

Utnyttelse av P fra sildeavskjær som alternativ P kilde i fôr til laksesmolt (*Salmo salar* L.)

Sissel Albrektsen, Erik-Jan Lock*, Grete Bæverfjord, Mona Pedersen, Aleksei Krasnov, Harald Takle, Eva Veiseth-Kent, Robin Ørnsrud*, Rune Waagbø* og Elisabeth Ytteborg (*NIFES, Bergen)





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

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy 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 Johnsen gate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sundalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
Faks: 64 94 33 14
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

ISBN 978-82-8296-163-9 trykt
ISBN 978-82-8296-164-6 pdf
ISSN 1890-579X

<i>Tittel:</i> Utnyttelse av syrehydrolysert P fra sildeavskjær som alternativ P kilde i fôr til laksesmolt (<i>Salmo salar</i> L.)	<i>Rapportnr.:</i> 8/2014
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> S. Albrektsen, E.-J.Lock, G. Bæverfjord, M. Pedersen, A. Krasnov, H. Takle, E. Veiseth-Kent, R. Ørnstrud, R. Waagbø og E. Ytteborg.	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi	<i>Dato:</i> 7. februar 2014
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og Havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 42 + 7
<i>Stikkord:</i> Sildeavskjær, biprodukter, fosforutnyttelse, syrehydrolyse, startfôring, laks	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900558
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Målet med dette prosjektet var å øke verdiskapningen av marint restråstoff ved å utvikle bioteknologiske løsninger som kan frigjøre P fra fiskebein og gjøre P mer tilgjengelig for laks, samt å utvikle nye marine P ingredienser som kan bidra til en mer bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser. Det er utviklet og optimalisert en prosess for syrehydrolyse av P i beinfraksjon fra sildeavskjær, og resultatene våre viser at omtrent 90 % av P i avskjæret kan frigjøres ved hydrolyse i sterke syrer (H ₂ SO ₄). Det er gjennomført et 13 ukers fôringsforsøk med laksesmolt etter sjøutsett. Basert på resultat for vekst, røntgen, P fordøyelighet, P retensjon, spesifikt P nivå i hel fisk, bein og skjell, samt utnyttelse av P fra fôret, kan det konkluderes med at P i FBH fra sild er like biologisk tilgjengelig som for krystallinske former av P (mono Na-P). Det er dokumentert at P behovet i laksesmolt er dekket med 0,7 % løselig P i fôret. Smolt fôret med Lav P kontroll diett (0,46 % løselig P) viste oppregulering av en markør for opptak av P i tarm (NaPi) og av en markør for beindannelse i virvler (ALP) noe som indikerer at disse markørene kan fungere som sensitive P mangelmarkører i smolt. Nye P anbefalinger basert på løselig P gir grunnlag for å formulere laksefôr nær reelt P behov slik at man kan oppnå høy P fordøyelighet og P retensjon i fisk og redusert P utslipp til miljøet. Bedre utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser kan bidra til en mer bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig fiskeoppdrett og godt omdømme for norsk oppdrettsfisk globalt.	<i>Prosjektnr.:</i> 21109
<i>English summary/recommendation:</i> The aim of the present study was to solubilize P in fish bones and make this limited mineral resource more available in order to contribute to a more sustainable, cost-efficient and environmentally friendly use of marine feed resources. A technological process using acid treatment of cut-offs from herring was developed and optimized to produce fish bone hydrolysate (FBH). The utilization of P from FBH was tested in a 13 week feeding trials with Atlantic salmon smolt. The results showed that approximately 90% of P in herring bones can be solubilized and that the availability was equally high as for crystalline P (mono Na-P) in smolt, efficiently sustaining normal growth, mineralization and skeletal development. Soluble P at 0.7 % in the diet after sea water transfer covered the P requirement. By formulating feeds with P close to the P requirement, maximum P digestibility and retention in addition to reduced environmental impact can be achieved.	

Innhold

1	Oppsummerende sammendrag	1
2	Executive summary	2
3	Bakgrunn	3
4	Materiale og metoder	5
4.1	Produksjon av fiskebeinhydrolysat	5
4.2	Fôrproduksjon	5
4.3	Fiskeforsøk	6
4.4	Røntgenevaluering	7
4.5	Kjemiske analyser	7
4.6	Fordøyelighet	8
4.7	Real time qPCR	8
4.8	ALP og TRAP i bein og skjell	8
4.9	Vit D3 metabolitter i plasma	9
4.10	Proteomikk	9
4.11	Microarray og qPCR analyse av skinn	9
4.12	Statistiske analyser	10
5	Resultater	11
5.1	Fôr	11
5.2	Vekst og fôrutnyttelse	11
5.3	Røntgenevaluering	12
5.3.1	Aske i hel fisk	14
5.3.2	Mineraler og Ca:P ratio i hel fisk	14
5.3.3	Makromineraler og Ca:P ratio i ryggbein	17
5.3.4	Makromineraler og Ca:P ratio i skjell	19
5.3.5	Tungmetaller	20
5.4	Fordøyelighet og utnyttelse av P fra fôr	20
5.5	Fordøyelighet av andre næringsstoffer	22
5.6	Fettfordeling i fisk	23
5.7	Transkripsjon av markører for P opptak og helsestatus i tarm	25
5.8	ALP og TRAP i bein og skjell	28
5.9	Vit D3 metabolitter i plasma og hemoglobin i blod	28
5.9.1	Mineraler i plasma	29
5.10	Proteomikk	30
5.11	Mikroarray og qPCR analyse i skinn	31
6	Diskusjon	33
7	Referanser	39
	Appendixes	

1 Oppsummerende sammendrag

Fosfor (P) er en sterkt begrenset ressurs og bedre utnyttelse av tilgjengelige P ressurser vil være avgjørende for fremtidig vekst i akvakulturproduksjonen. Dette prosjektet hadde som mål å øke verdiskapningen fra marint restråstoff ved å utvikle prosesstekniske løsninger som kan øke tilgjengeligheten av P i fiskebein og bidra til en mer bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser. Marine biprodukter utgjør omtrent 30 % av råstoff grunnlaget i fiskemelsproduksjon, og det er forventet at dette vil øke til 50 % innen 2020 (IFFO 2011).

Basert på syrehydrolyse med H_2SO_4 er det produsert nye marine P ingredienser fra sildeavskjær (hode - og ryggavskjær). P utnyttelsen av de nye ingrediensene ble evaluert i et 13 ukers forsøk med 0+høstsmolt. Syv forsøksfôr ble produsert med utgangspunkt i en Lav P kontroll diett (D1; 0,5 % løselig P). Fiskebeinhydrolysat (FBH) fra sild ble tilsatt i graderte nivåer, 0,7 % (D2), 0,9 % (D3) og 1,1 % (D4). FBH fra kolmule ble tilsatt til et løselig P nivå på 0,9 % (D5). Diett D6 og D7 ble tilsatt et krystallinsk P salt (NaH_2PO_4) til 0,9 % løselig P, og D7 ble i tillegg tilsatt $(NH_4)_2SO_4$ for å teste ut effekter av komponenter tilført under hydrolyse (H_2SO_4) og nøytralisering (NH_3 -løsning) av beinråstoffet. Lav P kontroll (D1) ga signifikant ($P < 0,05$) lavere vekst sammenlignet med FBH kolmule (D5), og ga også lavere vekst enn alle de andre eksperimentelle fôrene. Lav P diett viste lavest P retensjon per kg tilvekst (3,2 g/kg), men var ikke signifikant forskjellig fra de andre diettene ($3,63 \pm 0,37$ g/kg). Utnyttelsen av P fra fôret ble redusert med gradert økt P fra FBH sild (D2, D3, D4), mens P utnyttelsen var lik for de 4 diettene som hadde likt P innhold (D3, D5, D6, D7) uavhengig av P kilde (FBH sild, FBH kolmule og Na-P). Lav P gruppen (D1) hadde lav mineralisering i hel fisk, bein og skjell og viste transkripsjonelle endringer i tarm og beinvev som indikerte P mangel. Fôrgrupper som fikk ekstra tilførsel av P viste nokså like transkripsjonsnivå av mineral opptaksmarkører i tarm, i.e. NaPi reseptor (natrium - fosfat co- transportør), vitamin D reseptor og DMT -1 (toverdig metall transporter 1). Lav P diett viste oppregulering av NaPi i blindsekkene, en markør for P mangel, som ikke ble vist i noen andre fôrgrupper uavhengig av P kilde. Økt P nivå i fôret medførte redusert nivå av alkalisk fosfatase (ALP) -aktivitet i ryggbein, et enzym som er forbundet med mineralisering og beindannelse. I skjell så vi det motsatte, økt P nivå i fôr resulterte i økt ALP aktivitet. Resultatene indikerer at ALP i bein kan brukes som en sensitiv P mangel markør. Det ble ikke funnet signifikante diettforskjeller for tartrat resistent syre fosfatase (TRAPC), og heller ikke for den biologisk aktive vitamin D-metabolitter 25 (OH) D3 og 1,25 (OH) 2D3 i plasma, noe som indikerer at ingen av fôrene var i ekstrem P-mangel. Transkripsjonsprofilen i skinn viste at 196 gener var signifikant oppregulert i fôrgrupper med 0,9 % løselig P fra FBH sild (D3), FBH kolmule (D5) og Na-P, sammenlignet med Lav P kontroll (D1). Resultatene tyder på at skinnvevet var i en mer aktiv og dynamisk status sammenlignet med fisk som fikk lav P diett.

Prosjektet har vist at 90 % av P i sildebein kan frigjøres ved syrehydrolyse (H_2SO_4), og at utnyttelsen av P fra sildeavskjær er like god som for NaH_2PO_4 basert på resultat for vekst, mineralisering og skjelettutvikling i laksesmolt. Basert på løselig P i fôret, er det funnet at 0,7 % løselig P gir full behovsdekning i laksesmolt.

2 Executive summary

On a global scale, fishery byproducts accounts for about 25 % of the raw material for fish meal production, and is expected to increase to 50 % in 2020 (IFFO 2011). Fish have variable ability to digest phosphorus (P) from fish meal (~10 – 80 %), and it may be difficult to predict that adequate P is available for normal growth, skeletal development and health. As P in fish bone is poorly available in Atlantic salmon, the aim of the present study was to develop technological methods to solubilise and make P in fish bones more available, develop P efficient low-pollution feed ingredients for farmed Atlantic salmon, and to test these ingredients in diets for parr and post-smolt.

Marine feed ingredients with high levels of soluble P have been developed from herring by-products (head- and backbone), and evaluated in a 13 week feeding trial with Atlantic salmon 0+smolt. Seven experimental diets with a suboptimal basal P content (D1: 0.5 % soluble P) were produced. Fish bone hydrolysate (FBH) from herring was added to produce diets with 0.7 (D2), 0.9 (D3) and 1.1 (D4) % soluble P. A fifth diet with 0.9 (D5) % soluble P contained a FBH produced from blue whiting. The final two diets, both containing 0.9 % soluble P, were formulated using the commercial inorganic P source NaH_2PO_4 either without (D6) or with (D7) the neutralizing agent $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The control diet (D1) reduced growth significantly ($P < 0.05$) compared to D5 and was lower as compared to all other experimental diets. Fish fed the low P diet showed the lowest P retention per kg gain (3.2 g/kg^{-1}), but was not significantly different from the other diets ($3.63 \pm 0.37 \text{ g/kg}^{-1}$). The utilization of P from the feed was reduced by graded increase in P from FBH herring (D2, D3, D4), while P utilization was similar for the diets supplemented with 0.9 % soluble P (D3, D5, D6, D7), regardless of P source (FBH herring, FBH blue whiting, mono-Na-P). Fish fed D1 developed under-mineralized vertebrae and significant transcriptional changes that indicated P malnutrition. P digestibility and total P retention from the diet (% of P eaten) was significantly highest in fish fed D1 compared to D2-D7. In these P supplemented diets, adequate or excessive amounts of dietary P was indicated, as shown by a steady transcription level of NaPi receptor (natrium-fosfat co-transporter), vitamin D receptor and DMT-1 (Divalent metal transporter 1). Increasing levels of soluble P in the diet correlated with decreasing levels of vertebral alkaline phosphatase (ALP) activity, an enzyme associated with mineralisation. Interestingly, in the scales of the fish this correlation was reversed; an increase in dietary P resulted in an increase in scale ALP activity. The latter possibly indicating an accumulation of (excess) P in scales, which can serve as an internal P reservoir. No significant differences between any of the groups were seen in activity of the macrophage marker tartrate resistant acid phosphatase (TRAP), and between plasma levels of the biological active vitamin D metabolites $25(\text{OH})\text{D}_3$ and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Gene expression profiling performed in skin showed that the P supplemented diets (D3, D5, D6) produced similar changes indicative of a more active and dynamic status of the tissue as compared to fish fed the low P control diet.

In conclusion, the results show that P in fish bones can be solubilized by hydrolysis in a strong acid (H_2SO_4), and that fish bone hydrolysates can provide adequate P for normal growth, mineralisation and skeletal development similar to P from mono Na-phosphate salts in diets of Atlantic salmon smolt. A dietary level of soluble P at 0.7 % covered the P requirement in Atlantic salmon smolt after seawater transfer.

