 viser at bare noen meget få gener var forskjellig uttrykt mellom de ulike diettgruppene etter immunstimulering. Spesielt interessant er CD8, et transmembran glykoprotein, som fungerer som en co-reseptor for T-celle-reseptor (TCR). Nedregulering av CD8 har blitt rapportert å forekomme ved akutte immunresponser mot patogener i pattedyr (Busch, et al., 1998; Xiao, et al., 2007). Nedregulering av genmarkører for leukocytter og lymfocytter hos fisk som fikk økt nivå av DHA-CA olje, indikerer rekruttering av celler fra hodenyren til sirkulasjonen. Disse resultatene kan tyde på at økende nivåer av DHA-CA i dietten stimulerer mobiliteten til cytotoxiske T-celler og kan tolkes som en forbedret immunrespons mot det injiserte LPS og poly-IC. Selv om det ikke er kjent for laks, har flere studier fra pattedyr vist at flerumettede fettsyrer har immunmodulerende effekter relatert til ved T-celle initierte responser (Nicolaou, et al., 2014).

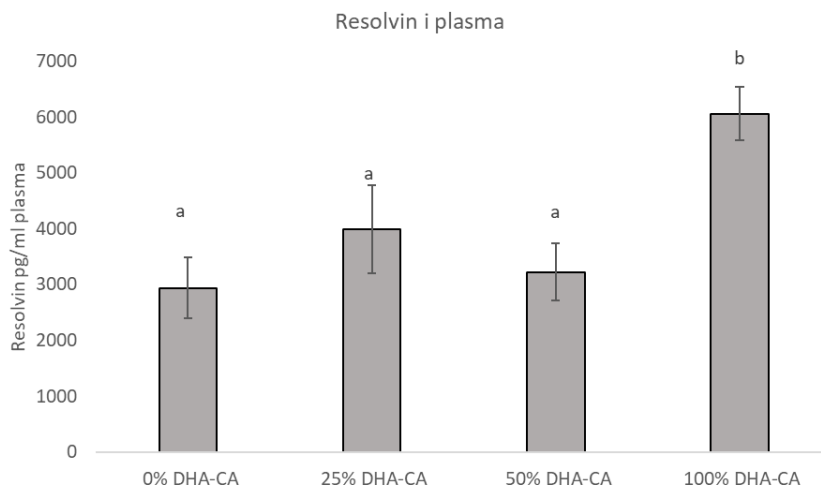
Tabell 33 Mikroarrayanalyse som viser signifikante endringer i genuttrykk relatert til dietteffekter i makrofager

	0 % DHA-CA	25 % DHA-CA	DHA-CA	DHA-CA
<b>Cell cycle</b>				
Retinoblastoma-like protein 2	-0,10	-0,20	-0,21	-0,86
Protein Tob1	-0,45	-0,31	-0,50	-0,88
<b>Cell cytoskeleton</b>				
Beta-taxilin	0,82	-0,42	0,19	-0,57
<b>Immune Chemokine receptor</b>				
Chemokine (C-C motif) receptor 9a	-0,11	-0,60	-0,43	-1,02
<b>Immune Lymphocyte</b>				
SH2 domain-containing protein 1A	-0,34	-0,43	-0,58	-1,54
<b>Immune T cell</b>				
Ig lambda chain	-0,16	-0,14	-0,15	-0,81
CD8 beta	-0,16	-0,44	-0,53	-1,09
CD8 alpha	-0,08	-0,29	-0,41	-0,92
CD8 alpha, transcript variant X1	-0,14	-0,38	-0,39	-0,94
<b>Metabolism Amino acid</b>				
Solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	-0,01	0,63	0,61	1,02
Methionine adenosyltransferase II, alpha b	0,27	0,59	0,66	0,89
Transglutaminase 1 like 1	1,23	0,55	0,90	0,48
<b>Metabolism Energy</b>				
chromosome ssa17 open reading frame, human C12orf56 (cssa17h12orf56), transcript variant X1	-0,45	-0,27	-0,47	-1,18
<b>Metabolism Protease</b>				
metalloproteinase inhibitor 2-like	0,89	0,48	0,72	0,49

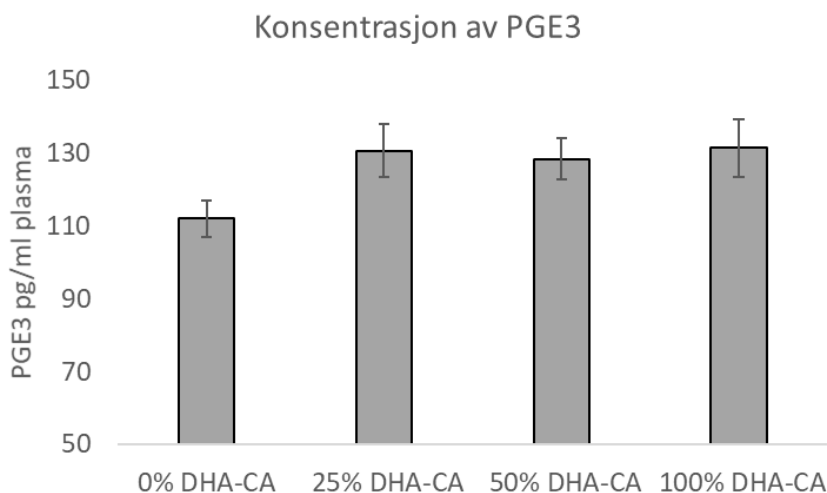
### 5.2.8 Prostaglandiner og resolviner i plasma

Resolviner (Rvs), er bioaktive forbindelser som er vist å være involvert i kontroll av størrelse og omfang av inflammatoriske responser i pattedyr (Chiurchiù, et al., 2016). Lite er kjent for fisk, men i denne studien fant vi at konsentrasjonen av resolvin i plasma var signifikant høyere i 100 % DHA-CA gruppen enn i diettgrupperen føret med lavere nivåer av DHA-CA olje. Resolviner er metaboliske derivater av EPA og DHA og det er rimelig å anta at det økte DHA-nivået i dietten er årsaken til den observerte økningen i «helsefremmende» resolviner i plasma. Chiurchiù, et al. (2016) rapporterte at resolviner modulerer adaptive immunresponser i humane lymfocytter ved å redusere cytokinproduksjonen i aktiverte CD8 (+) T-celler, og det er interessant at nettopp CD8, som fungerer som en co-reseptor for T-celle-reseptor (TCR) var nedregulert i gruppene med DHA-CA etter immunstimulering (Tabell 33),

Figur 14 viser at det ikke var signifikante forskjeller i nivå av Prostaglandin E3 (PGE<sub>3</sub>) i plasma. PGE<sub>3</sub> dannes via cyklooksygenase (COX) metabolisme av EPA.



Figur 13 Konsentrasjon av resolviner i plasma (pg resolvin/ml plasma) (snitt±s.e.m.), forskjellige superscripts viser signifikante forskjeller mellom grupper ( $p \leq 0,05$ )



Figur 14 Konsentrasjon av PGE<sub>3</sub> i plasma (pg PGE<sub>3</sub>/ml plasma) (snitt±s.e.m.), Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene

### 5.2.9 Generell diskusjon og konklusjon av dose respons forsøket med DHA-CA i sjøvann

Målet med dette forsøket med laks fra 500 g til 1,2 kg i kar med sjøvann, var å studere hvordan omega-3 modifisert rapsolje i fôret påvirket vekst, sammensetning, muskelkvalitet og helse. Forsøket viste tilnærmet lik vekst og fôrintak og god overlevelse av fisk i alle diettgrupper. Økende innblanding av omega-3 modifisert rapsolje i dietten førte til økte nivåer av 18:3n-3, EPA, DHA og økt ratio av n3 / n6 fettsyrer i både muskel, lever og tarm og bedret skinn- og filetfarge. Økte nivåer av de flerumettede fettsyrene (ALA, EPA, DHA) førte til økt konsentrasjon av de helsefremmende resolviner i plasma og transcriptomdata indikerte forbedret immunrespons i utfordret fisk.

DHA-CA oljen gav god vekst uten å kompromittere fiskehelse og immunrespons. Dette er også i samsvar med resultater hvor Atlantisk laks er fôret med olje fra genmodifisert camelina (Betancor, et al., 2018).



### **5.3 WP 4: Langtidseffekter av å erstatte fiskeolje med DHA rik *Schizochytrium sp.* i fôr til Atlantisk laks.**

I et samarbeid med prosjektet «A til omega-3, Forskningsråds-prosjekt nr 234057» har vi studert langtidseffekter av å erstatte fiskeolje, som kilde til omega-3 fettsyrene EPA og DHA, med *Schizochytrium sp.* biomasse, som kilde til DHA i dietten (6 % i fôret) til Atlantisk laks fra startfôring i ferskvann og frem til ca 3 Kg i sjø. Forsøksperioden varte i 2 år, men kun den siste perioden på 13 måneder i sjø rapporteres her grunnet kun marginale effekter av tidligere livsfaser. Hensikten med sjøforsøket var å studere effekter av utbytting av fiskeolje med mikroalge på fiskevelferd og helse, vekst, fôrutnyttelse og sensorisk og teknisk filetkvalitet.

De eksperimentelle diettene ble formulert til å inneholde relativt lave nivåer av fiskemel (10 %) og lik mengde fordøyelig protein, lipid og energi og like nivåer av EPA + DHA (ca 1,3 % i fôret), mettede fettsyrer og likt forhold mellom n-3/n-6-fettsyrer (Tabell 7. i metodeavsnitt). Fettsyresammensetningen av fôrene reflekterte sammensetningen av de ulike fôringrediensene (Tabell 9. i metodeavsnitt). De mest sentrale forskjellene var høyere prosentandel av 18:3n-3 og DHA og lavere EPA i mikroalge dietten (HM) enn i FO dietten.

#### **5.3.1 Vekst og fôrutnyttelse**

Laks i HM gruppen viste signifikant høyere vekstrate (SGR) i sjø enn laks i FO gruppen. Dette resulterte i en sluttvekt på 3,3 Kg i HM gruppen sammenlignet med sluttvekt på 2,8 Kg i FO gruppen (Tabell 34). Det var ingen signifikante forskjeller i overlevelse mellom gruppene, med ca 11 % dødelighet i begge grupper. Det var ingen signifikante forskjeller i kondisjonsfaktor, slakteutbytte, scoret mengde innvolls fett og hepatosomatisk index mellom diettgruppene. Visuell scoring av leverfarge, viste signifikant blekere leverfarge i HM gruppen enn i FO gruppen, noe som kan indikere høyere fettnivå i lever i denne gruppen.