3 Bakgrunn

Fosfor (P) er et mineral som er grunnleggende for alt liv: essensielt for oppbygging av DNA, cellemembraner, proteiner og skjelett; og helt nødvendig for normal vekst og skjelettutvikling i fisk. Fosfor er en begrenset ressurs globalt, det kan ikke produseres eller ødelegges og det er ingen erstatning eller syntetisk versjon av P tilgjengelig. EU har identifisert redusert tilgang på P som en av de største utfordringene for Europa i det 21. århundret og EU Kommisjonen har iverksatt en rekke initiativ for å redusere overforbruk av denne knappe ressursen (<http://www.phosphorus.eu>). Økt effektivisering i bruk av P, samt bedre gjenvinning av P fra avfall og gjødsel er tiltak som kan redusere næringens sårbarhet for redusert P tilgang. Disse tiltakene er også svært viktige for å redusere de negative konsekvensene av P utslipp fra landbruk og akvakulturnæringen. *Målet med dette prosjektet har vært å utvikle nye, fornybare P kilder fra sildeavskjær og bidra til verdiskaping av marint restråstoff på en måte som ivaretar miljø, bærekraft, helse og velferd i oppdrettsfisk.*

Volumet av restråstoff fra pelagisk sektor, oppdrettsfisk og fiskeri utgjør ca. 929.000 tonn (SINTEF 2012), hvorav 326', 247' og 350' er fra henholdsvis hvitfisk, pelagisk fisk og havbrukssektor. Mesteparten av avskjæret anvendes som råstoff i fiskemelproduksjon, til ensilering og dyrehold, men en betydelig mengde av næringsstoffene fra beinfraksjonene blir i liten grad utnyttet i fisk. Dette fordi næringsstoffene i bein foreligger i en kompleks bundet form som gjør dem lite biotilgjengelig. Sildeavskjær utgjør det største volumet av råstoff til norsk fiskemelproduksjon. Sildebein består i hovedsak av aske (50 %), protein (35 %), fett (35 %) og litt karbohydrater. Mer enn halvparten av mineraler i askefraksjonen består av kalsium og fosfor som bygger opp beinstrukturen og foreligger som krystalsalter av hydrokxyapatitt $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ og kalsium fosfat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3$. Disse forbindelsene er stabile, tungt løselige komplekser som er vanskelig å frigjøre i fordøyelsessystemet hos fisk og pattedyr. Nofima har patentert (Aksnes 2002) og seinere utviklet en prosess for separasjon og syrehydrolyse av beinfraksjon for kolmule (Albrektsen, 2009) med fokus på å frigjøre og gjøre fosfor (P) mer tilgjengelig. Det er dokumentert i forsøk med laks at fordøyeligheten av P fra kolmule beinmel kan økes fra 30 til 50 % ved syre-behandling av beinfraksjon (Albrektsen, 2009), og at P frigjort fra kolmulebein gir minst like god effekt på vekst, mineralisering og skjelettutvikling i laks som andre lett løselige Na/K-salter av P (Albrektsen et al., 2010, 2013). Det ble i tillegg observert positive effekter på fordøyelighet av protein, fett og energi, noe som også ga en positiv veksteffekt i laks.

Behovet for P i kaldtvannsfisk er relativt høyt (8 g total P kg^{-1}), NRC, 2011. Fisk har svært varierende evne til å fordøye P fra fiskemel, fra 10 - 80 % (Cho og Bureau 2001), noe som gjør det vanskelig å forutsi om tilstrekkelige mengder P er til stede for normal vekst og utvikling. Total P analysene som brukes til å analysere P i fôr sier lite om hvor stor andel av P som er biotilgjengelig i laks. Mangel på gode metoder som kan si noe om P tilgjengelighet kan være et av hovedproblemene for riktig mineralforsyning i dagens laksefôr. Nofima har utviklet en kjemisk metode som skiller mellom beinbundet og ikke-beinbundet P (Hovde, 2013) der man antar at P som ikke er bundet i fiskebein vil være løselig og lett tilgjengelig for laks. Metoden ble opprinnelig utviklet for å få et mål på hvor stor andel av P som ble løst ut fra fiskebein ved hydrolyse i sterke syrer. Egnetheten av metoden som mål på biologisk tilgjengelig P i laks er belyst i Norsk Fiskeoppdrett (Albrektsen, 2013).

Den sentrale rollen P har i cellene gjør at P balansen i fisk er nøye regulert. Fosfor er et essensielt mineral og særlig viktig for normal skjelettutvikling (Bæverfjord et al., 1998; Sugiura et al., 2004a; Fjelldal et al., 2008), energimetabolisme og vekst hos fisk (Lall, 2002). Opptak og omsetting av P er regulert av hormoner, via transport og absorpsjon i tarm, utskillelse i nyrer og lagring i bein (Vielma

og Lall 1998b). Fisk kan frigjøre P fra skjelettet og også redusere utskillelse fra nyrene for å opprettholde normale fysiologiske funksjoner ved lav P forsyning (Vielma og Lall 1998a). Hydroksylmetabolitter av vit D₃ (1,25(OH)₂D₃ og 24,25(OH)₂D₃) er involvert i reguleringen av kalsium (Ca) og P homeostase i fisk (Vielma og Lall, 1998a). I laks er det vist at sub-optimale P nivå gir forhøyet konsentrasjon av vitamin D metabolittene 1,25(OH)₂D₃ og 25(OH)D₃ (Fjelldal et al., 2012a). Vitamin D kan påvirke både beindannelse og beinresorpsjon gjennom å stimulere aktiviteten til ulike enzymer involvert i disse prosessene, samtidig som det er med på å regulere opptak av P i tarm. Enzymaktivitet av alkalisk fosfatase (ALP) og tartrateresistent syrefosfatase (TRACP) kan brukes som markør for hhv beindannelse og beinresorpsjon. Fjelldal et al. (2012a) viste at P-mangel førte til deformiteter, redusert mineralinnhold, økt ALP aktivitet og redusert TRACP aktivitet i ryggvirvler, samt økt konsentrasjon av 1,25(OH)₂D₃ i plasma fra post-smolt av Atlantisk laks.

Ved introduksjon av nye P kilder vil det være behov for å analysere effekten av den nye ingrediensen mht fordøyelighet og opptak av P i kroppen som mål på effektivitet i P utnyttelse. Reguleringen av mineralopptak i tarmen er kompleks, og tilgjengeligheten av mineraler fra fôr er avhengig av kilden, dvs. hvilke råvarer eller tilsetningsform de finnes i og av fôrets sammensetting. Erstatning av fiskemel med vegetabiliske fôrmidler som inneholder 60–80 % fytinsyre kan eksempelvis hemme opptak av P og andre mineraler (Helland mfl., 2006). På bakgrunn av kompleksitet ved opptak og interaksjoner i opptak mellom ulike mineraler, har det vært viktig å kartlegge mekanismene for opptak av mineraler i tarm for å forstå hvordan dette fungerer hos laks. I Nofima har fiskehelse-gruppen tidligere arbeidet med opptaksmekanismer for zink i tarm, og gjennom dette prosjektet er det inkludert mekanismer for P- opptak. Det er utviklet en større arbeidspakke med markører for opptak av ulike mineraler som vil bli benyttet i dette forsøket. Transkripsjonelle responser i tarmen etter P-mangel har blitt beskrevet for regnbueørret (Sugiura et al., 2004b; Kirchner et al., 2007). Resultatene deres viste at det er mulig å predikere P-mangel før fenotypiske forandringer blir synlige. Vi har vist tilsvarende for zink-mangel (Ytteborg et al., in prep) og temperaturpåvirkninger (Ytteborg et al., 2010).

Det er gjennomført et 12-ukers fôringsforsøk med smolt for å undersøke effektivitet i utnyttelsen av P fra ulike kilder: Fiskebeinhydrolysat fra sild og kolmule og fra et lett løselig kommersielt Na-P salt. Formålet med forsøket var å evaluere effektivitet i P utnyttelse basert på vekst, røntgen, mineralisering, fordøyelighet og retensjon av P i hel fisk. Det er i tillegg gjennomført grunnleggende molekylære studier for å kartlegge effekter på opptaksmarkører for mineraler i tarm og enzymatiske responser i ryggbein og skjell (ALP, TRAP) som markører for P status. I tillegg er det gjennomført et proteomikkstudie for å kartlegge mulige forskjeller på proteinsammensetting i ryggbein, og en microarray screening av skinn for å kartlegge dietteffekter på uttrykk av et bredt spekter av gener av betydning for celle- og vevsfunksjoner. Målet med forsøket var å identifisere eventuelle avvik som induseres når P blir en begrensende faktor og å sammenligne mulige forskjeller i biologiske responser i fisk fôret med ulike P kilder.

4 Materiale og metoder

4.1 Produksjon av fiskebeinhydrolysat

Det ble kjøpt inn frosne blokker à ca 20 kg med frossen hode/rygg av sild fra Norway Pelagic AS, Kaldvågen. Totalt ble det opparbeidet 142,7 kg beinråstoff fra 884 kg sildeavskjær fordelt over 4 dager. Råstoffet ble tint (15 °C), separert fysisk på en beinseparator og vasket 2 ganger i kaldt vann for å fjerne bløttvev og blod før syrehydrolyse. Fiskebein og vann ble blandet porsjonsvis (1:5) i plasttønner, tilsatt syre (5 % H₂SO₄) og hydrolysert i 15 t for å frigjøre mineraler fra hydroksylapatitt. Vannfraksjonen ble separert manuelt fra fast stoff over sil, og den faste fasen ble vasket 2 ganger med kaldt vann for å få med alt frigjort P. Vannfraksjonen ble titrert til pH = 2.8 med 25 % ammoniakkløsning og satt til henstand over natt. Fettlokket på toppen ble fjernet, og klar væske ble pumpet over i en kjøkkenkoker, oppvarmet til 90 °C (5 min.) og separert over Jesmasikt (80 µm duk). Vannfraksjonen ble oppkonsentrert på inndamper til 33 % Brix og spraytørket (Niro Atomizer, Denmark). Det ble produsert 20 kg tørket fiskebeinhydrolysat (FBH), tilstrekkelig til å bli testet som alternativ P kilde på 3 graderte nivå i forsøk med laksesmolt. Som referanse i forsøket ble det produsert 6 kg av et tilsvarende fiskebeinhydrolysat fra et beinmel av kolmule som tidligere har vært testet med godt resultat i forsøk med laks. Fiskebeinhydrolysat fra sild og fra kolmule inneholdt likt P; 10,4 % total P og 9,1 % løselig P, på nivå med en tidligere produksjon med kolmulebein.

4.2 Fôrproduksjon

Nofima har produsert syv eksperimentelle fôr à 140 kg med utgangspunkt i en lav P kontrolldiett (D1: 0,5 % løselig P), 3 dietter med gradert økt P fra sildebeinhydrolysat (FBH sild; D2; D3 og D4), kolmulebeinhydrolysat (FBH Km; D5), og to positive P kontrolldietter (D6, D7) tilsatt NaH₂PO₄ som P kilde der D7 også var tilsatt (NH₄)₂SO₄ for å vurdere effekt av nøytraliseringsmiddelet (Tabell 1). Diettene var formulert slik at D1 ga P underdekning, D2 – D4 tilførte gradert økt P fra FBH sild, mens diett D3, D5, D6 og D7 skulle inneholde P nær P behov basert på antagelse om at behovet kunne være litt økt i laksesmolt rett etter sjøutsett (Fjelldal et al., 2009).

Tabell 1 Total P og løselig P i eksperimentelle dietter

Fôr	Lav P		FBH sild		FBH Km	NaH ₂ PO ₄	
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Beregnet P							
Løselig P, %	0,5	0,7	0,9	1,1	0,9	0,9	0,9
Analysert P							
Total P, %	0,80	1,03	1,23	1,44	1,21	1,17	1,16
Løselig P, %	0,46	0,69	0,98*	1,13	0,93	0,87	0,91

Blandelistene for de 7 eksperimentelle fôrene er gitt i Appendix A1. Basisfôret (D1) inneholdt 30 % fiskemel (Referanse fiskemel 29/10) produsert fra 100 % NVG sild (Karmsund fiskemelfabrikk). Fiskemelet inneholdt 1,69 % total P og 1,03 % løselig P. Det ble brukt en praktisk fôrformulering med 15 % SPC og 5 % maisgluten, foruten 7 -8 % hvete gluten og med hvetemel som binder siden hvete

inneholder lavt P nivå ($< 0,25$ % løselig P) sammenlignet med andre planteproteinråvarer. Fôrene er formulert basert på analysert innhold av løselig P i ingredienser, og P behovet i fisk er også evaluert ut fra innhold av løselig P (ikke beinbundet P). Diettene ble balansert for Lys og Thre for å dekke vekstbehovet i lakseyngel. Fôrene ble produsert ved Nofima's Fôrteknologisenter (Titlestad, Bergen). Fôrblandingene ble prekondisjonert i en kaskadeblander av type atmospheric double differential cylinder (DDC; Wenger Manufacturing Inc., Sabetha, KS, USA) før ekstrudering på en Wenger TX-52, co-roterende, dobbeltskrueekstruder med dysestørrelse 4.5 mm i diameter. Ekstrudatene ble tørket i en varmlufts karuseltørke (Model 200.2, Paul Klöckner GmbH, Nistertal, Germany) og fettpåsprutet i en vacuumcoater (VC 60ltr, Dinnissen BV, Sevenum, The Netherlands).