Tabell 34 Vekter, vekstrater, kondisjonsfaktor og slakteparametere ved avslutning av forsøket. (snitt  $\pm$  s.e.m., n=3)

			Nestet ANOVA (for å utnytte individdata)
	FO	HM	p-verdi
Startvekt i sjø	868 $\pm$ 9	863 $\pm$ 10	0,75
Sluttvekt	2803 $\pm$ 62	3298 $\pm$ 55	0,05
SGR	0,28 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,004	0,03
% døde	11,4 $\pm$ 1,60	11,8 $\pm$ 2,17	
K-faktor start	1,20 $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,01	0,17
K-faktor slutt	1,44 $\pm$ 0,01	1,42 $\pm$ 0,01	0,18
Slakteutbytte, %	85,8 $\pm$ 0,6	87,2 $\pm$ 0,3	0,14
Innvollsfett, score	2,7 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	0,91
Levercore	2,9 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	0,01
HSI	1,1 $\pm$ 0,03	1,2 $\pm$ 0,02	0,53

### 5.3.2 Fordøyelighet av fett, protein og energi:

Laks i begge diettgrupper, FO og HM, viste lik proteinfordøyelighet (Tabell 35.). Laks i HM gruppen viste bedre fordøyelighet av totalt lipid (87,1 %) enn laks i FO gruppen (84,5 %). Lavere fettfordøyelighet med en FO diett sammenlignet med en HM diett er motsatt av forventet i forhold til hva som er vist i tidligere studier (Kousoulaki, et al., 2016; Kousoulaki, et al., 2015), hvor det er funnet at økende tilsetning av *Schizochytrium sp.* biomasse til fôr til laks reduserer fettfordøyelighet sammenlignet med en FO-kontrolldiett. I vår studie kommer derimot FO dietten noe lavere ut i fettfordøyelighet enn forventet, noe som kan skyldes at FO dietten var tilsatt palmeolje for å balansere nivået av mettede fettsyrer mellom de to eksperimentelle diettene. Sjøvannstemperaturen var relativt lav ved avslutning av forsøket (6,3°C), og det er kjent fra tidligere studier at økte nivåer av palmeolje i fôret til laks reduserer fettfordøyelighet ved lave vanntemperaturer (Ng, et al., 2007). På den annen side ble begge diettgrupper tilsatt linfrøolje, som er rik på den flerumettede fettsyren 18:3n-3, og det er kjent at andelen flerumettede fettsyrer i fôret vil ha en positiv effekt på fettsyrefordøyelighet (Torstensen, et al., 2000), noe som dermed kan ha bidratt positivt til fordøyelighet av totalfett ved den lave vanntemperaturen i vårt forsøk.

Tabell 36. viser en generell lavere fordøyelighet av mettede fettsyrer, spesielt for 16:0 i HM fôret fisk sammenlignet med FO fôret fisk i overensstemmelse med funn fra tidligere studier og hvor det er forklart med at *Schizochytrium sp.* biomasse er rik på triacylpalmitat (16:0 bundet til alle tre posisjoner i triacylglyserol) som er tungt fordøyelig. (Kousoulaki, et al., 2016; Kousoulaki, et al., 2015). Det var derimot bedre fordøyelighet av både monoumettede og flerumettede fettsyrer i HM gruppen sammenlignet med FO gruppen, noe som kan være en av flere mulige årsaker til bedre vekst i HM gruppen sammenlignet med FO gruppen i sjøfasen.

Tabell 35 Fett, protein og energifordøyelighet (ADC) (snitt±s.e.m., n=3)

	FO	HM	One-way ANOVA (P)
ADC <sub>protein</sub> (%)	87,3±0,87	87,2±0,76	0,869
ADC <sub>lipid</sub> (%)	84,5 <sup>a</sup> ±1,11	87,1 <sup>b</sup> ±0,50	0,019
ADC <sub>energi</sub> (%)	75,7 <sup>A</sup> ±1,59	78,2 <sup>B</sup> ±0,44	0,055

Tabell 36 Fettsyrefordøyelighet (snitt±s.e.m., n=3)

Fettsyrefordøyelighet	FO	HM	SEM	Enveis ANOVA (P)
14:0	84,5	58,3	5,87	0,000
16:0	79,2	59,7	4,40	0,000
18:0	83,7	78,8	1,15	0,004
20:0	84,5	77,2	1,70	0,003
22:0	84,5	78,7	1,52	0,029
16:1 n-7	88,7	94,3	1,42	0,023
18:1 (n-9)+(n-7)+(n-5)	84,3	92,5	1,90	0,002
20:1 (n-9)+(n-7)	81,0	89,3	1,90	0,002
22:1 (n-11)+(n-9)+(n-7)	75,0	82,8	2,01	0,023
24:1 n-9	53,5	74,3	4,74	0,000
18:2 n-6	89,9	95,4	1,25	0,001
20:2 n-6	84,5		0,64	
18:3 n-3	92,2	96,7	1,05	0,001
18:4 n-3	94,8	100,0	1,16	0,000
20:5 n-3 (EPA)	92,7	87,1	1,25	0,000
22:6 n-3 (DHA)	84,9	94,0	2,44	0,039
sum SFA	80,5	62,7	3,99	0,000
sum MUFA	84,1	92,3	1,89	0,002
sum PUFA (n-6)	89,8	95,3	1,25	0,001
sum PUFA (n-3)	91,7	95,8	0,95	0,002
sum total PUFA	91,0	95,6	1,06	0,001
sum fettsyrer totalt	86,2	88,5	0,60	0,024

### 5.3.3 Fettsyresammensetning av filet og lever

Tabell 37 viser fettinnhold og fettsyresammensetning i filet. Det var ingen signifikant forskjell i totalt fettinnhold i filet, med en fettprosent på ca 18 prosent i begge diettgrupper. Fettsyresammensetningen av filet gjenspeilet i stor grad fettsyresammensetningen av diettene. HM gruppen hadde høyere prosentandel av fettsyrene 18:3n-3, 18:2n-6 og DHA og lavere prosentandel av EPA, mettede og monomettede fettsyrer sammenlignet med FO gruppen. Mikroalge biomassen er rik på DHA og mangler EPA, mens fiskeoljen er rik på både EPA og DHA, noe som resulterte i en DHA:EPA ratio i fillet på 1,4 i FO gruppen sammenlignet med 6,2 i HM gruppen.

Tabell 38 viser fettsyresammensetning i lever. Det var signifikant høyere fettinnhold i lever i HM gruppen sammenlignet med FO gruppen, dette er i overensstemmelse med en lavere score for leverfarge i

samme gruppe (Tabell 38). Det var signifikant høyere prosentandel av monoumettede fettsyrer i HM gruppen, noe som i det vesentlige skyldtes en økning i 18:1n-9 fra 22 til 28 % av totale fettsyrer selv om nivået av denne fettsyren var tilnærmet lik i begge diettene. HM gruppen hadde høyere prosentandel av 18:3n-3, 18:2n-6 og DHA og lavere prosentandel av EPA, 16:0 og 14:0 i lever sammenlignet med FO gruppen.

Tabell 37 Fettnivå og fettsyresammensetning (% av total fettsyrer) i filet til Atlantisk laks fôret henholdsvis HM og FO dietter i sjø (snitt ± s.e.m., n=3)

	FO	HM	p-verdi
Fett %	18,14 ± 0,28	17,42 ± 0,86	0,62
14:0	1,14 ± 0,02	0,65 ± 0,02	<0,001
16:0	10,71 ± 0,04	9,90 ± 0,08	0,002
18:0	2,83 ± 0,02	2,63 ± 0,05	0,07
22:0	0,18 ± 0,004	0,22 ± 0,01	0,002
SFAsum	14,87 ± 0,06	13,41 ± 0,14	0,002
16:1n7	1,20 ± 0,02	0,48 ± 0,02	<0,001
18:1n9	36,67 ± 0,06	36,66 ± 0,08	0,94
18:1n7	2,19 ± 0,02	2,09 ± 0,01	0,006
20:1n9	1,83 ± 0,02	1,91 ± 0,02	0,02
22:1n7	0,91 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,14
22:1n11	0,66 ± 0,01	0,48 ± 0,02	<0,001
MUFA	43,46 ± 0,08	42,48 ± 0,07	0,001
18:2n6	15,43 ± 0,04	15,88 ± 0,06	0,001
18:3n6	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,004	0,16
20:2n6	1,04 ± 0,02	1,22 ± 0,02	0,0008
20:3n6	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,04
20:4n6	0,17 ± 0,002	0,10 ± 0,002	<0,001
SUM n-6	17,03 ± 0,04	17,55 ± 0,05	0,0004
18:3n3	15,80 ± 0,05	17,39 ± 0,10	<0,001
20:4n3	0,06 ± 0,003	0,05 ± 0,002	0,02
20:3n3	1,18 ± 0,02	1,52 ± 0,02	0,0004
20:5n3	1,64 ± 0,02	0,59 ± 0,03	<0,001
22:5n3	0,67 ± 0,01	0,27 ± 0,01	<0,001
22:6n3	2,31 ± 0,05	3,68 ± 0,03	<0,001
SUM n-3	21,65 ± 0,06	23,50 ± 0,09	<0,001
EPA+DHA	3,95 ± 0,04	4,27 ± 0,03	0,0015

Tabell 38 Fettnivå og fettsyresammensetning (% av total fettsyrer) i lever til Atlantisk laks føret henholdsvis HM og FO dietter i sjø (snitt ± s.e.m., n=3)