4.3 Fiskeforsøk

0-årsmolt (*Salmo salar*) ble innhentet fra Aakvik Settefisk (ST/b0008 (Marine Harvest) og fraktet til Nofimas havbruksstasjon på Austevoll (60°05'N, 05°16'E). Fisken ble fôret med et kommersielt fôr (3,5 mm Biomar Intro 75) i akklimatiseringsperioden på 60 dager. Deretter ble fisken fôret i 14 dager på en lav P diett (0,46 % løselig P) produsert av Nofima (4,5 mm, kontroll Lav P diett) som også inngikk som basisdiett i forsøket. Laksen (snittvekt 213 ± 2 g) ble sultet i to dager og tilfeldig fordelt i 21 2.0x2.0x0.9 m glassfibertanker ($3,2 \text{ m}^3$), hver med 60 fisk. Fisken ble foret med en av de syv forsøksdiettene i triplikate kar i en foringsperiode på 91 dager. Alle tanker var utstyrt for kontinuerlig overvåking av fôr. Fisken ble fôret til appetitt med fôrautomater, og daglige fôrrasjoner ble justert i henhold til antatt fiskebiomasse og fôrinntak. Fisken ble fôret to ganger om dagen (0500 - 0800 og 1400 - 1500) basert på intervallfôring av 20 sekunders varighet intervenert ved 200 sekund pause, 7 dager i uken. Ikke spist fôr ble samlet opp kontinuerlig (Hølland Technology AS, Sandnes, Norge), tørket (40 °C i 24 timer) og veid for korrigert beregning av daglig spist fôr og for å justere daglige fôrrasjoner til 10 % i overskudd av fiskens appetitt.

Alle kar var utstyrt med rennende sjøvann pumpet opp fra 50 meters dyp, innløpsvann inn i tanken ble oppvarmet til stabil temperatur med varmeveksler og temperaturen ble registrert daglig. Den gjennomsnittlige temperatur var $9,1 \pm 1,0$ °C under forsøket, vannets saltinnhold holdt seg stabil på $31 - 32 \text{ g L}^{-1}$, vannmengden ble justert til omtrent 80 L min^{-1} , oksygen innholdet i utløpsvann var høyere enn $7,5 \text{ mg/L}$ (85 % metning) i hele forsøksperioden. Fisken ble eksponert for kontinuerlig 24 t lys i løpet av forsøksperioden på 91 fôringsdager.

Vekt og lengde ble registrert i individuelle fisk fra hver tank ved starten og slutten av forsøket. Fisken ble fôret helt fram til uttaket, og det ble tatt ut 5 fisk per kar (fisk nr. 1 - 5) for hel kropp analyse av mineraler og for beregning av P retensjon i hel fisk. Fra hvert kar ble det også tatt ut samleprøver av feces ved manuell stryking (30 - 40 g våtvekt) for analyse av tilsynelatende fordøyelighet av protein, fett, energi og P i fisk fra alle fôrgrupper. Ytterligere 5 fisk (fisk nr. 6 - 10) ble samlet inn for registrering av vekt, lengde, sløyd vekt og levervekt og for beregning av kondisjonsfaktor (K-faktor), hepatosomatiske indeks (HSI) og slaktesvinn (% DOP). Fra den samme fisken ble det tatt samleprøver av skjell, lever og ryggvirvler for analyse av aske og mineraler, plasma vitamin D3 -metabolitter, fett og tørrstoff innhold ($n = 5$). Prøvefisken ble bedøvet med benzocaine ($25 \mu\text{g kg}^{-1}$) og drept ved et slag på hodet etter uttak av blod fra vena caudalis i 5 ml heparaniserte sprøyter (5000 IE heparin). Blodprøvene ble holdt i kjøleskap (4 °C), blod Hgb ble registrert og det ble deretter laget samleprøver av plasma (200 mL fra hver fisk, $n=5$ per kar) etter sentrifugering ved 4000 rpm i 6 min, før plasma ble frosset i flytende N. Et definert segment av ryggraden mellom bakre del av ryggfinne og fremre del av bukfinne ble dissekert ut, homogenisert, frysetørket og analysert for aske og mineraler

(samleprøver av 5 fisk per kar). Ryggvirvlene ble manuelt rensset etter disseksjon og skrubbet med en hard børste for å fjerne blod og bløtvev og standardisert ved å kutte de neurale og haemale buer i nærheten av feste til ryggbein. Ryggbein i segmentet rett under ryggbein ble også tatt ut og rensset på samme måte, men umiddelbart frosset på flytende N for seinere analyse av enzymer i ryggbein (ALP og TRAP). Skjell fra et definert område i bakre del av fisken ble samlet opp ved å skrape forsiktig i det ytterste skjelllaget med en kniv. Samleprøver av skjell (n= 5) ble frosset direkte på flytende N uten noen form for behandling eller rensing for seinere enzymanalyse (ALP, TRAP).

4.4 Røntgenevaluering

Utvikling av beinstrukturene ble undersøkt ved hjelp av røntgen. Fisken ble røntgenfotografert ved Nofimas røntgenlaboratorium på Sunndalsøra. Opsettet var semi-digitalt, med en mammografi røntgenkilde (MS Giotto, Bologna, Italia) og med bruk av flergangs bildeplater med mammografi-oppløsning. Ved startuttaket ble det tatt ut 13 fisk til røntgenfotografering, mens det ved avslutning av forsøket ble tatt ut 15 fisk pr kar (45 fisk per diett) til røntgenfotografering. Bildene ble avlest og overført til datamaskinen i en plateleser (FCR Profect, Fuji Medical Inc., Japan). Bildene ble automatisk behandlet før lagring, med justering av lyshet og kontrast, utjevning av eksponering og framheving av kanter (Fuji CR Console software, Fuji Medical Inc., Japan). De digitale bildene ble evaluert visuelt, og avvik i beinstrukturene ble registrert og klassifisert i en blind bedømmelse.

4.5 Kjemiske analyser

Kjemiske analyser ble utført i duplikat ved et akkreditert laboratorium (BioLab, Nofima). Tørrstoff (ISO 6496-1983) og aske (ISO 5984-1978) i fôr og vevsprøver ble bestemt gravimetrisk etter tørking i 4 timer ved 105 °C og etter forbrenning for 16 timer ved 450 °C, henholdsvis. Råprotein (N x 6,25) i fôr og feces ble bestemt ved Kjeldal-metoden (ISO 5983-1979), mens fettinnhold i fôr og feces ble bestemt ved henholdsvis syrehydrolyse («EU-fett»), (Commission Directive 98/64/EC, Part B), og ved Folch metode med syrehydrolyse (SSF-rapport: A-102, 1978). Yttrium ble bestemt ved induktivt koblet plasma -atom-emisjonsspektroskopi (ISO 11885-1996).

Total P i ingredienser og fôr ble bestemt spektrofotometrisk (430nm) etter forasking og syreoppslutning i 6 M HCL (ISO 6491-1998). Løselig P ble bestemt ved spektrofotometriske metode etter inkubering av en definert prøvemengde (0.8 g) i 80 mL 1 N NaOH i 16 t som opprinnelig beskrevet av Ruban et al. (2001) og Hua et al. (2005), og seinere modifisert og validert av Hovde (2013). Vannløselig NaOH ekstrahert P (ikke beinbundet, løselig P) ble forasket og syreoppsluttet etter samme metode som for total P og skiller seg kun i det første ekstraksjonstrinnet.

Frysetørkede prøver av hel fisk og av et definert segment av ryggraden tatt ut mellom bakre del av ryggfinnen og fremre del av gattfinnen ble analysert for elementene *P, Ca, Mg, Na, K, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Sr, Mo, Ag, Cd, Sn, Ba, Hg og Pb* ved hjelp av multielement bestemmelse med induktivt koblet plasma-massespektrofotometri (ICP-MS) etter oppslutning i mikrobølgeovn. I korte trekk, den innveide prøvemengde tilsettes konsentrert salpetersyre og hydrogenperoksid og oppsluttes i mikrobølgeovn. Bestemmelsen av elementene gjøres med kvantitativ ICP-MS. Prøveløsning forstøves og føres inn i oppvarmet argongass (plasma, ca 7000 grader). I plasma fordamper løsemiddelet og elementene ioniseres. Ionene føres videre fram til en massesensitiv detektor der valgte masser

detekteres som antall treff/sekund. Elementkonsentrasjonene beregnes ved hjelp av ekstern standardkurve.

4.6 Fordøyelighet

Yttrium, Kjeldahl-N-, fett, energi og P ble bestemt i eksperimentelle fôr og i samleprøver av feces fra hver tank (n = 3 per gruppe). Etoksikvin (400 mg ETQ kg⁻¹-DM (tørrstoff) ble tilsatt som stabilisator og blandingen ble umiddelbart frosset og lagret ved -30 °C. Samleprøvene ble frysetørket (platetemperatur 24 °C) og homogenisert før analyse. Tilsynelatende fordøyelighet av protein, fett, energi og P ble beregnet basert på følgende formel:

$$AD = 100 - 100 \times \frac{Y_d \times CX_f}{CX_d \times Y_f}$$

der d er diett, f er feces, Y er yttrium og CX er næringsstoffer i dietten.

4.7 Real time qPCR

Det ble gjort studier av genuttrykk for kjente mineral opptaksmarkører i tarm. Fra hver fôr-gruppe fra begge uttak ble fortarmen brukt til transkripsjonsanalyser. Fra hvert individ ble RNA isolert (Micro to Midi Kit[®], Invitrogen) og cDNA syntetisert (Taqman Gold RT-PCR kit, Applied Biosystems). 2 grupper gener ble inkludert i transkripsjonsanalysene, markører for opptak av mineraler i tarm (MTa, MTb, ZIP11, ZnT4, NaPi, MEP1, VitDr, NRAMP, SLC41a2, DMT1 og TRMP7) og markører for helsestatus og integritet i tarm (col1a1, elastin, laminin, hsp70, Il1b og IGF). Real time qPCR ble utført med SYBR Green på en Light cycler 480 (Roche, Switzerland) på følgende program: 95°C i 10min, deretter 45 sykler på 95°C i 15s, 60±1°C i 15s og 72°C i 15s. Referansegenene som ble brukt var elongeringsfaktor ef1a og 18s. Rådata ble analysert statistisk ved hjelp av REST (Pfaffl et al., 2002).

4.8 ALP og TRAP i bein og skjell

Prøver av et segment av ryggraden foran under ryggfinnen ble rensset manuelt for nyre-, muskel- og nervevev ved uttaket og frosset i flytende N₂. Frosne prøver ble knust til et pulver i en morter og ca 300 mg ble veid inn og løst i saltløsning (9 g/L NaCl) og videre homogenisert med en stavmikser (Polytron PT2100). Fra dette homogenatet ble det overført 100 µl til 1 ml ALP buffer (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.2 CaCl₂, 0.1 mM ZnCl₂, 25 mM glycine, 10 mM para-nitrophenylphosphate, pH 10.2) og 100 µl til 1 ml TRACP buffer (0.1 M NaCH₃COO, 20 mM C₄H₄KNaO₆·4H₂O, 10 mM para-nitrophenylphosphate, pH 5.3). Disse reaksjonsblandinger ble plassert i en risteinkubator ved 25 °C i én time og deretter stoppet med ved å tilsette 500 µl NaOH (1 M). Prøveløsningene ble sentrifugert (12000 g, 10 min) og fargeutviklingen målt ved 405 nm (Labsystems iEMS Reader MF[®], Helsinki, Finland) med triplikate avlesninger per prøve. Skjell (100 mg/ml) prøver ble sonikert (UP100H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) i saltløsning (9 g/L NaCl) og overført til ALP og TRACP buffer som beskrevet ovenfor.

4.9 Vit D3 metabolitter i plasma

Vitamin D metabolittene, 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25OHD₂D₃) ble analysert vha væskechromatografi og tandem massespektroskopi som beskrevet i Fjelldal et al (2009). I korte trekk, 1 ml plasma ble ekstrahert vha fastfase ekstraksjon (Isolute_MFC18 SPE) og eluert med heptan:2-propanol (93:7), fordampet under N₂ og rekonstituert i 200 µl methanol:1 M ammoniumacetate:vann (500:2:500) før injeksjon på væskechromatografisystemet. En ekstern kalibreringskurve ble brukt for å kvantifisere prøvene.