	FO	HM	p-verdi
<b>Fett %</b>	4,21 ± 0,11	5,58 ± 0,53	0,04
<b>14:0</b>	0,78 ± 0,10	0,38 ± 0,03	0,04
<b>16:0</b>	13,42 ± 0,29	10,91 ± 0,62	0,02
<b>18:0</b>	4,53 ± 0,10	2,90 ± 0,34	0,01
<b>22:0</b>	0,23 ± 0,09	0,16 ± 0,03	0,15
<b>SFAsum</b>	18,97 ± 0,35	14,36 ± 0,82	0,01
<b>16:1n7</b>	0,77 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,002
<b>16:1n5</b>	0,39 ± 0,13	0,35 ± 0,09	0,81
<b>18:1n11</b>	0,21 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,002
<b>18:1n9</b>	22,16 ± 0,38	27,61 ± 1,30	0,003
<b>18:1n7</b>	1,76 ± 0,02	1,83 ± 0,05	0,08
<b>20:1n9</b>	1,45 ± 0,08	2,04 ± 0,16	0,05
<b>22:1n7</b>	1,89 ± 0,08	1,75 ± 0,08	0,41
<b>22:1n11</b>	0,10 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,7
<b>MUFA</b>	28,73 ± 0,42	34,26 ± 1,42	0,007
<b>18:2n6</b>	10,07 ± 0,17	12,07 ± 0,36	0,002
<b>18:3n6</b>	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,31
<b>20:2n6</b>	1,24 ± 0,05	1,49 ± 0,08	0,04
<b>20:3n6</b>	0,86 ± 0,03	0,60 ± 0,04	0,004
<b>20:4n6</b>	1,46 ± 0,03	0,69 ± 0,04	0,0001
<b>SUM n-6</b>	13,72 ± 0,20	14,91 ± 0,34	0,03
<b>18:3n3</b>	8,17 ± 0,16	10,63 ± 0,35	0,002
<b>20:4n3</b>	0,24 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,38
<b>20:3n3</b>	1,08 ± 0,03	1,48 ± 0,21	0,07
<b>20:5n3</b>	7,88 ± 0,10	2,16 ± 0,33	0,0002
<b>22:5n3</b>	2,24 ± 0,05	0,54 ± 0,04	<0,001
<b>22:6n3</b>	11,98 ± 0,23	14,13 ± 0,98	0,05
<b>SUM n-3</b>	31,58 ± 0,28	29,13 ± 0,98	0,11
<b>EPA + DHA</b>	19,86 ± 0,26	16,30 ± 1,27	0,04

### 5.3.4 Muskelkvalitet

Forsøksfisken var føret med henholdsvis FO og HM dietter helt fra startfôring og fram til slutt av karforsøk på land når den var ca 800 g, og videre i merder i sjø fram til den var ca 3,5 Kg. Det ble også utført sensoriske- og kvalitetsanalyser av fileten når laksen var ca 800 gram, men disse dataene er ikke vist i denne rapporten. Analysene fra 800 grams fisk viste ingen forskjeller i lukt og smak mellom diettgruppene, men fiskemuskelen til HM gruppen var noe rødere enn i FO gruppen.

Tabell 39 viser ingen forskjeller i tekstur mellom diettgruppene (målt instrumentelt med teksturometer), men fileten til fisk i HM gruppen var signifikant rødere i fremre del enn filet til fisk i FO gruppen. Det var lav forekomst av melaninflekker i forsøket, totalt 6 fisk, en fisk i HM gruppen og 5 fisk i FO gruppen.

Tabell 40. viser muskelkvalitet og sensoriske egenskaper i rå og varmebehandlet muskel til laks på slaktestørrelse etter vurdering av sensorisk panel. Til kvalitetsanalyser ble det fra begge grupper plukket ut fisk av ca samme størrelse og lik kjønnsfordeling, slik at størrelsesforskjeller og kjønn ikke skulle påvirke resultatene. Det var ingen signifikante dietteffekter på lukt i rå filet (a) og smak og lukt i kokt laksefilet (b). Muskelen var signifikant rødere i HM gruppen enn i FO gruppen i samsvar med resultater presentert i tabell 39. Kjemisk analyse av pigment med HPLC viste at HM gruppen hadde høyere konsentrasjon av astaxanthin i filet enn FO gruppen (Figur 23,  $p < 0.002$ ). Det var ingen effekt av prediett ( $p=0.86$ ). Det var ingen forskjell mellom diett-gruppene i innhold av astaxanthin metabolitten idoxanthin, og det var heller ingen sammenheng mellom fiskevekt og innhold av astaxanthin i filet ( $R^2 = 0.028$ ). Så selv om det var en liten forskjell i vekt mellom prøvefisk fra HM og FO diettene ( $4244 \pm 466$  og  $4054 \pm 580$ ), forklarer ikke det den høyere astaxanthin-konsentrasjonen i HM diettgruppen. Vi har i tidligere prosjekt sett en positiv effekt av DHA på astaxanthin konsentrasjon i filet (Forskningsråd-prosjekt nr 224913). Teksturen av kokt laks i HM gruppen var noe fastere og mindre saftig enn muskel til laks i FO gruppen (40 b).

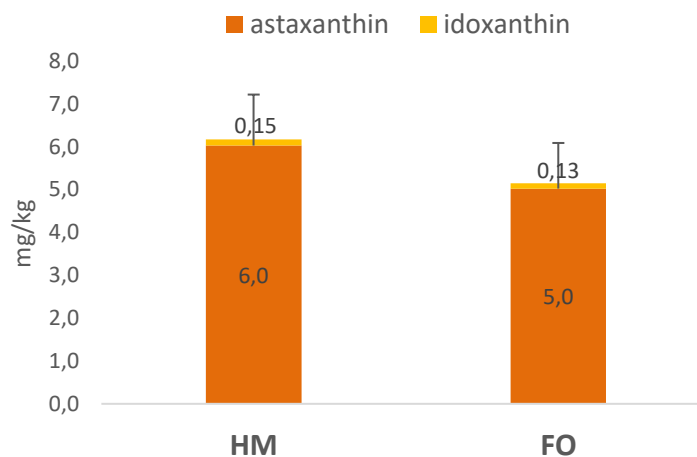
Tabell 39 Tekstur, forekomst av muskelspalting og mørke melaninflekker, og farge) (snitt  $\pm$  s.e.m.,  $n=3$ )

	Diett		P-verdi
	FO	HM	
Fasthet anterior (N*s)	217,30	214,40	ns
Fasthet posterior (N*s)	219,30	210,40	ns
Filèt "gaping score" (forekomst muskelspalting)	0,20	0,40	ns
Filèt farge anterior (SFAN score)	25,20	25,70	0,081
Filèt farge posterior (SFAN score)	26,70	27,20	0,056
Melanin flekker (myotomer)	0,53	0,02	0,048

Tabell 40 a og b: Sammenligning av gjennomsnittsverdier (Tukey's test) i evaluering av rå fiskefilet for lukt, og farge (a) og varmebehandlet (kokte fileter) for smak og tekstur (b)

a) Diett	Frisk	Sjø	Agurk	Alge	For	Fisk	Harsk	Fargetone	Fargestyrke	Hvithet
HM	2,89	2,11	1,95	2,37	2,41	3,31	1,32	5,50 a	5,77 a	4,24 b
FO	2,80	2,09	1,87	2,33	2,32	3,40	1,41	5,20 b	5,55 b	4,45 a
P	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0,001	0,004	0,008

b) Diett	Smak							Tekstur		
	Frisk	Bitter	Sjø	Agurk	For	Fisk	Harsk	Fasthet	Saftighet	Sammenhengbarhet
HM	3,02	4,31	1,96	1,39	3,48	4,05	1,67	4,35 <sup>a</sup>	5,19 <sup>b</sup>	4,77
FO	2,84	4,23	1,87	1,37	3,43	3,94	1,57	4,07 <sup>b</sup>	5,47 <sup>a</sup>	4,75
P	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,018	0,039	ns



Figur 15 Konsentrasjon av astaxanthin og metabolitten idoxanthin i filet fra laks i HM og FO

### 5.3.5 Microarray analyse av lever og midttarm

Microarray (transkriptom) analyser ble utført på vevsprøver av lever og midttarm fra FO og HM diettgruppene. Transkriptomanalyser er et nyttig verktøy for å søke bredt etter potensielle helseeffekter. Det var kun få gener som var forskjellig uttrykt i lever mellom de to diettgruppene, men noen observerte forskjeller i genuttrykk er verdt å nevne. Det ble bl.a. funnet signifikant oppregulering av genene hsp (heat shock protein), gpx (gluthathione peroxidase) og gadd45 (Growth arrest and DNA-damage-inducible protein) i HM gruppen i forhold til FO gruppen. Disse genekspressionsdataene indikerer forekomst av mild grad av stress. Ser man disse dataene i sammenheng med økt forekomst av blek lever, høyere totalt fettnivå, økt prosentandel 18:1n-9, og lavt EPA nivå (EPA er kjent for å ha antiinflammatoriske effekter) i HM gruppen, så kan dataene samlet støtte opp under genuttryksdataene som indikerer forekomst av mild grad av stress i lever i HM gruppen. Selv om det ikke er mulig å konkludere med sikkerhet, så kan det diskuteres hvorvidt en mulig årsak til forekomst av mild grad av stress i HM gruppen kan være spesifikk EPA mangel. Mikroalgedietten er karakterisert med høy DHA/EPA ratio. Da dette forsøket ble initiert anså man at 1-1,3 % EPA + DHA var tilstrekkelig for å dekke laksens behov (Ruyter, et al., 2000a; b). En senere studie av Bou, et al. (2017a) har derimot vist at 1 % EPA og DHA i fôret i langtidsforsøk gir økt dødelighet under utfordrende miljøbetingelser, økt forekomst av hypervakuolisering av tarm og fettlever, noe som tyder på at behovet for disse fettsyrene ligger høyere enn tidligere antatt. Forsøksfisken vår ble fôret med ca 1 % EPA + DHA i de tidligere livsfaser, og 1,3 % EPA+DHA i sjøvannsfasen. Forekomst av mild grad av stress kan muligens derfor være forårsaket av EPA mangel i HM gruppen sammenlignet med FO gruppen som hadde mer lik DHA/EPA ratio i dietten. Bedre tilvekst i HM gruppen relatert til FO gruppen kan også ha bidratt til tegn på EPA mangel først oppstår i denne gruppen.

Flere immungener var nedregulert både i lever og midttarm i HM gruppen sammenlignet med FO gruppen uten at vi har noen klar forklaring på dette (5.3.6.). Også andre studier har vist at fôring med mikroalge i dietten til zebrafisk kan føre til endringer i leverens genuttrykk. Mikroalgetilskudd, med en alge rik på arachidonsyre (ARA,) førte til oppregulering av gener relatert til immunfunksjon og antioksidantforsvar, (Nayak, et al., 2018) i motsetning til nedregulering i vår studie. EPA og DHA er kjent for å ha anti-inflammatoriske effekter, mens ARA er kjent for å ha pro-inflammatoriske effekter, noe som kan være med på å forklare forskjeller i respons. Det var ellers få forskjeller i uttrykk av gener

i midttarm mellom diettgruppene, noe som også stemmer overens med at midttarmen fra begge diettgrupper ble vurdert til normal ved histologisk undersøkelse (Figur 19). I midttarm fra fisk i HM-gruppen er det verdt å nevne at flere gener involvert i xenobiotisk metabolisme, og en av flere sinktransportører var oppregulert. I et pågående prosjekt (FHF nr 901265) er det nylig vist at økende nivå av EPA og DHA i fôr fører til høyere nivå av Zn i tarmvev, noe som kan indikere bedret opptak av Zn i tarm. Oppregulering av Zn transporter ZIP4 i denne studien kan tyde på at DHA fra mikroalgedietten bidrar til denne effekten. Flere dyremodellstudier og studier av humane cellekulturer har vist en mulig sammenheng mellom omega-3-fettsyrer, sinktransportnivåer og fri sinktilgjengelighet på cellenivå (oversiktartikkel av Damitha De Mel et al., 2014)

Nedregulering av flere gener relatert til inflammatoriske responser i tarm, chemokine/cytokines i kan indikere mulig antiinflammatorisk effekt i midttarm av HM diettgruppe sammenlignet med FO diettgruppe. Flere studier fra pattedyr har referert til observasjoner av at beta-glukaner har antiinflammatoriske effekter i tarm (Raa, 2015). Celleveggen til mikroalger er rik på beta-glukaner.



Tabell 41 Resultater av mikroarrayanalyse som viser gener med ekspresjonsendringer i leveren av laks fôret HM-dietten i forhold til laks fôret FO-dietten (n = 12). Data er log-ER (genekspresjonsforhold mellom diettgruppene). Signifikant opp- og nedregulerte gener i HM gruppen relatert til FO gruppen (log-ER > 0,6; p < 0,05) er fremhevet med røde og grønne fargenyanser

	Log-ER
<b>Cell Folding, protein modification</b>	
Heat shock cognate 70 kDa protein	0,78
Heat shock cognate 71 kDa protein	0,77
Heat shock cognate 70 kDa protein	0,75
Heat shock cognate 70 kDa protein	0,62
<b>Cell Redox</b>	
Glutathione peroxidase	0,82
<b>Cell Stress</b>	
Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 gamma	0,81
<b>Metabolism Retinoid</b>	
Retinol-binding protein 2	1,54
<b>Metabolism Xenobiotic</b>	
UDP-glucuronosyltransferase 2A2 precursor	1,03
<b>Immune</b>	
Complement C1q tumor necrosis factor-related protein	-0,67
<b>Immune adhesion</b>	
Vascular cell adhesion protein 1	-0,62
<b>Immune Antigen presentation</b>	
HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha chain precursor	-0,65
HLA class II histocompatibility antigen, DP alpha chain precursor	-0,69
L77086_1 MHC class II alpha	-0,72
MHC class I antigen	-0,90
BOLA class I histocompatibility antigen, alpha chain BL3-7 precursor	-0,95
<b>Immune Chemokine</b>	
C-C motif chemokine 19-2	-0,72
<b>Immune Complement</b>	
Complement factor H1 protein	-0,62
C1Q and TNF related protein	-0,64
<b>Immune IFN-virus response</b>	
Proteasome subunit beta type-8 precursor	-0,82
<b>Immune Ig</b>	
Ig kappa chain V-IV region JI precursor	-1,17
<b>Immune Lectin</b>	
Toll-like leucine-rich repeat [Salmo salar] Toll-like receptor 5	0,88
Lectin precursor	-0,67
<b>Immune TNF</b>	
Metalloreductase STEAP4	0,67
TNF receptor member 11B	-0,63
C1Q and TNF related protein	-0,64

Tabell 42 Resultater av mikroarray analyse av midttarm som viser gener med ekspresjonsendringer i til laks fôret HM-dietten i forhold til laks fôret FO-dietten (n = 12). Data er log-ER (genekspresjonsforhold mellom diettgruppene). Signifikant opp- og nedregulerte gener i HM gruppen relatert til FO gruppen (log-ER > 0,6; p < 0,05) er fremhevet med røde og grønne fargenyanser

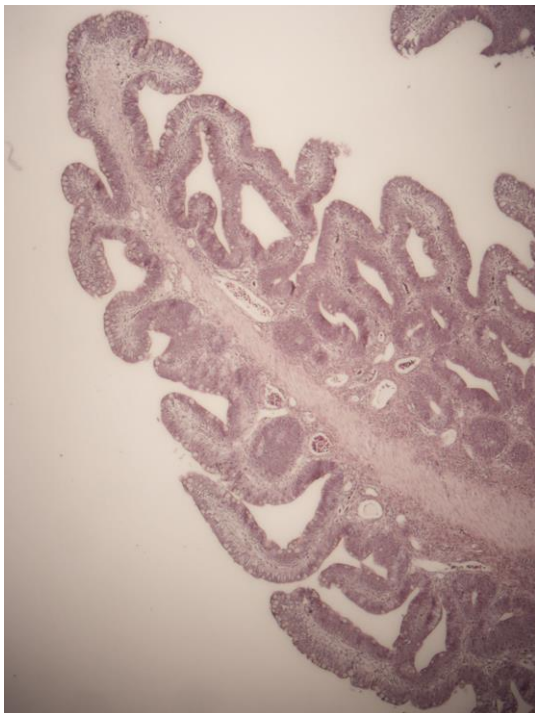
	Log-ER
<b>Metabolism Ion</b>	
Zinc transporter ZIP4	0,84
<b>Metabolism Lipid</b>	
Perilipin	-0,71
Endothelial lipase precursor	-1,22
<b>Metabolism Protease</b>	
Trypsin-2 precursor	1,02
Trypsin-1 precursor	0,62
<b>Metabolism Xenobiotic</b>	
Cytochrome P450 monooxygenase CYP2K1v2	1,02
Sulfotransferase 6B1	0,86
Cytochrome P450	0,65
<b>Immune Antigen presentation</b>	
MHC class I alpha 2; PCR product	-0,68
<b>Immune Chemokine</b>	
Chemokine CCL-C11b	0,71
<b>Immune Effector</b>	
Myeloperoxidase precursor	-0,99
<b>Immune Eicosanoid</b>	
Leukotriene b4 12-hydroxydehydrogenase/15-ketoreductase	-0,62
<b>Immune IFN-virus response</b>	
Suppressor of cytokine signaling 1	-0,62
Patched domain containing 3	-0,63
<b>Immune Ig</b>	
Ig kappa chain V region K29-213	-0,63
<b>Immune regulator</b>	
Suppressor of cytokine signaling 1	-0,62

### 5.3.6 Histologisk undersøkelse av tarm

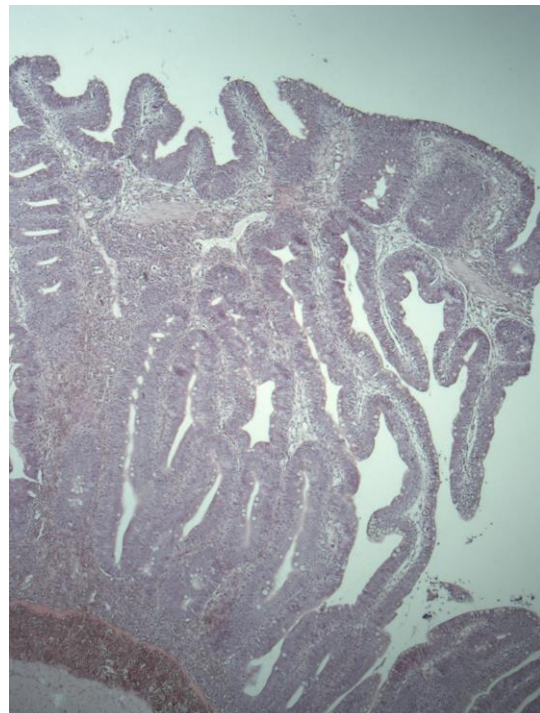
Det ble gjort en histologisk undersøkelse av tarm fra fisken i dette forsøket. Det ble undersøkt prøver fra 12 fisk fra hver diettgruppe (HM og FO), og fra hver fisk var det prøver av midttarm og baktarm. Det vil si til sammen 48 snitt, 24 fra baktarm og 24 fra midttarm. De H&E-fargede snittene ble mikroskopert i et standard lysmikroskop. Prøvene ble først gjennomgått blindt, dvs. uten kjennskap til fôrgruppe. Deretter ble de gjennomgått på nytt etter avkodning, med tanke på å finne systematiske forskjeller.

### Baktarmen (Figurer 24 til 26)

- Det var ingen registrerbare forskjeller i baktarm mellom fisk fra HM- og FO-diett, men samtlige 24 fisk som ble undersøkt ble bedømt som unormal. Det var ikke en type avvik som er kjent fra før og det er ukjent hva som har forårsaket denne tilstanden til baktarm i begge diettgrupper. Det er ikke kjent hvordan eventuelt suboptimalt nivå av EPA og DHA i dietten påvirker baktarm, dette er verdt å undersøke i fremtidige studier.
- Tarmfoldene var unormalt store og lange, med unormalt mange forgreininger. Forgreinene var stedvis sammenvokst til et nettverk. Noen steder var foldene vokst sammen ytterst, slik at de dannet et skjold ut mot lumen av tarmen.
- Midterst i foldene skal det være et tynt bindevevsdrag med blodkar i. I disse tarmene var det områder med sterkt fortykkede bindevevsdrag, både i de enkle foldene, som normalt skal være uforgreinet, og i de komplekse foldene, som normalt skal ha sidegreiner.
- Tarmepitelcellene i baktarmen var uten vakuoler, og ga et fortettet, «kjøttaktig» inntrykk. Normalt skal epitelcellene i baktarmen være tydelig vakuolisert i det supranukleære cytoplasma. I disse cellene var cytoplasma tilsynelatende kompakt, uten spor av vakuolisering.
- Hos noen fisk var det et unormalt stort innslag av betennelsesceller basalt i slimhinna, under basis av foldene og i bindevevsdragene som går sentralt i tarmfoldene. Her skal det normalt være et visst innslag av betennelsesceller, men det var flere fisk med store og omfattende infiltrater av betennelsesceller i dette området. Hos noen av disse individene var foldene også fortykket og forkortet, heller enn forvokst og forgreinet som hos flertallet.