4.10 Proteomikk

9 virvler fra fôrgruppene kontrolldiett mangel (diett 1) og kolmule hydrolysat (diett 5) ble analysert ved 2DE-basert proteomikk. Proteiner ble isolert ved hjelp av Trizol® (Invitrogen, USA) av ryggsøyler som var pulverisert ved knusing med morter i flytende nitrogen. Proteinfraksjonen etter trizol isoleringen ble videre løst i prøvebuffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 1 % DTT, 0,5 % IPG buffer pH 3-10), og proteinkonsentrasjoner målt ved 750 nm (RC DC protein Assay, Bio-Rad, USA). 50 µg protein isolert fra hver fisk ble merket med CyDye DIGE Fluor fargestoffer (GE Healthcare, USA) i henhold til produsentens protokoll, og hver prøve ble merket med Cy3 og Cy5 som tekniske replikater og kjørt på separate geler. I tillegg ble en prøve bestående av protein fra alle fiskene, merket med Cy2 inkludert på hver gel som intern standard. De forskjellig merkede prøvene ble applisert på IPG strips (24cm, 5-8 pH) og rehydrert over natt, før isoelektisk fokusering ble utført ved hjelp av en Ettan IPG phorII (Amersham Bioscience, Sverige). Proteinene ble videre separert i 2-dimensjon (2-DE) på 12,5 % SDS-PAGE. Gelene ble skannet med Ettan DIGE Imager (GE Healthcare) og analysert ved Progenesis SameSpots v 4.1 for spot deteksjon og alignment. Forskjeller i proteinmønster mellom de to fôrgruppe ble videre identifisert statistisk ved ANOVA. Relevante proteiner ble deretter kuttet ut av 2-DE preparative geler, og behandlet med trypsin før avsalting og oppkonsentrering på små kolonner av C18 Empore Disks (3M, USA). Peptider ble eluert med 0,8 mL matriksløsning (α-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (Daltonics, Tyskland) mettet i en 1:1-oppløsning av ACN og 0,1 % TFA) og pipetterte direkte på en MALDI-TOF plate. En Ultraflex MALDI-TOF/TOF massespektrometer med en LIFT-modul (Daltonics) ble brukt for peptidmasse analyser. FlexAnalysis (versjon 3.3, Daltonics) ble brukt til å lage lister over peptidtoppene, og BioTools (versjon 3.2, Daltonics) ble brukt for tolkning av MS og MS / MS spektra. Proteinene ble identifisert ved hjelp av peptidmasse fingerprinting ved hjelp av databaser og søkeprogrammet MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

4.11 Microarray og qPCR analyse av skinn

For å analysere videre hvordan de ulike diettene påvirket skinnkvalitet, isolerte vi RNA fra en bit av fiskeskinn. Skinnbiten ble homogenisert i TRIzol (Invitrogen) og RNA ekstrahert med PureLink RNA Mini kit (Invitrogen). Konsentrasjon av total RNA (Nanodrop 1000 Spectrometer) og RNA integritet (Agilent 2100 Bioanalyzer) ble målt. Transkriptomanalysene ble utført ved hjelp av Nofima's 15k SIQ6 microarray for laks produsert av Agilent Technologies. Tofargedesign ble brukt- en felles referanse med Cy5 og testprøver med Cy3. RNA amplifisering og merking ble utført med Low Input Fast Amp Merkingsskit og Gene Expression Hybridiseringskit, alt i henhold til produsentens anbefalinger (Agilent Technologies). Prøvene ble vasket med Gene Expression Wash buffer 2x og skannet med en GenePix 4100A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). GenePix Pro -programvare (versjon 6.1) ble brukt for primær databehandling og Nofimas bioinformatikkpakke (STARS, Krasnov et al., 2011a) ble brukt for

videre bearbeiding av data. Gener med endret uttrykk i vev ble valgt basert på forskjeller relativt til kontrollen: fold endring $> 1,5$ og $p < 0,05$ (t - test). Microarray analyse ble gjennomført i skinn fra 4 testgrupper: Lav P kontroll (D1), høy P kontroll (D6), FBH sild (D3) og FBH kolmule (D5), der diett D3, D5 og D6 hadde likt innhold av løselig P i fôret.

4.12 Statistiske analyser

Biologiske data ble statistisk evaluert basert på ANOVA-one way analyse av varians (ANOVA) med STATISTICA software (Ver 7.1, Statsoft, Tulsa, OK, USA). Signifikante forskjeller mellom dietter ble testet ved hjelp av Tukey HSD post-hoc test (Sokal og Rohlf, 1981) med sannsynlighet $P < 0,05$ som signifikansgrense. Pearson korrelasjon og Spearmans rank korrelasjonsanalyse ble videre brukt til å undersøke mulige sammenhenger mellom fôr variabler (P nivå og P kilde) og diettresponser.

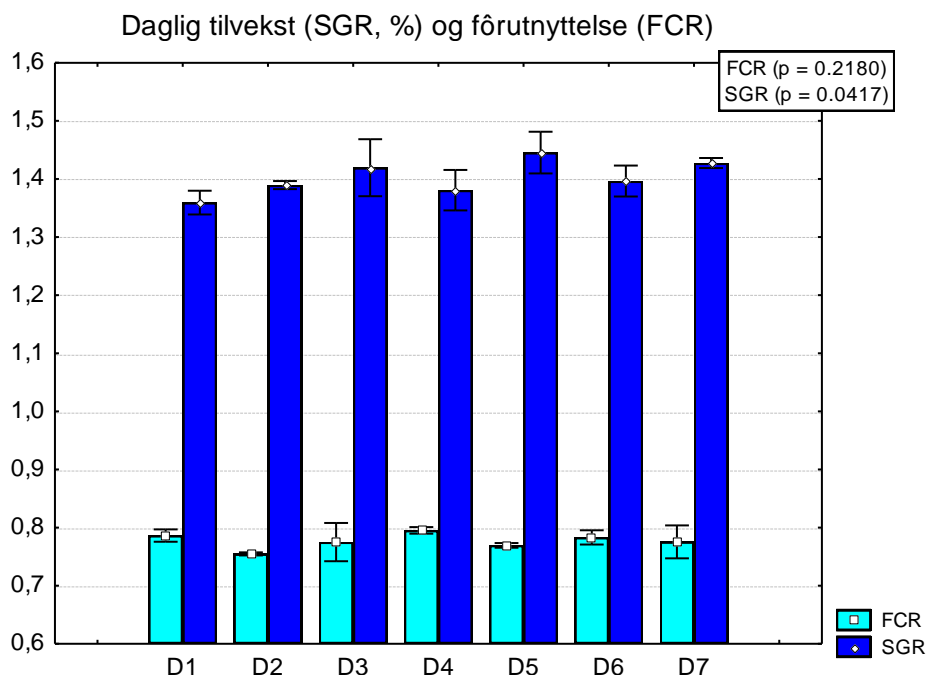
5 Resultater

5.1 Fôr

Forsøksdiettene var like med hensyn til kjemisk sammensetting og energiinnhold (Appendiks A2) og inneholdt i gjennomsnitt 439 g kg^{-1} protein, 291 g kg^{-1} fett og $23,2 \text{ KJ g}^{-1}$ total energi (korrigert til 94 % tørrstoff). Diettene viste gradert økte innhold av total P og løselig P med økende tilsetning av FBH fra sild. Nivået av løselig P i diett D3, D5, D6 og D7 var henholdsvis 0.98, 0.93, 0.87, og 0.91 %, dvs. litt høyere enn forventet for FBH sild (D2). Proteininnholdet i diett D2, D3 og D4 er korrigert for N bidrag fra NH_3 løsningen brukt til å justere pH etter syrehydrolyse. Det ble registrert pH senkning med økende FBH tilsetning fra sild, og en tilsvarende pH senkning ved tilsetning av FBH fra kolmule.

5.2 Vekst og fôrutnyttelse

Det ble oppnådd en nær firedobling av vekten i forsøksperioden, med sluttvekter som varierte fra 737 g (Lav P kontroll) til 793 g (FBH kolmule), Appendiks A3. Daglig tilvekst (SGR) var gjennomsnittlig $1.40 \pm 0.04 \%$ og TGC var gjennomsnittlig 3.76 ± 0.12 for alle fôrgrupper. Det ble funnet signifikante forskjeller i tilvekst, der lav P kontroll (D1) ga lavest tilvekst, men forskjellen var signifikant bare i forhold til diett D5, dvs. FBH kolmule ($p < 0,05$), Figur 1. FBH sild tenderte til å gi gradert bedre vekst for lav (D2) og middels (D3) P tilsetning, men ikke for høy (D4) P tilsetning. Diettene som tilførte like mengde løselig P fra FBH sild (D3), FBH kolmule (D5) og NaH_2PO_4 med (D7) og uten (D6) tilsetning av nøytraliseringsmiddel ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), ga lik vekst ($P > 0,05$), Appendiks A3, Figur 1.



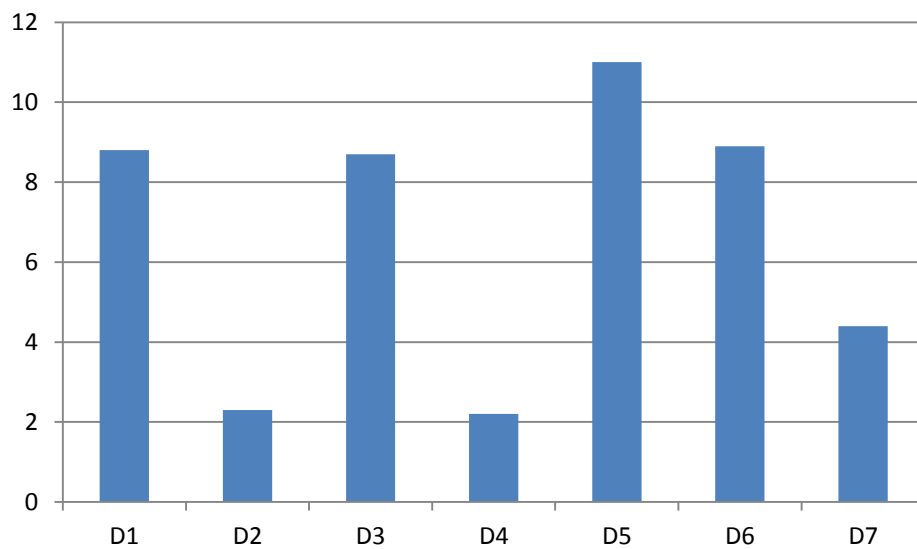
Figur 1 Daglig tilvekst (SGR, %) og fôrutnyttelse (FCR) i laks etter en fôringsperiode på 12 uker

Det ble ikke påvist diettvariasjon i dødelighet, og totalt ble det registrert kun 4 døde enkeltfisk i hele fôringsperioden fra 4 ulike kar og fôrgrupper. Det ble heller ikke registrert noen diettforskjeller i

fôrinntak ($p > 0.05$) eller fôrutnyttelse ($p > 0.05$), men fisk fôret med FBH sild (D2) og FBH kolmule (D5) var de to fôrgruppene som viste best fôrutnyttelse (Tabell 3, Figur 1).

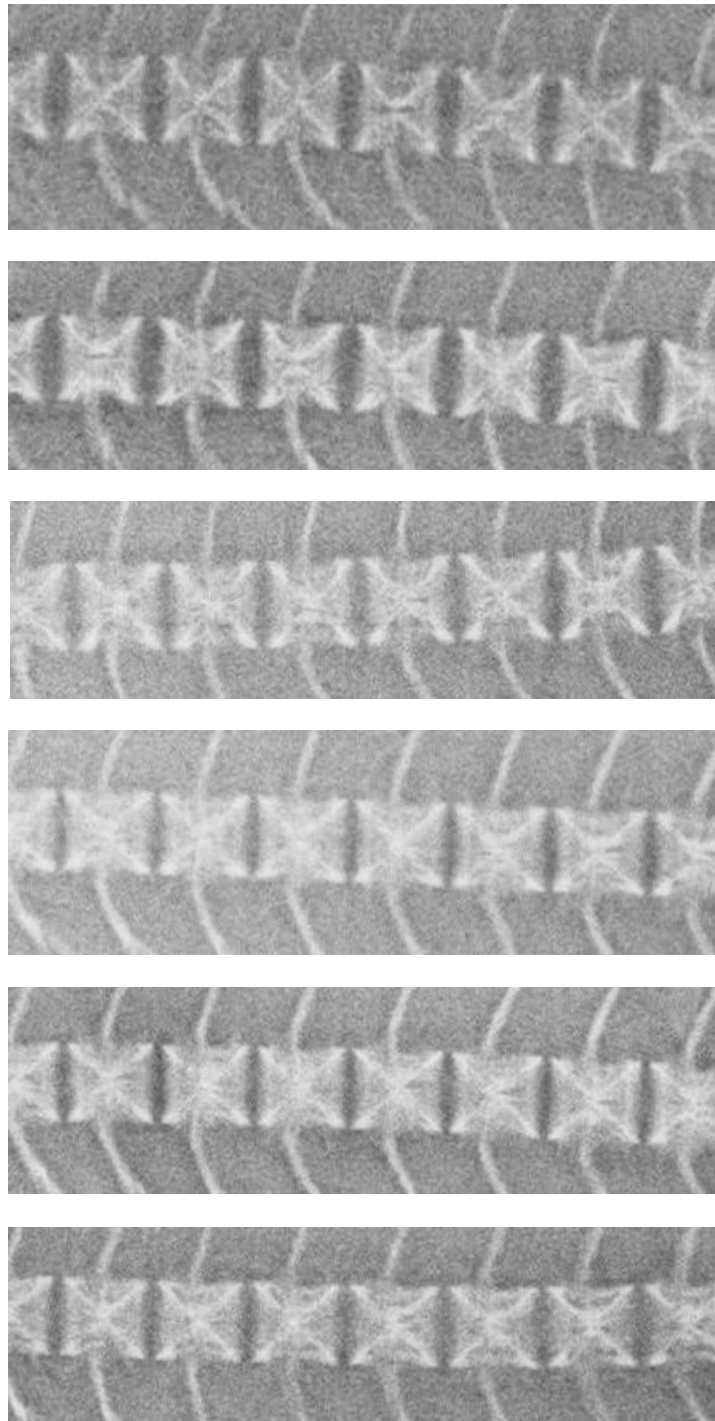
5.3 Røntgenevaluering

I dette materialet var det i hovedsak sikre forandringer i form av fusjoner og fusjonsrelaterte avvik som ble klassifisert, foruten morfologiske avvik som ga indikasjoner på nedsatt mineralisering. Ingen feil ble identifisert i fisk ved startuttaket. Innslaget av fisk med sikre avvik i virvler ved avslutning av forsøket varierte i gjennomsnitt mellom 2 og 11 % for de ulike fôrgruppene, Figur 2. Gjennomsnittlig antall affiserte virvler hos fisk med feil var lavt og varierte fra 2 til 4. Røntgenevalueringen indikerer at de ulike diettene gav relativt få og små feil når det gjaldt fusjonsrelaterte avvik.