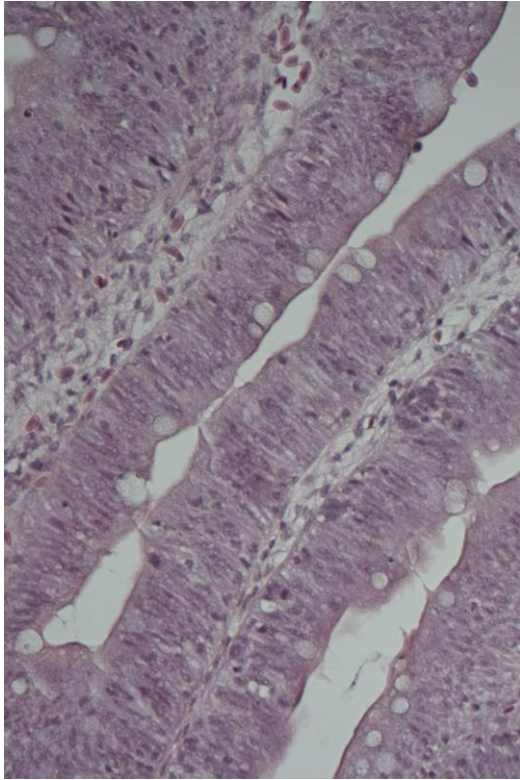


Baktarm FO

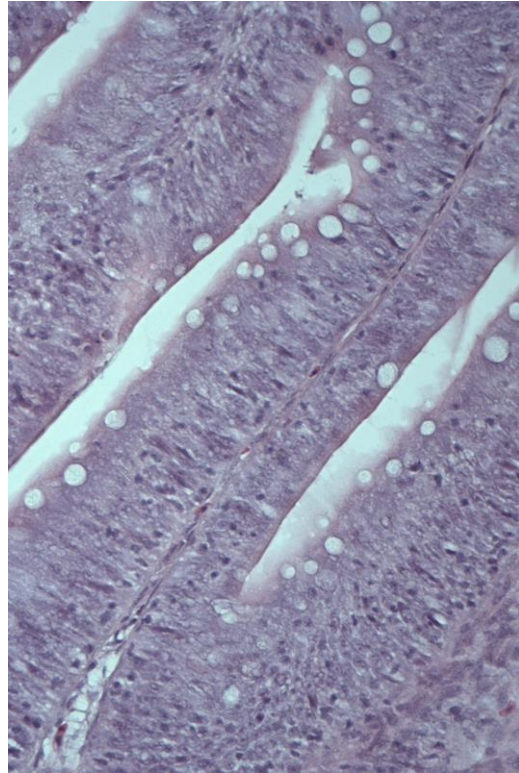


Baktarm HM

Figur 16 Histologiske snitt av baktarm i FO og HM diettgrupper

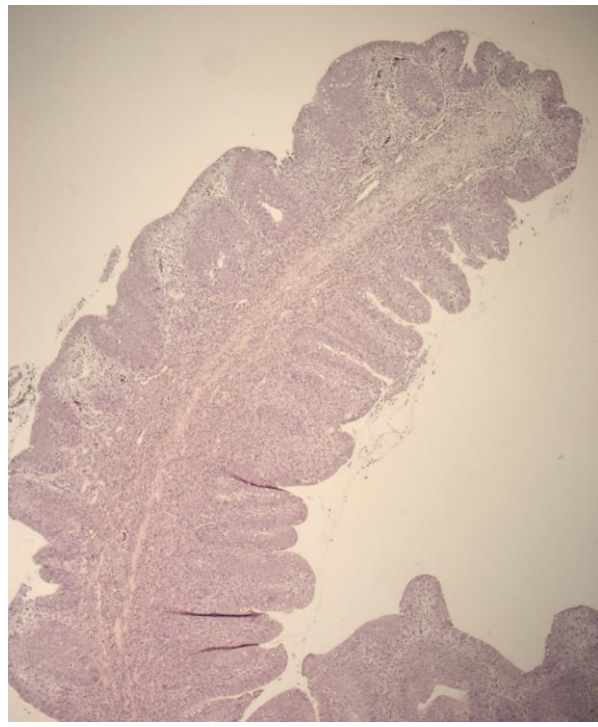
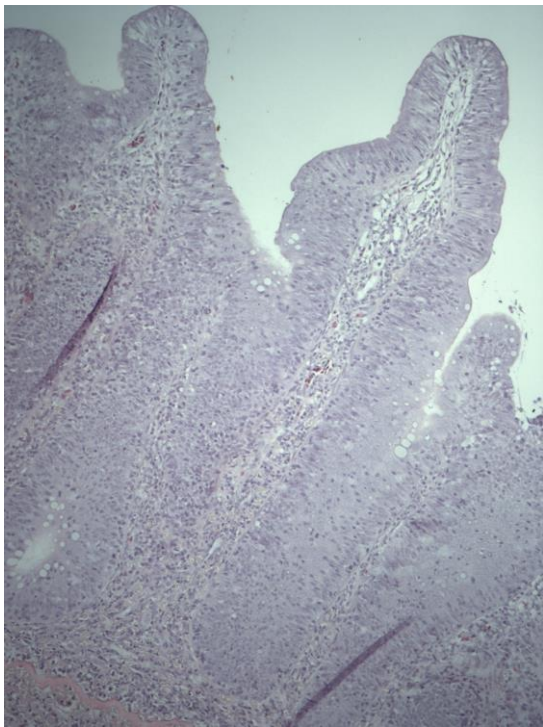


Baktarm FO diettgruppe



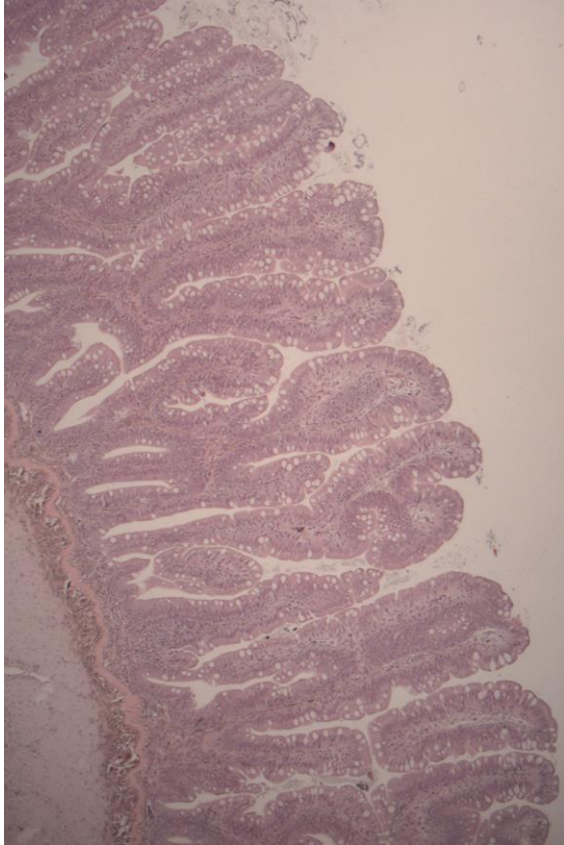
Baktarm HM diettgruppe

Figur 17 Histologiske snitt av baktarm i FO og HM diettgrupper

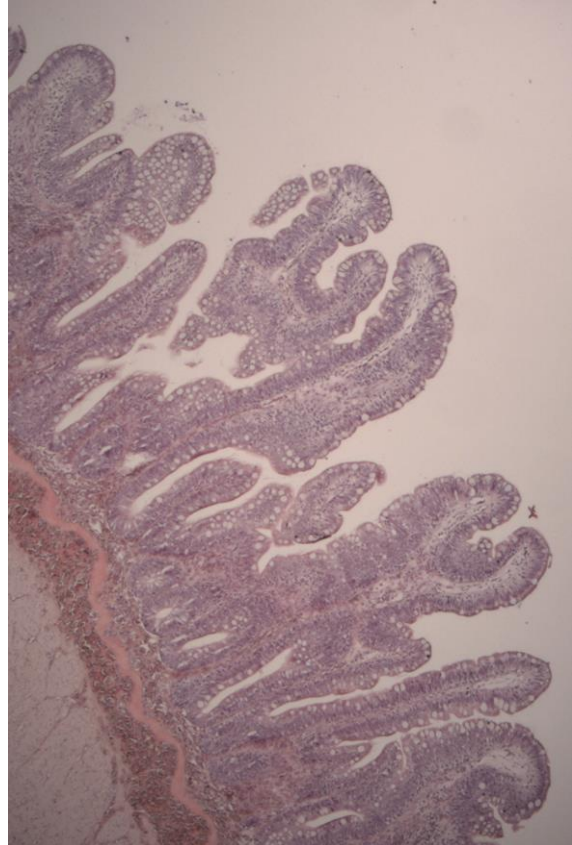


Figur 18 Histologiske snitt av baktarm HM diettgruppe. To ulike forstørrelser, enkle folder til venstre og kompleks fold til høyre. Viser tarm med store celleinfiltrater

**Midttarm (Figur 19)** ble bedømt som normal hos alle 24 fisk. Det var normale strukturer og et normalt cellebilde. Det var litt variasjon fra fisk til fisk, f.eks. mht. forekomst av mucusceller, men ikke noe som ble bedømt som patologisk eller unormalt.



Midttarm, FO diettgruppe



Midttarm HM diettgruppe

Figur 19 Histologiske snitt av midttarm

### 5.3.7 Generell diskusjon og konklusjon av forsøket med mikroalge i merder i sjø

Forsøkene viser at *Schizochytrium sp.* er en god kilde til DHA i dietten til laks, men det er viktig å sikre at også behovet for EPA er dekket. *Schizochytrium sp.* biomasse gav bedre tilvekst og filetpigmentering og genekspresjonsdataene tydet på antiinflammatorisk effekt i tarm. Det var ingen forskjeller i sensoriske egenskaper som lukt og smak mellom laks føret FO og laks føret HM dietten.

## 6 Hovedfunn

- Den modifiserte rapsoljen (DHA-CA) har en gunstig fettsyreprofil sammenlignet med konvensjonelle planteoljer, med høye nivåer av omega-3 fettsyrene 18:3n-3 og DHA. Analyse av en rekke helsemarkører tyder på at DHA-CA er en trygg oljekilde i fôr til laks.
- DHA-CA olje i fôr til laks både i ferskvann og sjøvann gir tilsvarende vekst som fiskeolje, og bedre farge av skinn og muskel.
- Genekspresjonsdata og resolvinanalyse tyder på at økende nivå av DHA-CA olje i fôr til laks har positiv effekt på immunrespons
- Schizochytrium sp. biomasse er en god kilde til DHA i dietten til laks, men det er viktig å sikre at også behovet for EPA er dekket.
- Schizochytrium sp. biomasse gav bedre tilvekst og filetpigmentering, og genekspresjonsdataene tydet på antiinflammatorisk effekt i tarm.
- Schizochytrium sp. biomasse ser ut til å kunne brukes i fôr til laks gjennom store deler av livssyklus, uten noen negative effekter på vekst eller produktkvalitet.
- Schizochytrium sp. biomasse i fôr til laks gjennom store deler av livssyklus påvirker ikke lukt og smak av fileten.

## 7 Leveranser

### Manuskripter

1. Bente Ruyter, Nini H. Sissener, Tone-Kari Ostbye, Cedric Simon, Aleksei Krasnov, Marta Bou Mira, Monica Sanden<sup>2</sup>, and Gerd M. Berge<sup>1</sup> (2018). Omega-3 canola oil effectively replaces fish oil as a new safe dietary source of docosahexaenoic acid (DHA) in feed for Atlantic salmon (*manuskript klar til innsending journal*)
2. B. Ruyter, K. Østbye, A. Krasnov, M. Bou G. Sissener, N., Mørkøre, T., Ytrestøyl, T. and Berge, (2018) Assessment of the effects of increasing dietary level of Omega 3 Canola Oil in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) diets in Sea Water; effects on performance, fillet quality, fatty acid composition and health (*manuskript*)
3. Kousoulaki, K., Berge, G.M., Mørkøre, T., Krasnov, A., Ytrestøyl, T., Mozambique, H. Carlehög, M and Ruyter, B. (2018) Performance and fillet quality attributes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed long term diets where fish oil is substituted by whole *Schyzochytrium limacinum* biomass (*manuskript klar til innsending journal*)

Manuscript 1 og 3 vil sendes til vitenskapelig journal i løpet av våren 2019, manuskript 2 vil sendes inn høsten 2019

### OVERSIKT OVER PRESENTASJONER PÅ KONFERANSER OG MØTER, nasjonale og internasjonale

**Bogevik, André Sture; Samuelsen, Tor Andreas; Østbye, Tone-Kari K; Ruyter, Bente; Krasnov, Aleksei; Press, Charles McLean; Pittman, Karin; Tsappis, Alex; Kousoulaki, Katerina.** Extrusion studies and life-long total replacement of fish oil in salmon feeds by heterotrophic microalgae biomass. 2016 International Symposium on Fish Nutrition and Feeding (ISFNF); 2016-06-05 - 2016-06-10.

**Bogevik, André Sture; Samuelsen, Tor Andreas; Østbye, Tone-Kari K; Krasnov, Aleksei; Press, Charles McLean; Pittman, Karin; Tsappis, Alex; Kousoulaki, Katerina.** Life-long total replacement of fish oil in salmon feeds by heterotrophic microalgae. Havbrukskonferansen 2016; 2016-04-18 - 2016-04-20.

**Erwes, Pierre; Navalho, Joao; McKenzie, Douglas; Kousoulaki, Katerina.** Microalgae: the Key to Improving Nutrition Worldwide. Live-streamed panel session, BioMarine Business Convention; 2014-10-30 - 2014-10-31.

**Kousoulaki, Katerina; Carlehög, Mats; Mørkøre, Turid; Ytrestøyl, Trine; Berge, Gerd Marit; Ruyter, Bente.** Life-long study on the replacement of fishoil by heterotrophic microalgae in Atlantic salmon diets: Effects on performance and fillet quality. Aquaculture Europe 2017; 2017-10-17 - 2017-10-20.

**Kousoulaki, Katerina; Press, Charles McLean; Krasnov, Aleksei; Østbye, Tone-Kari K; Mørkøre, Turid; Berge, Gerd Marit; Carlehög, Mats; Ytrestøyl, Trine; Pittman, Karin; Ruyter, Bente.** Livslang erstatning av all fiskeolje i fôret til laks med algemel og effekter på vekst, helse og fillet kvalitet. Havbruk 2018 – Havbruk i samfunnet; 2018-04-18 - 2018-04-20.

**Mørkøre, Turid; Larsson, Thomas; Bæverfjord, Grete; Ruyter, Bente; Berge, Gerd Marit; Kousoulaki, Katerina; Rørvik, Kjell-Arne; Dessen, Jens-Erik; Ytrestøyl, Trine.** Mørke flekker i laksefilet.

Betydning av fôr og forhold i tidlige livsfaser. Havbruk 2018 – Havbruk i samfunnet; 2018-04-18 - 2018-04-20.

**Ruyter Bente.** Foredrag Veterinærdagene . 2018 Metoder for å øke andelen marine omega-3 fettsyrer i laks.

**Ruyter, Bente.** Debatt Litteraturhuset, Nye kilder til omega 3 fettsyrer <http://www.bioteknologiradet.no/2015/11/se-video-debatt-om-gmo-og-fremtidens-omega-3/>

**Ruyter, Bente.** Ernæring og fiskehelse. Invitert innledningsforedrag. Det 12. norske Fiskeernæringsseminar; 2015-11-05 - 2015-11-06.

**Ruyter, Bente.** Lave omega-3 nivåer i fôr og fiskehelse. Dialogmøte; 2015-01-21, Referansegruppe tilstede.

**Ruyter, Bente.** Omega-3 og fiskehelse. Dialogmøte; 2015-11-25, Referansegruppe tilstede.

**Ruyter, Bente.** Omega-3 og fiskehelse. Dialogmøte; 2017-11-12, Referansegruppe tilstede.

**Ruyter, Bente.** Strategies to Improve Efficiency Omega-3 Fatty Acid Utilization in Atlantic Salmon (Keynote Lecture). 2017. 15th Euro Fed Lipid Congress Oil.

**Ruyter, Bente.** Omega-3 fettsyrer, eksempler fra sentrale forskningsspørsmål. AquaNor 2015. Felleskonferansen FHF og NFR; 2015-08-18.

**Ruyter, Bente; Sissener, Nini; Østbye, Tone-Kari; Bou Mira, Marta; Sanden, Monica; Krasnov, Aleksei; Mørkøre, Turid; Simon, Cedric and Berge Gerd M.** Omega-3 Canola Oil effectively replaces fish oil as a dietary source of docosahexaenoic acid (DHA) in feed for Atlantic salmon in freshwater and seawater. International conference fish nutrition, ISFNF, Las Palmas 2018.

**Ruyter, Bente; Sissener, Ninni; Østbye, Tone-Kari K; Krasnov, Aleksei; Sanden, Monica; Bou, Marta; Simon, Cedric; Berge, Gerd Marit.** Modifisert rapsolje som omega-3 kilde i fôr til laks. Havbruk 2018 – Havbruk i samfunnet; 2018-04-18 - 2018-04-20.

**Østbye, Tone-Kari K; Bou, Marta; Simon, Cedric; Blyth, David; Krasnov, Aleksei; Ruyter, Bente.** Er Omega-3 canola-oil et godt alternativ til omega-3 fettsyrer i fiskefôr?. Det 13. Norske fiskeernæringsseminar; 2017-05-30 - 2017-05-31.

## Nyhets saker

- GMO-raps kan bli ny oljekilde til laks. Kyst.no 01.12.2017 09:28 3
- Mulig ny oljekilde til laks. Nofima 30.11.2017 00:44 5
- Oppdrettslaksen trenger marint omega-3. Kyst.no 04.05.2017 07:33 7
- Omega-3 nivået i laksen halvert på 10 år. NRK Finnmark 24.06.2016 19:22 13
- Omega-3-fordelingens balansekunst. iLaks 23.06.2016 09:50 15
- Laksen må klare seg på mindre omega-3 enn før. Forskning.no 23.06.2016 09:48 17
- Manko på omega-3. Fiskeribladet Fiskaren 23.06.2016 09:16 20
- Så lite marint omega 3 kan det være i fôret. Kyst.no 23.06.2016 09:12 22
- Omega-3 i laks fra ny plante. Adresseavisen 25.04.2016 24
- Omega-3 i laks fra ny plante. Adresseavisen Pluss 24.04.2016 22:47 26
- Må finne mer omega-3 til oppdrettslaksen. Adresseavisen 22.04.2016 28
- Må finne mer omega-3 til laksen. Adresseavisen Pluss 21.04.2016 15:24 30
- Norja ei ole valmis geeniloheen, mutta geenirehut kiinnostavat. Helsingin Sanomat 23.12.2015 02:00 32
- Omega-3-fordelingens balansekunst. NTBtekst 23.06.2016 33



- Norsk testfisk skal få GMO. Bondebladet 29.10.2015 36
- Tester ut GMO i fôr til laks. Kyst.no 27.10.2015 12:33 38
- Jakter på nye kilder til omega 3. Kyst.no 17.03.2015 08:47 41
- Alger kan erstatte fiskeolje i fôr til oppdrettslaks. Ny Teknikk 24.10.2014 14:41 51
- Alger kan erstatte fiskeolje i fôr til oppdrettslaks. Forskning.no 22.09.2014 06:16 53
- Algemel kan erstatte fiskeolje. Nationen 22.09.2014 55
- Alger kan erstatte fiskeolje i fôr til oppdrettslaks. MyNewsdesk 11.09.2014 13:56 57
- Algemel i laksefôr ga frisk fisk. Kyst.no 11.09.2014 12:34 59
- Algemel i laksefôr ga frisk og sunn fisk. Sysla 11.09.2014 10:12 60
- Algemel i laksefôr ga frisk og sunn fisk. iLaks 11.09.2014 09:00 62