Figur 2 Fusjoner og fusjonsrelaterte avvik i fisk etter en fôringsperiode på 12 uker. Diettene langs x-aksen, % fisk med avvik langs y-aksen

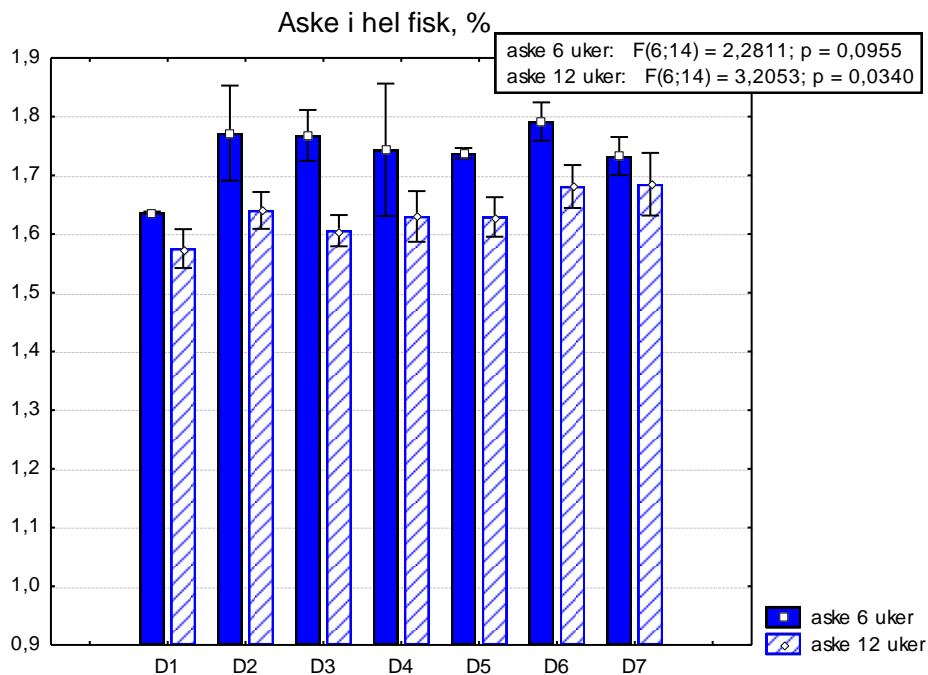
Det ble funnet indikasjoner på nedsatt mineralisering i fôrgruppe Lav P kontroll (Figur 3), men det ble ikke funnet fisk med tegn til undermineralisering i noen av de andre fôrgruppene. De morfologiske avvikene som viste nedsatt mineralisering i fôrgruppe Lav P kontroll (D1) var relativt små, men ble klassifisert i 33 % av fisken. Omtrent 1/3 av denne fisken viste helt sikre tegn på nedsatt mineralisering. Til tross for at de morfologiske avvikene for mange fisk i fôrgruppe D1 var små, var de likevel tydelige nok til å indikere en forskjell i mineralisering mellom Lav P diett og de andre fôrgruppene.



Figur 3 Utvalgte røntgenbilder av fisk fra Lav P kontroll D1 (0,49 % løselig P) som viser indikasjoner på nedsatt mineralisering etter en fôringsperiode på 12 uker

5.3.1 Aske i hel fisk

Askeinnholdet i hel fisk var lavest i Lav P kontroll diett (D1) ved både mellomuttak (6 uker) og ved sluttuttak (12 uker), og fisk fôret med Lav P diett hadde henholdsvis 6.9 og 4.3 % mindre aske enn gjennomsnittet for alle de andre fôrgruppene ved mellom og sluttuttak (Tabell 2). Til tross for at forskjellene mellom diettene var minst etter 12 uker, så ble det påvist signifikante diettforskjeller for lav P diett (D1) relativt til begge Na- P diettene (D6 og D7) kun ved sluttuttaket, Tabell 3, Figur 4. Etter 6 uker ble det påvist nær signifikant forskjell ($p = 0,06$) mellom lav P diett (D1) og FBH kolmule (D5), noe som reflekterte forskjellen i vekst mellom disse to fôrgrupper, Tabell 2.



Figur 4 Aske (% vv) i hel fisk i fôrgruppe D1 – D7 etter 6 og 12 ukers fôring

5.3.2 Mineraler og Ca:P ratio i hel fisk

Alle resultat for aske og makromineraler i hel fisk ved mellom – og sluttuttak er presentert i Appendiks A4 som gjennomsnitt for hver diett. De viktigste resultat og diettforskjeller knyttet til P nivå eller P kilde er beskrevet for utvalgte mineraler i dette kapittel. Nivå av makromineralene Ca og P, samt Ca:P ratio ved mellom- og sluttuttak er gitt i figur 5, 6 og 7.

Det ble funnet signifikante diettforskjeller i hel fisk Ca og P status ved mellomuttaket etter 6 uker for enkelte dietter ($p < 0,05$) men ikke ved sluttuttaket etter 12 uker ($p > 0,05$), Figur 5 og 6. Lav P diett gruppen (D1) viste gjennomgående lavest mineralstatus ved begge uttak (Appendiks A4) og hadde henholdsvis 23 og 13,6 % mindre Ca og P enn gjennomsnittet for de andre fôrgruppene ved mellomuttaket, og 12 og 6 % lavere Ca og P status ved sluttuttaket. Ved mellomuttaket var Ca (og Mg) lav i FBH kolmule (D5), noe som ga en lav Ca:P ratio på nivå med Lav P kontroll (mulig kareffekt), Figur 7. Ved avslutning av forsøket var det fisk fôret med FBH sild (D3) og Na-P (D6) som hadde lavest mineralstatus (Ca, P, Mn, Sr) og som viste størst likhet med resultat for Lav P kontroll (D1), men det ble ikke påvist signifikante diettforskjeller ($p > 0,05$).

Aske Ca, P, Mg og Ca:P ratio viste en sterk positiv korrelasjon ($p < 0.05$) og mikromineralene Mn, Ba og Sr korrelerte også sterkt til aske og makromineraler i hel fisk ved begge uttak ($p > 0.05$).

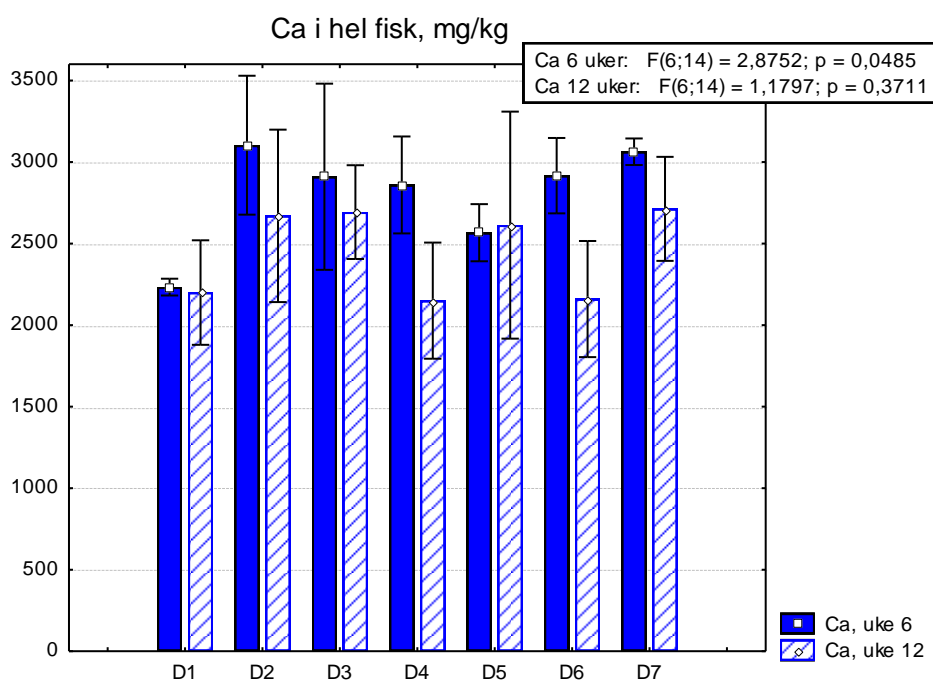
Mg i hel fisk var henholdsvis 350 og 341 mg/kg ved mellom- og sluttuttak, Mn var 1,77 og 1,40 mg/kg og Zn (Figur 8) var 43 og 34 mg/kg, og ingen av disse elementer viste diettforskjeller ($p > 0,05$). Mn i hel fisk i lav P diett var 19 % lavere enn gjennomsnittet for de andre gruppene ved mellomuttaket.

Tabell 2 Aske (%) i hel fisk gitt som gjennomsnitt for hver diett

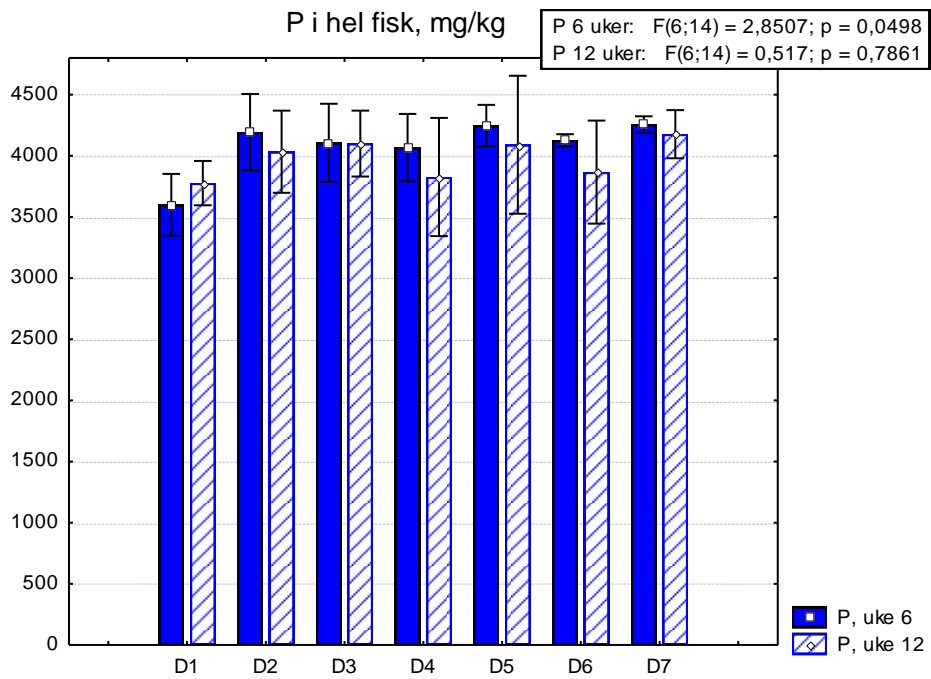
Fôr		Aske i hel fisk, %	
		6 uker	12 uker
Lav P diett	D1	1,64	1,58a
FBH Si 1	D2	1,77	1,64ab
FBH Si 2	D3	1,77	1,61ab
FBH Si 3	D4	1,74	1,63ab
FBH Km	D5	1,74	1,63ab
Na-P	D6	1,79 ¹	1,68b
Na-P/NH4-S	D7	1,73	1,69b
ANOVA oneway $P < 0,05$		0,10	0,05