#### **Andre prosjektleveranser**

- 01.07.2015 Referat fra oppstartsmøte med referansegruppen og FHF
- 31.12.2015 Statusrapport til FHF
- 01.07.2016 Referat fra møte med referansegruppen og FHF
- 31.12.2016 Statusrapport til FHF
- 01.07.2017 Referat fra møte med referansegruppen og FHF
- 01.10.2018 Faglig sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer
- 01.10.2018 Administrativ sluttrapport i tråd med FHF's retningslinjer

## 8 REFERANSER

- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O., Wattiaux, R., Jacques, P., De Duve, C., 1964. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, d-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*. 92, 179.
- Betancor, M.B., Li, K., Bucerzan, V.S., Sprague, M., Sayanova, O., Usher, S., Han, L., Norambuena, F., Torrissen, O., Napier, J.A., 2018. Oil from transgenic camelina sativa containing over 25 % n-3 long-chain pufa as the major lipid source in feed for atlantic salmon (*salmo salar*). *British Journal of Nutrition*. 119, 1378-1392.
- Bjerkeng, B., Følling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J.J., Alsted, N., 1997. Bioavailability of all-e-astaxanthin and z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 157, 63-82.
- Bou, M., Wang, X., Todorcevic, M., Østbye, T.-K., Ruyter, B., 2018. Adipocyte response to nutrient deprivation in atlantic salmon is influenced by its endogenous lipid composition, *International Symposium on Fish Nutrition and Feeding 2018*.
- Bou, M., Berge, G.M., Baeverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.-K., Ruyter, B., 2017a. Low levels of very-long-chain n-3 pufa in atlantic salmon (*salmo salar*) diet reduce fish robustness under challenging conditions in sea cages. *Journal of nutritional science*. 6.
- Bou, M., Berge, G.M., Baeverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.-K., Romarheim, O.H., Hatlen, B., Leeuwis, R., Venegas, C., Ruyter, B., 2017b. Requirements of n-3 very long-chain pufa in atlantic salmon (*salmo salar* l): Effects of different dietary levels of epa and dha on fish performance and tissue composition and integrity. *British Journal of Nutrition*. 117, 30-47.
- Busch, D.H., Pilip, I.M., Vijh, S., Pamer, E.G., 1998. Coordinate regulation of complex t cell populations responding to bacterial infection. *Immunity*. 8, 353-362.
- Chiurchiù, V., Leuti, A., Dalli, J., Jacobsson, A., Battistini, L., Maccarrone, M., Serhan, C.N., 2016. Proresolving lipid mediators resolvin d1, resolvin d2, and maresin 1 are critical in modulating t cell responses. *Science translational medicine*. 8, 353ra111-353ra111.
- EFSA, G., 2008. Safety and nutritional assessment of gm plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 46, S2.
- Evans, A.M., DeHaven, C.D., Barrett, T., Mitchell, M., Milgram, E., 2009. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical Chemistry*. 81, 6656-6667.
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O., Wattiaux, R., Jacques, P., De Duve, C., 1964. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, d-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*. 92, 179.
- Betancor, M.B., Li, K., Bucerzan, V.S., Sprague, M., Sayanova, O., Usher, S., Han, L., Norambuena, F., Torrissen, O., Napier, J.A., 2018. Oil from transgenic camelina sativa containing over 25 % n-3 long-chain pufa as the major lipid source in feed for atlantic salmon (*salmo salar*). *British Journal of Nutrition*. 119, 1378-1392.
- Bjerkeng, B., Følling, M., Lagocki, S., Storebakken, T., Olli, J.J., Alsted, N., 1997. Bioavailability of all-e-astaxanthin and z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 157, 63-82.
- Bou, M., Wang, X., Todorcevic, M., Østbye, T.-K., Ruyter, B., 2018. Adipocyte response to nutrient deprivation in atlantic salmon is influenced by its endogenous lipid composition, *International Symposium on Fish Nutrition and Feeding 2018*.

- Bou, M., Berge, G.M., Baeverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.-K., Ruyter, B., 2017a. Low levels of very-long-chain n-3 pufa in atlantic salmon (*salmo salar*) diet reduce fish robustness under challenging conditions in sea cages. *Journal of nutritional science*. 6.
- Bou, M., Berge, G.M., Baeverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.-K., Romarheim, O.H., Hatlen, B., Leeuwis, R., Venegas, C., Ruyter, B., 2017b. Requirements of n-3 very long-chain pufa in atlantic salmon (*salmo salar* l): Effects of different dietary levels of epa and dha on fish performance and tissue composition and integrity. *British Journal of Nutrition*. 117, 30-47.
- Busch, D.H., Pilip, I.M., Vijh, S., Pamer, E.G., 1998. Coordinate regulation of complex t cell populations responding to bacterial infection. *Immunity*. 8, 353-362.
- Chiurchiù, V., Leuti, A., Dalli, J., Jacobsson, A., Battistini, L., Maccarrone, M., Serhan, C.N., 2016. Proresolving lipid mediators resolvin d1, resolvin d2, and maresin 1 are critical in modulating t cell responses. *Science translational medicine*. 8, 353ra111-353ra111.
- Damitha De Mel and Cenk Suphioglu (2014) Fishy Business: Effect of Omega-3 Fatty Acids on Zinc Transporters and Free Zinc Availability in Human Neuronal Cells. *Nutrients*. 2014 Aug; 6(8): 3245–3258.
- EFSA, G., 2008. Safety and nutritional assessment of gm plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 46, S2.
- Evans, A.M., DeHaven, C.D., Barrett, T., Mitchell, M., Milgram, E., 2009. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical Chemistry*. 81, 6656-6667.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J biol Chem*. 226, 497-509.
- Glencross, B.D., Tocher, D.R., Matthew, C., Bell, J.G., 2014. Interactions between dietary docosahexaenoic acid and other long-chain polyunsaturated fatty acids on performance and fatty acid retention in post-smolt atlantic salmon (*salmo salar*). *Fish physiology and biochemistry*. 40, 1213-1227.
- Gryson, N., Messens, K., Dewettinck, K., 2004. Influence of different oil-refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 81, 231-234.
- ISO\_8586, 2012. Iso: 8586. Sensory analysis—general guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- ISO\_8589, 2007. 8589. Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms. Italy: Ente Nazionale Italiano di Unificazione.
- ISO\_13299, 2016. Sensory analysis -- methodology -- general guidance for establishing a sensory profile, pp. 41.
- Jordal, A.E., Lie, Ø., Torstensen, B., 2007. Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in atlantic salmon (*salmo salar* l.). *Aquaculture Nutrition*. 13, 114-130.
- Julshamn, K., Brenna, J., 1999. Long term accuracy in the determination of various elements in fish and other seafoods by semi-quantitative icp-ms. in: Holland, R., Tanner, S. (Eds.), *Plasma source mass spectrometry - new developments and applications*. Royal Society of Chemistry, London, pp. 167-172.

- Kjær, M., Todorčević, M., Torstensen, B., Vegusdal, A., Ruyter, B., 2008. Dietary n-3 hufa affects mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in atlantic salmon. *Lipids*. 43, 813-827.
- Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R., Sweetman, J., 2016. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in atlantic salmon (*salmo salar* L.). *Aquaculture*. 451, 47-57.
- Kousoulaki, K., Østbye, T.-K.K., Krasnov, A., Torgersen, J.S., Mørkøre, T., Sweetman, J., 2015. Metabolism, health and fillet nutritional quality in atlantic salmon (*salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae. *Journal of nutritional science*. 4.
- Lawless, H.T., Heymann, H., 2010. Sensory evaluation of food: Principles and practices. Springer Science & Business Media.
- Leaver, M.J., Villeneuve, L.A., Obach, A., 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.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\delta\delta$ ct method. *methods*. 25, 402-408.
- Mason, M.E., Waller, G.R., 1964. Dimethoxypropane induced transesterification of fats and oils in preparation of methyl esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 36, 583-586.
- Murashita, K., Jordal, A.-E.O., Nilsen, T.O., Stefansson, S.O., Kurokawa, T., Björnsson, B.T., Moen, A.-G.G., Rønnestad, I., 2011. Leptin reduces atlantic salmon growth through the central pro-opiomelanocortin pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 158, 79-86.
- Mørkøre, T., Einen, O., 2003. Relating sensory and instrumental texture analyses of atlantic salmon. *Journal of food science*. 68, 1492-1497.
- Nayak, S., Khozin-Goldberg, I., Cohen, G., Zilberg, D., 2018. Dietary supplementation with  $\omega$ 6 lc-pufa-rich algae modulates zebrafish immune function and improves resistance to streptococcal infection. *Frontiers in immunology*. 9.
- Ng, W.K., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2007. The use of palm oil in aquaculture feeds for salmonid species. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109, 394-399.
- Nichols, P.D., Glencross, B., Petrie, J.R., Singh, S.P., 2014. Readily available sources of long-chain omega-3 oils: Is farmed australian seafood a better source of the good oil than wild-caught seafood? *Nutrients*. 6, 1063-1079.
- Nicolaou, A., Mauro, C., Urquhart, P., Marelli-Berg, F., 2014. Polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators and t cell function. *Frontiers in immunology*. 5, 75.
- Raa, J., 2015. Immune modulation by non-digestible and non-absorbable beta-1, 3/1, 6-glucan. *Microbial ecology in health and disease*. 26, 27824.
- Reitman, Z.J., Jin, G., Karoly, E.D., Spasojevic, I., Yang, J., Kinzler, K.W., He, Y., Bigner, D.D., Vogelstein, B., Yan, H., 2011. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108, 3270-3275.
- Ren, L.-J., Ji, X.-J., Huang, H., Qu, L., Feng, Y., Tong, Q.-Q., Ouyang, P.-K., 2010. Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *schizochytrium* sp. *Applied microbiology and biotechnology*. 87, 1649-1656.