¹ $N=0.06$; $D1 \neq D6$

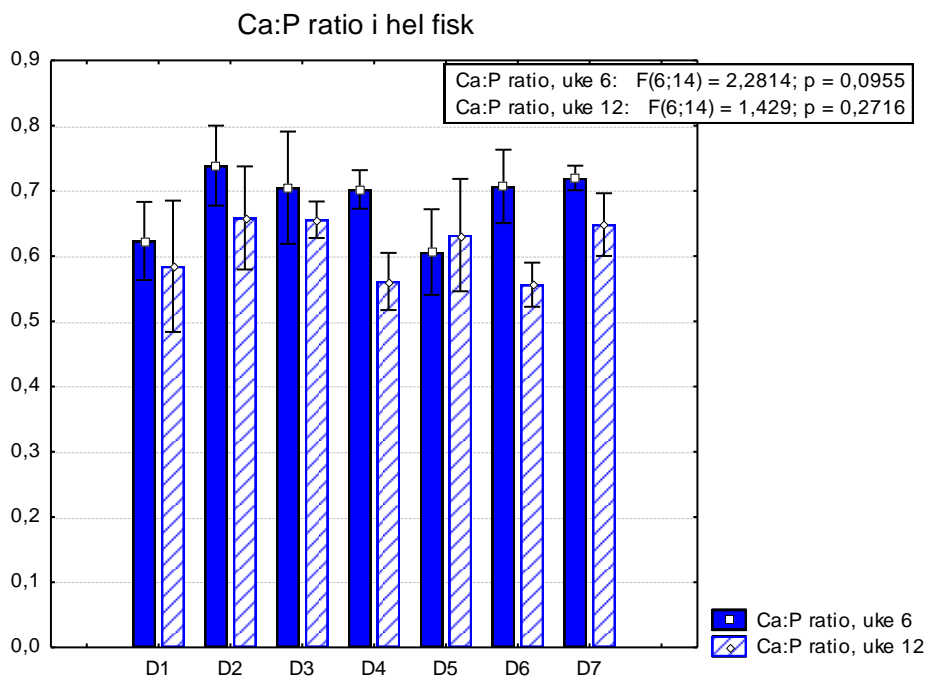
Ca:P ratio i hel fisk var gjennomsnittlig 0,69 etter 6 uker og 0,61 etter 12 uker for alle fôrgrupper, og lavest i fôrgruppe D1 ved begge uttak ($p > 0,05$), Figur 7. Reduksjonen i Ca:P ratio skyldes i hovedsak en reduksjon i Ca nivå med økende fiskestørrelse, mens P status i hel fisk holdt seg relativt konstant.



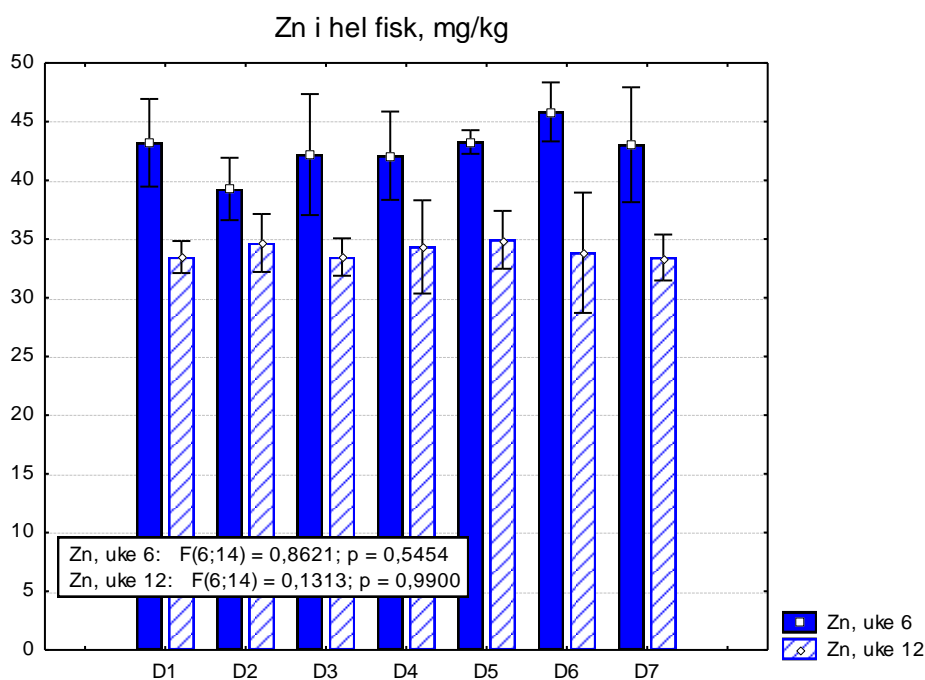
Figur 5 Ca (% vv) i hel fisk ved mellomuttak (uke 6) og sluttuttak (uke 12)



Figur 6 P (% vv) i hel fisk ved mellomuttak (uke 6) og sluttuttak (uke 12)



Figur 7 Ca:P ratio i hel fisk ved mellomuttak (uke 6) og sluttuttak (uke 12)



Figur 8 Zn (mg/kg) i hel fisk ved mellomuttak (uke 6) og sluttuttak (uke 12)

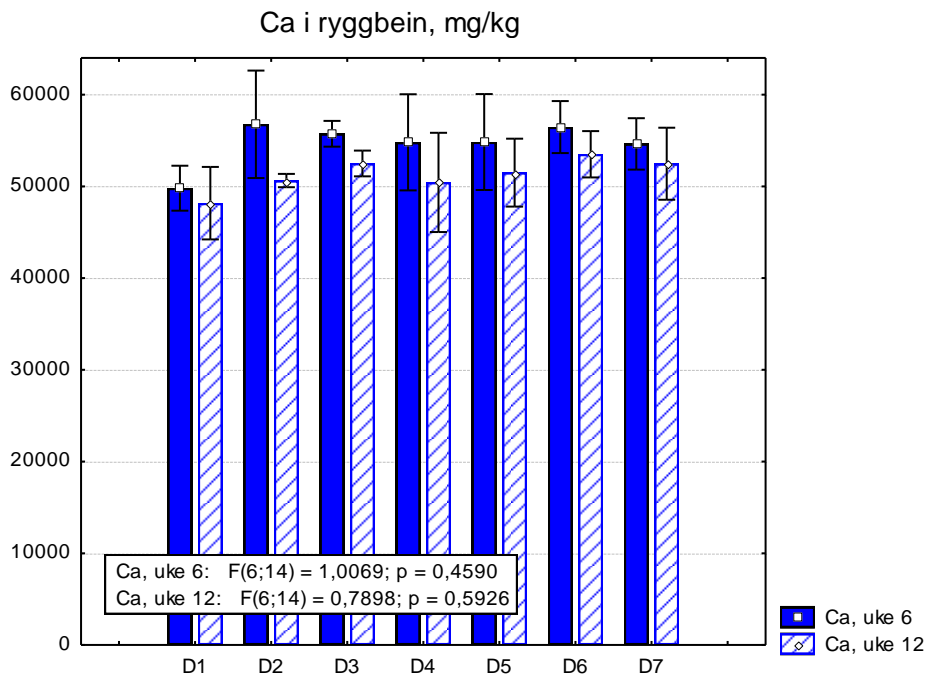
5.3.3 Makromineraler og Ca:P ratio i ryggbein

Alle resultat for makromineraler i ryggbein ved mellom – og sluttuttak er gitt i Appendix A5, mens de viktigste resultat og diettforskjeller knyttet til P nivå eller P kilde er beskrevet i dette kapittel. Nivå av makromineralene Ca og P, samt Ca:P ratio ved mellom- og sluttuttak er gitt i figur 9, 10 og 11.

Det ble ikke påvist signifikante diettforskjeller i makro og mikromineraler i ryggbein ved mellom- og sluttuttak ($p > 0,05$). Fisk fra Lav P kontroll diett viste gjennomgående lavest mineralisering – med gjennomsnittlig 9.2 og 10, 3 % lavere nivå av makromineraler ved mellom- og sluttuttak ($p > 0,05$).

Ca:P ratio i ryggbein var gjennomsnittlig 1,96 etter 6 uker og 1,67 etter 12 uker for alle fôrgrupper (Figur 11), og viste ingen diettforskjeller i respons til ulike P nivå eller P kilder ($p > 0,05$). Reduksjonen i Ca:P ratio skyldes i hovedsak en svak reduksjon i Ca nivå (Fig. 9), samtidig som P nivået økte (Fig 10).

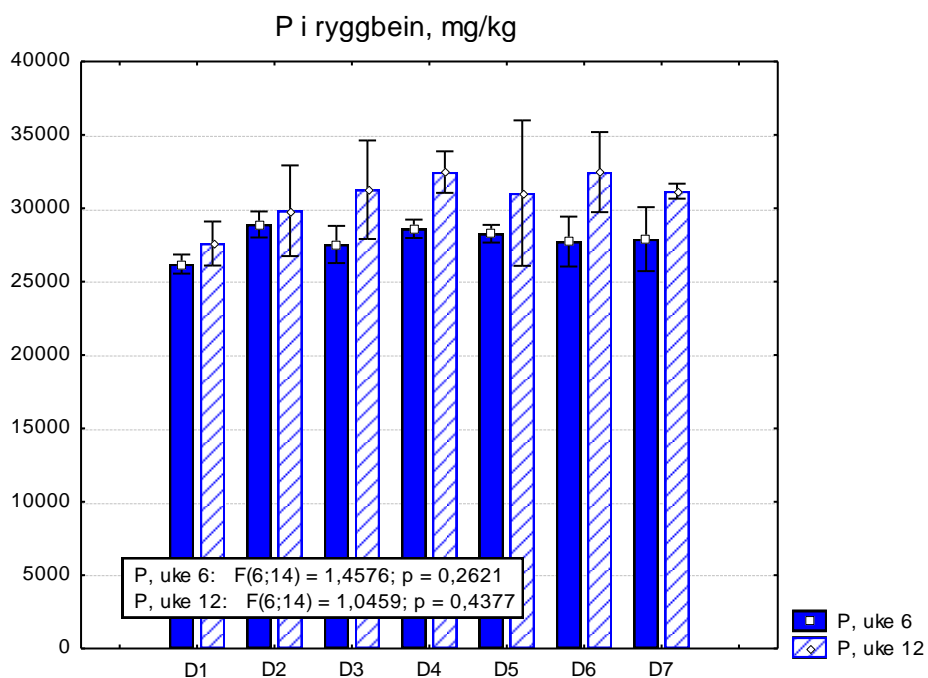
Mg i ryggbein var henholdsvis 719 og 684 mg/kg ved mellom- og sluttuttak, Mn var 18.2 og 19.7 mg/kg og Zn var 63,2 og 63,9 mg/kg, og ingen av disse elementer viste diettforskjeller ($p > 0,05$).



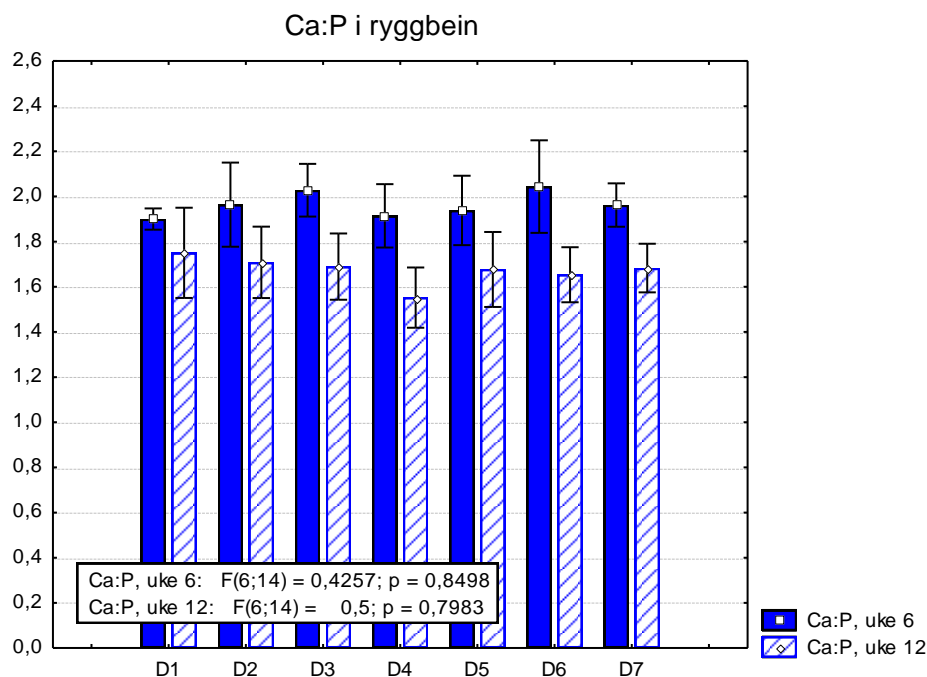
Figur 9 Ca (% vv) i ryggbein ved mellomuttak (uke 6) og sluttuttak (uke 12)

Tungmetaller

Nivåene av Cd (< 0,07 mg/kg), Hg (< 0,05 mg/kg) og Pb (< 0,02 mg/kg) i ryggbein etter 12 ukers føring var lave og viste ingen diettforskjeller ($p > 0,05$). Pb i bein var positivt korrelert til flere makro og mikromineraler i ryggbein ved mellomuttaket og var det tungmetallet som sterkest reflekterte variasjoner i mineralisering ($p < 0,05$). As nivåene i ryggbein var også lave (< 0,40 mg/kg) og viste ingen diettforskjeller relativt til P nivå eller P kilder ($p > 0,05$).



Figur 10 P (mg/kg) i ryggbein ved mellomuttak (uke 6) og sluttuttak (uke 12)



Figur 11 Ca:P ratio i ryggbein ved mellomuttak (uke 6) og sluttuttak (uke 12)

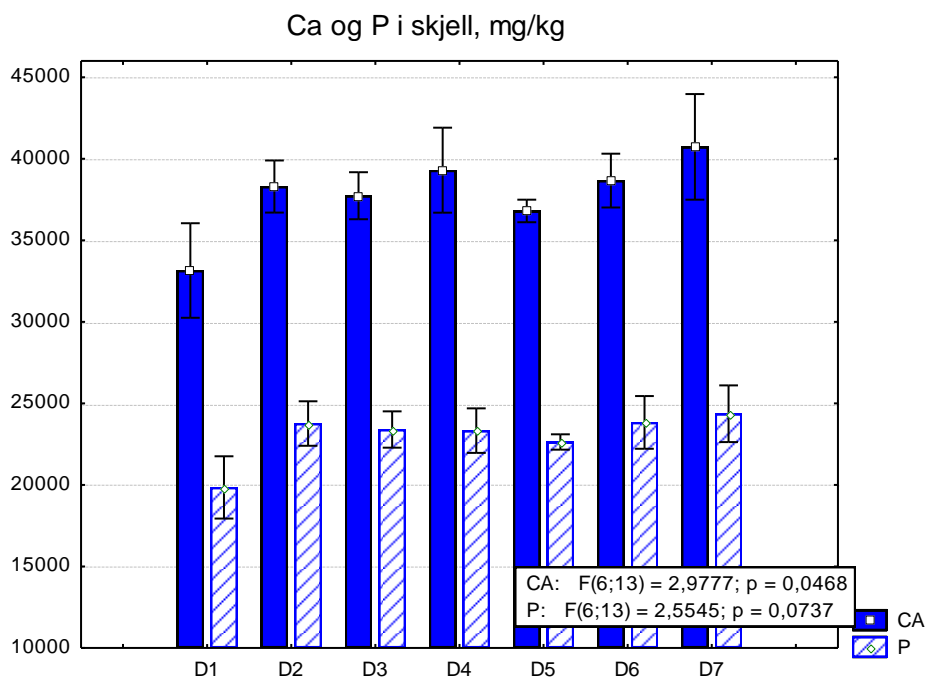
5.3.4 Makromineraler og Ca:P ratio i skjell

Alle resultat for makromineraler i skjell ved sluttuttak er gitt i Appendix A6, mens de viktigste resultat og diettforskjeller knyttet til P nivå eller P kilde er beskrevet i dette kapittel. Nivå av makromineralene Ca og P i skjell er vist i figur 12.

Ca, P og Mg i skjell var 14 – 16 % lavere i Lav P kontroll (D1) sammenlignet med gjennomsnittet for de andre diettene, og det ble påvist signifikante diettforskjeller i Ca og P relativt til diett D7 ($p < 0,05$) og nær signifikante forskjeller relativt til flere av de andre fôrgruppene (Appendiks A6). Mg i skjell var signifikant lavere i lav P kontroll (D1) sammenlignet med FBH kolmule (D4), $p < 0,05$ (Tukey Posthoc).

Ca:P ratio i skjell var gjennomsnittlig 1,64 etter 12 ukers fôring for alle fôrgrupper (Appendiks A6), og var høyest i fôrgruppene D1, D4 og D7 som også hadde høyest relativt Ca nivå. Det ble ikke påvist signifikante diettforskjeller i respons til ulike P nivå eller P kilder for Ca:P ratio ($p > 0,05$).

Mn, Fe, Co, Cu og Zn i skjell var henholdsvis 20.9, 104.3, 0.06, 0.67 og 50.5 mg/kg, og ingen av disse elementene viste diettforskjeller relativt til ulike P nivå og P kilder ($p > 0.05$).



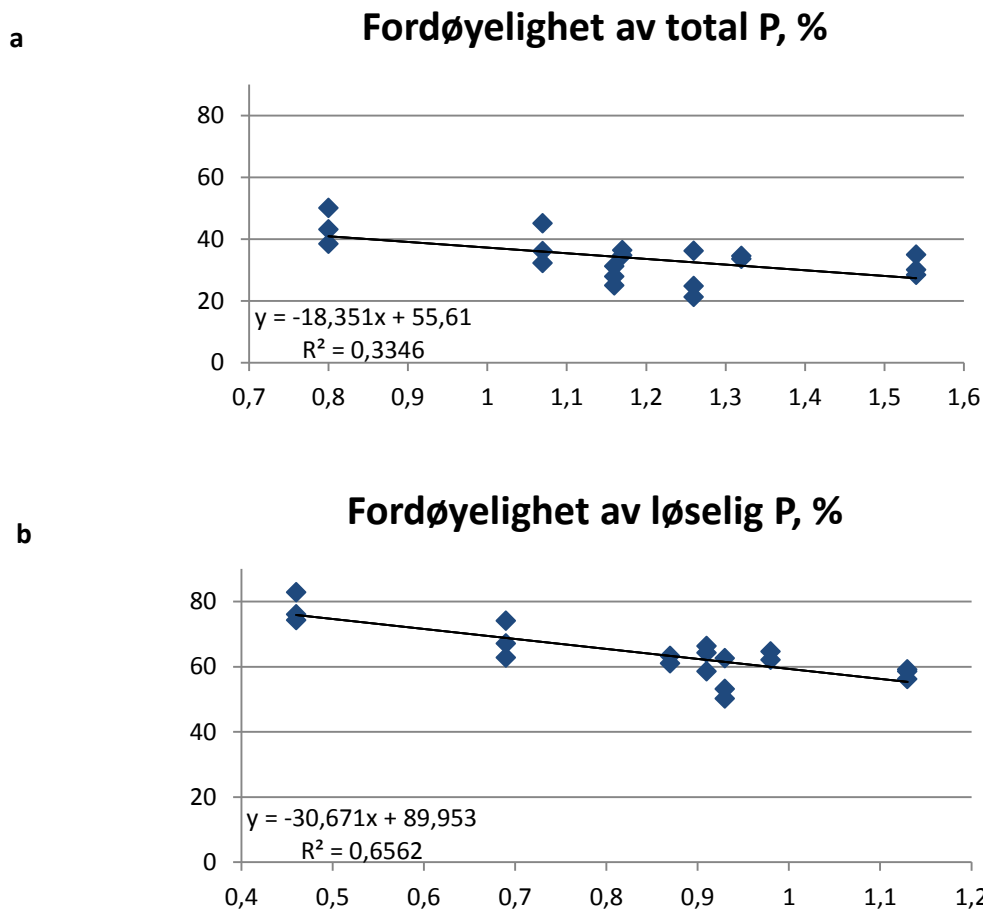
Figur 12 Ca og P i skjell ved sluttuttak

5.3.5 Tungmetaller

Cd og Pb i skjell var under deteksjonsgrense i de fleste kar, mens Hg nivå i skjell var lavt (< 0.006) i alle fôrgrupper og viste ikke diettforskjeller ($p > 0.05$).

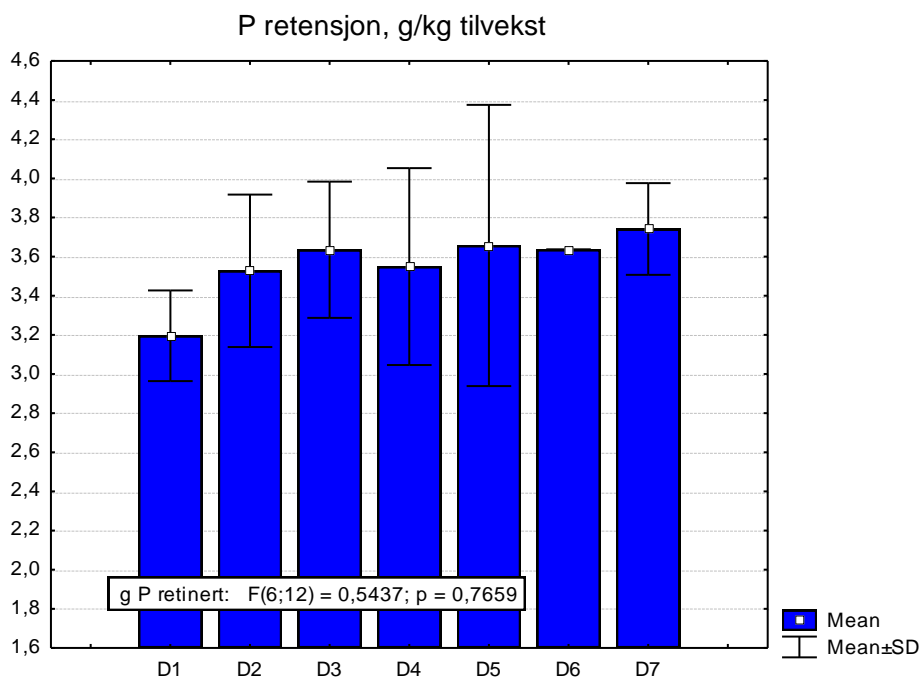
5.4 Fordøyelighet og utnyttelse av P fra fôr

Fordøyeligheten av P var høyest for Lav P diett og ble redusert med økende P innhold i fôret både for total P (Figur 13a) og løselig P (Figur 13b), Appendiks A7. Korrelasjonen var best for løselig P ($p < 0,05$). Grunnet noe variasjon i fordøyelighetsverdier, er det fjernet 2 enkeltverdier – dette ble gjort likt for total P og løselig P. Fordøyeligheten av total P varierte i hovedsak mellom 30 og 50 % (Fig 13a), mens fordøyeligheten av løselig P i de samme fôrene varierte fra 60 til 80 % (Fig 13b).

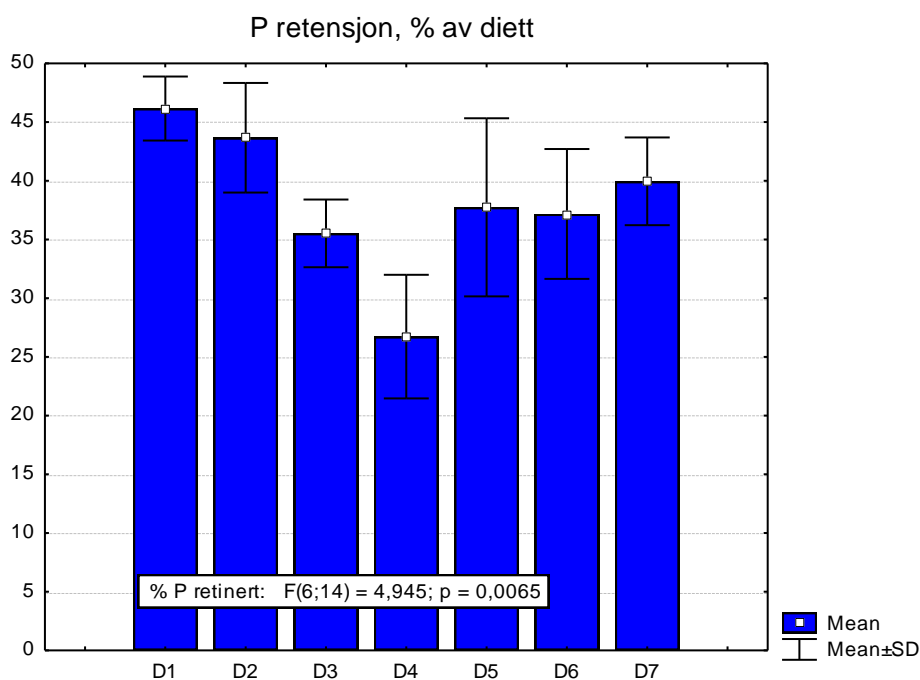


Figur 13 Fordøyelighet av a) Total P og b) Løselig P relativt til total P og løselig P i forsøksfôr

Fosforutnyttelsen er beregnet som P retensjon per kg tilvekst (Fig 14), og som P retensjon i % av P for de ulike fôrene (Fig 15), Appendiks A7. Diett D4 og D5 viste stor karvariasjon, og et kar for hver av disse fôrgruppene er fjernet fordi de viste ulogisk lave P verdier. Lav P diett viste lavest P retensjon per kg tilvekst (3,2 g/kg), men var ikke signifikant forskjellig fra de andre diettene (3,63 ± 0,37 g/kg), $p > 0,05$. Lav P diett viste mest effektiv utnyttelsen av P fra fôret (46,2 %), signifikant høyere enn FBH kolmule (D4), som også var forskjellig fra D2 og D7 ($p < 0,05$), Fig. 15. Utnyttelsen av P fra fôret ble redusert med gradert økt P fra FBH sild (D2, D3, D4), mens P utnyttelsen var lik for de 4 diettene som hadde likt P innhold (D3, D5, D6, D7), uavhengig av P kilde (FBH sild, FBH kolmule og Na-P), $p > 0,05$.