- Ruyter, B., Røsjø, C., Einen, O., Thomassen, M., 2000a. Essential fatty acids in atlantic salmon: Effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition*. 6, 119-127.
- Ruyter, B., Røsjø, C., Einen, O., Thomassen, M., 2000b. Essential fatty acids in atlantic salmon: Time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*. 6, 109-117.
- Ruyter, B., Moya-Falcón, C., Rosenlund, G., Vegusdal, A., 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of atlantic salmon (*salmo salar*): Effects of temperature and dietary soybean oil. *Aquaculture*. 252, 441-452.
- Ruyter, B., Bou, M., Bæverfjord, G., Østbye, T.-K.K., Ytrestøyl, T., Bjerke, M.T., Sigholt, T., Berge, G.M., 2016. Langtidseffekter av lave omega-3 nivåer i fôr på laksens helse.
- Røsjø, C., Berg, T., Manum, K., Gjøl, T., Magnusson, S., Thomassen, M.S., 1994. Effects of temperature and dietary n-3 and n-6 fatty acids on endocytic processes in isolated rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*, walbaum) hepatocytes. *Fish physiology and biochemistry*. 13, 119-132.
- Sanden, M., Hemre, G., Måge, Å., Lunestad, B., Espe, M., Lundebye, A., Amlund, H., Ørnsrud, R., 2016a. Program for overvåking av fiskefôr, årsrapport for prøver innsamlet i 2015, Bergen: NIFES.
- Sanden, M., Liland, N.S., Sæle, Ø., Rosenlund, G., Du, S., Torstensen, B.E., Stubhaug, I., Ruyter, B., Sissener, N.H., 2016b. 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, 1463-1480.
- Sissener, N.H., Liland, N.S., Holen, E., Stubhaug, I., Torstensen, B.E., Rosenlund, G., 2017. 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, 123-134.
- Thomassen, M.S., Røsjø, C., 1989. Different fats in feed for salmon: Influence on sensory parameters, growth rate and fatty acids in muscle and heart. *Aquaculture*. 79, 129-135.
- 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.
- Torstensen, B.E., Espe, M., Stubhaug, I., Lie, Ø., 2011. Dietary plant proteins and vegetable oil blends increase adiposity and plasma lipids in atlantic salmon (*salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*. 106, 633-647.
- Torstensen, B.E., Bell, J.G., Rosenlund, G., Henderson, R.J., Graff, I.E., Tocher, D.R., Lie, Ø., Sargent, J.R., 2005. Tailoring of atlantic salmon (*salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53, 10166-10178.
- Xiao, Z., Mescher, M.F., Jameson, S.C., 2007. Detuning cd8 t cells: Down-regulation of cd8 expression, tetramer binding, and response during ctl activation. *Journal of Experimental Medicine*. 204, 2667-2677.
- Ytrestøyl, T., Aas, T., Åsgård, T., 2014. Resource utilisation of norwegian salmon farming in 2012 and 2013. Nofima report 36/2014. ISBN 978-82-8296-219-3.
- FAO. Fish as feed inputs for aquaculture Practices, sustainability and implications <http://www.fao.org/3/a-i1140e.pdf>
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 226, 497-509.
- Glencross, B.D., Tocher, D.R., Matthew, C., Bell, J.G., 2014. Interactions between dietary docosahexaenoic acid and other long-chain polyunsaturated fatty acids on performance and

- fatty acid retention in post-smolt atlantic salmon (*salmo salar*). *Fish physiology and biochemistry*. 40, 1213-1227.
- Gryson, N., Messens, K., Dewettinck, K., 2004. Influence of different oil-refining parameters and sampling size on the detection of genetically modified DNA in soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 81, 231-234.
- ISO\_8586, 2012. Iso: 8586. Sensory analysis—general guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.
- ISO\_8589, 2007. 8589. Sensory analysis: General guidance for the design of test rooms. Italy: Ente Nazionale Italiano di Unificazione.
- ISO\_13299, 2016. Sensory analysis -- methodology -- general guidance for establishing a sensory profile, pp. 41.
- Jordal, A.E., Lie, Ø., Torstensen, B., 2007. Complete replacement of dietary fish oil with a vegetable oil blend affect liver lipid and plasma lipoprotein levels in atlantic salmon (*salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*. 13, 114-130.
- Julshamn, K., Brenna, J., 1999. Long term accuracy in the determination of various elements in fish and other seafoods by semi-quantitative icp-ms. in: Holland, R., Tanner, S. (Eds.), *Plasma source mass spectrometry - new developments and applications*. Royal Society of Chemistry, London, pp. 167-172.
- Kjær, M., Todorčević, M., Torstensen, B., Vegusdal, A., Ruyter, B., 2008. Dietary n-3 hufa affects mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in atlantic salmon. *Lipids*. 43, 813-827.
- Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R., Sweetman, J., 2016. Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in atlantic salmon (*salmo salar* L.). *Aquaculture*. 451, 47-57.
- Kousoulaki, K., Østbye, T.-K.K., Krasnov, A., Torgersen, J.S., Mørkøre, T., Sweetman, J., 2015. Metabolism, health and fillet nutritional quality in atlantic salmon (*salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae. *Journal of nutritional science*. 4.
- Lawless, H.T., Heymann, H., 2010. *Sensory evaluation of food: Principles and practices*. Springer Science & Business Media.
- Leaver, M.J., Villeneuve, L.A., Obach, A., 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.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\delta\delta$ ct method. *methods*. 25, 402-408.
- Mason, M.E., Waller, G.R., 1964. Dimethoxypropane induced transesterification of fats and oils in preparation of methyl esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*. 36, 583-586.
- Murashita, K., Jordal, A.-E.O., Nilsen, T.O., Stefansson, S.O., Kurokawa, T., Björnsson, B.T., Moen, A.-G.G., Rønnestad, I., 2011. Leptin reduces atlantic salmon growth through the central pro-opiomelanocortin pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 158, 79-86.
- Mørkøre, T., Einen, O., 2003. Relating sensory and instrumental texture analyses of atlantic salmon. *Journal of food science*. 68, 1492-1497.
- Nayak, S., Khozin-Goldberg, I., Cohen, G., Zilberg, D., 2018. Dietary supplementation with  $\omega$ 6 lc-pufa-rich algae modulates zebrafish immune function and improves resistance to streptococcal infection. *Frontiers in immunology*. 9.
- Ng, W.K., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2007. The use of palm oil in aquaculture feeds for salmonid species. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109, 394-399.

- Nichols, P.D., Glencross, B., Petrie, J.R., Singh, S.P., 2014. Readily available sources of long-chain omega-3 oils: Is farmed Australian seafood a better source of the good oil than wild-caught seafood? *Nutrients*. 6, 1063-1079.
- Nicolaou, A., Mauro, C., Urquhart, P., Marelli-Berg, F., 2014. Polyunsaturated fatty acid-derived lipid mediators and T cell function. *Frontiers in Immunology*. 5, 75.
- Raa, J., 2015. Immune modulation by non-digestible and non-absorbable beta-1, 3/1, 6-glucan. *Microbial ecology in health and disease*. 26, 27824.
- Reitman, Z.J., Jin, G., Karoly, E.D., Spasojevic, I., Yang, J., Kinzler, K.W., He, Y., Bigner, D.D., Vogelstein, B., Yan, H., 2011. Profiling the effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations on the cellular metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108, 3270-3275.
- Ren, L.-J., Ji, X.-J., Huang, H., Qu, L., Feng, Y., Tong, Q.-Q., Ouyang, P.-K., 2010. Development of a stepwise aeration control strategy for efficient docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87, 1649-1656.
- Ruyter, B., Røsjø, C., Einen, O., Thomassen, M., 2000a. Essential fatty acids in Atlantic salmon: Effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition*. 6, 119-127.
- Ruyter, B., Røsjø, C., Einen, O., Thomassen, M., 2000b. Essential fatty acids in Atlantic salmon: Time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition*. 6, 109-117.
- Ruyter, B., Moya-Falcón, C., Rosenlund, G., Vegusdal, A., 2006. Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of temperature and dietary soybean oil. *Aquaculture*. 252, 441-452.
- Ruyter, B., Bou, M., Bæverfjord, G., Østbye, T.-K.K., Ytrestøl, T., Bjerke, M.T., Sigholt, T., Berge, G.M., 2016. Langtidseffekter av lave omega-3 nivåer i fôr på laksens helse.
- Røsjø, C., Berg, T., Manum, K., Gjøen, T., Magnusson, S., Thomassen, M.S., 1994. Effects of temperature and dietary n-3 and n-6 fatty acids on endocytic processes in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) hepatocytes. *Fish Physiology and Biochemistry*. 13, 119-132.
- Sanden, M., Hemre, G., Måge, Å., Lunestad, B., Espe, M., Lundebye, A., Amlund, H., Ørnstrud, R., 2016a. Program for overvåking av fiskefôr, årsrapport for prøver innsamlet i 2015, Bergen: NIFES.
- Sanden, M., Liland, N.S., Sæle, Ø., Rosenlund, G., Du, S., Torstensen, B.E., Stubhaug, I., Ruyter, B., Sissener, N.H., 2016b. 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, 1463-1480.
- Sissener, N.H., Liland, N.S., Holen, E., Stubhaug, I., Torstensen, B.E., Rosenlund, G., 2017. 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, 123-134.
- Thomassen, M.S., Røsjø, C., 1989. Different fats in feed for salmon: Influence on sensory parameters, growth rate and fatty acids in muscle and heart. *Aquaculture*. 79, 129-135.
- 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.
- Torstensen, B.E., Espe, M., Stubhaug, I., Lie, Ø., 2011. Dietary plant proteins and vegetable oil blends increase adiposity and plasma lipids in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition*. 106, 633-647.
- Torstensen, B.E., Bell, J.G., Rosenlund, G., Henderson, R.J., Graff, I.E., Tocher, D.R., Lie, Ø., Sargent, J.R., 2005. Tailoring of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) flesh lipid composition and sensory quality by replacing fish oil with a vegetable oil blend. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 10166-10178.
- Xiao, Z., Mescher, M.F., Jameson, S.C., 2007. Detuning CD8 T cells: Down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. *Journal of Experimental Medicine*. 204, 2667-2677.

Ytrestøyl, T., Aas, T., Åsgård, T., 2014. Resource utilisation of norwegian salmon farming in 2012 and 2013. Nofima report 36/2014. ISBN 978-82-8296-219-3.

Aas, T., Ytrestøyl, T., Åsgård, T., 2016. Resource utilisation of Norwegian salmon farming in 2016. Nofima report, *in press*.