Figur 14 P retensjon (g P retinert/kg tilvekst) i laks beregnet for hele forsøksperioden



Figur 15 P retensjon (% P retinert fra diett) i laks beregnet for hele forsøksperioden

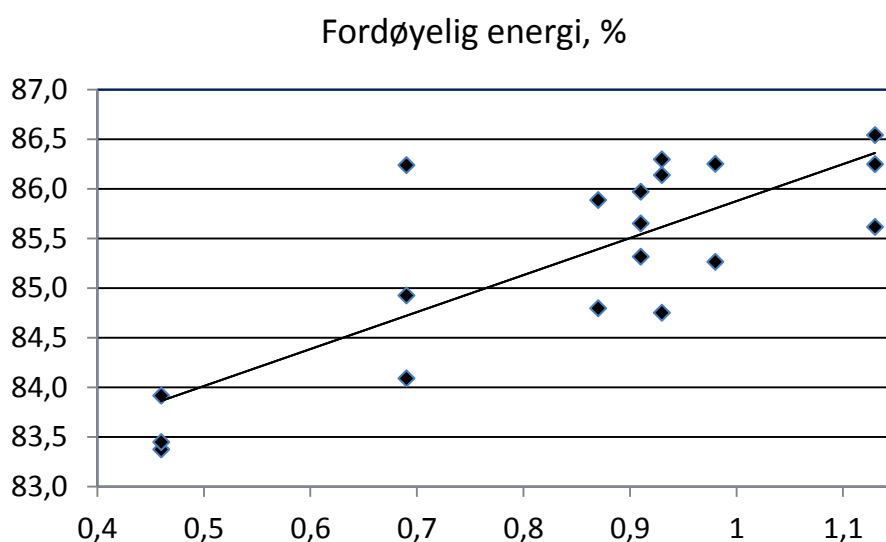
5.5 Fordøyelighet av andre næringsstoffer

Fisk fôret med Lav P kontroll (D1) hadde lavest fordøyelighet av protein, fett og energi, men det ble funnet signifikante diettforskjeller kun for energi fordøyelighet ($p < 0,05$), Tabell 3. Fordøyelig energi korrelerte sterkt til løselig P nivå i fôret ($p < 0,05$), uavhengig av P kilde (Fig. 16). Fordøyeligheten av energi og fett viste en positiv korrelasjon ($p < 0,05$) og var høyest i diett D4, D5 og D7, Tabell 3.

Tabell 3 Fordøyelighet av næringsstoffer i laks etter 12 ukers fôring

Fôr	Lav P	FBH sild			FBH Km	NaH ₂ PO ₄		ANOVA p <
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	
Fordøyelighet, %								
Protein	88,9	89,1	89,1	89,4	89,3	89,5	89,5	ns
Fett	93,2	93,8	93,3	94,6	94,1	93,4	93,9	0,10
Energi	83,6 ^a	85,1 ^{ab}	85,1 ^{ab}	86,1 ^b	85,7 ^{ab}	85,3 ^{ab}	85,6 ^{ab}	0,05

¹; p = 0,06 og 0,07 for diett D5 og D7 relativt til D1.



Figur 16 Energifordøyelighet (%) og løselig P (%) viser en signifikant korrelasjon ($r = 0.80$, $p < 0.05$)

Fordøyeligheten av mikromineralene Fe, Mn og Co viste stor variasjon og ingen klare diettforskjeller relativt til diett P nivå eller P kilder (data er ikke vist). Fordøyeligheten av Zn og Cu viste mindre diettvariasjon ($p > 0.05$) og var gjennomsnittlig 26,6 og 22,6 % ($p > 0,05$). Fordøyeligheten av Ca og Mg var negativ og indikerte opptak av disse mineraler fra sjø. Ca og Mg opptaket var lavest i Lav P gruppen og synes å øke mer effektivt med økende diettnivå P fra FBH sild og kolmule enn fra Na-P.

5.6 Fettfordeling i fisk

Prøvefisk tatt ut ved mellomuttak og ved slutt var med få unntak lik mht vekt, lengde, sløyd vekt, levervekt, HSI, og K-faktor. Slaktesvinn (DOP, %) var høyest i Lav P diett ved mellomuttaket, men ikke ved sluttuttaket ($p > 0,05$), mens K-faktor var høyest i lav P diett ved sluttuttak. Forsøksforene synes å gi små forskjeller for prøvefisk i dette forsøket.

Det var et mål i forsøket å se på fettfordeling som funksjon av diett P nivå. Fettinnhold i hel fisk, muskel og lever ved mellomuttak (6 uker) og sluttuttak (12 uker) viser små diettvariasjoner, Tabell 4. Ved mellomuttaket var fettinnholdet i lever og muskel lavest for Lav P diett, men ved sluttuttaket hadde disse forskjellene jevnet seg ut og det ble ikke påvist forskjeller i fettfordeling som funksjon av

diett P nivå eller ulike P kilder ($p > 0,05$). Innvollsfettet ble ikke analysert, men mesteparten av kroppens fettreserver vil foreligge som visceralt fett.

Tabell 4 Fett (%) i hel fisk, muskel og lever

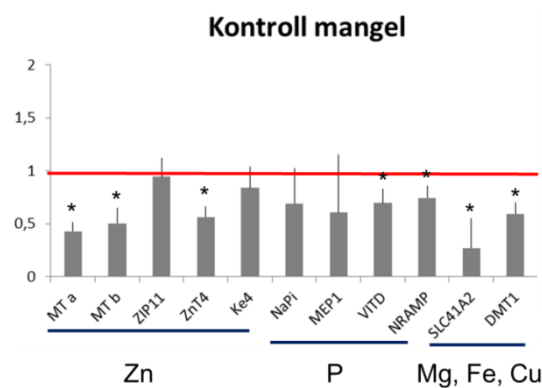
Fôr	Lav P	FBH sild			FBH Km	NaH ₂ PO ₄		ANOVA p <
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	
Fett i hel fisk, %								
6 uker	13,8	13,7	13,9	13,8	13,8	14,0	13,7	ns
12 uker	16,5	17,0	17,8*	17,3	16,6	17,2	16,8	0,06
Fett i muskel, %								
6 uker	4,03	4,20	4,67	4,43	4,40	4,70	4,30	ns
12 uker	4,17	4,13	4,80	4,17	4,77	4,43	4,67	ns
Fett i lever, %								
6 uker	6,23	6,57	6,53	6,57	7,27	8,13	6,57	ns
12 uker	6,83	6,50	6,50	7,10	6,77	7,07	6,40	ns

5.7 Transkripsjon av markører for P opptak og helsestatus i tarm

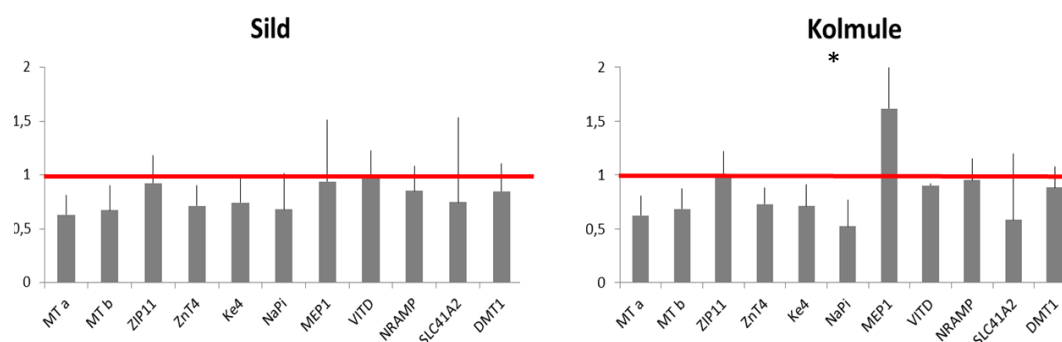
Fôrgruppene som ble valgt ut til analyse av molekylære markører for mineralopptak i tarm var lav P kontroll diett (D1), FBH Sild (D3), FBH kolmule (D5) og positiv Na-P kontroll (D6).

Mellomuttak

Diett 1 hadde jevnt over nedregulerte markører, Figur 17. Nedreguleringen inkluderte gener for zink, fosfor, magnesium, jern og kobber. Dette kan tyde på at ved liten tilgang på P vil flere opptaksmekanismer bli påvirket. Dette kan igjen komme av at transporterne tar opp flere typer mineraler (eks. DMT1) eller at P mangel påvirker andre prosesser som igjen er involvert i et bredere opptaksspekter (eks. VitD reseptoren). Diett 1 ga oss en god profil på hvordan transkripsjonsprofilen så ut i fisk som hadde fått underdekning av P.



Figur 17 Resultater fra real time qPCR i tarm fra Lav P kontroll diett (D1). Rød linje indikerer normalnivå i positiv Na-P kontroll (D6). Det ble funnet signifikante nedreguleringer for mange opptaksmarkører i D1. Signifikante transkripsjonsreguleringer er vist med *.

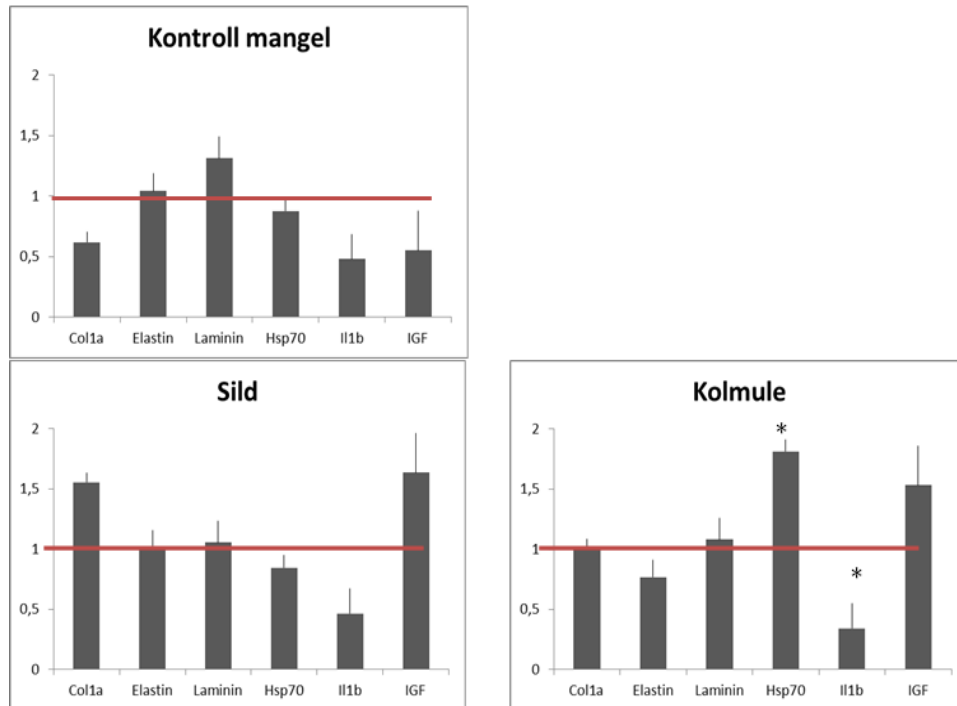


Figur 18 Resultater fra real time qPCR i tarm fra FBH sild (D3) og FBH kolmule (D5). Rød linje indikerer normalnivå i positiv Na-P kontroll (D6). Det ble funnet kun en signifikant oppregulering for MEP1 i D5. Signifikante transkripsjonsreguleringer er vist med *.

I FBH sild og kolmule fant vi kun små endringer relativt til positiv kontroll (D6), Figur 18. Det ble observert tendens til nedregulering som for Lav P kontroll (D1), men ingen av genene var signifikant nedregulert. Det eneste genet som var signifikant oppregulert var MEP1 i FBH kolmule (D5). Dette

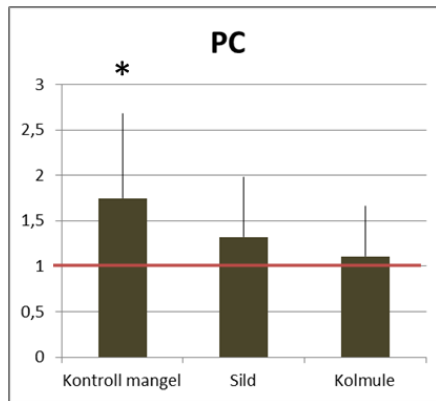
genet er i tillegg til å være involvert i P opptak, også med på å opprettholde tarmepitelets børstekant. At denne var oppregulert i FBH kolmule kan tyde på avvik i tarmcellene til denne gruppen.

Vi valgte å undersøke noen flere kjente markører involvert i tarmens integritet. I Lav P kontroll (D1) fant vi ingen signifikante reguleringer, Fig. 19. I FBH kolmule fant vi at hsp70 (en kjent markør for stress) og Il1b (involvert i immunologisk responser) var henholdsvis signifikant oppregulert (Hsp70) eller nedregulert (Il1b). For FBH sild fant vi ingen signifikante endringer for disse genmarkører.



Figur 19 Resultater fra real time qPCR i Lav P kontroll diett (D1)FBH sild (D3) ogFBH kolmule (D5). Rød linje indikerer normalnivå i positiv Na-P kontroll (D6). Signifikante transkripsjonsreguleringer er vist med *.

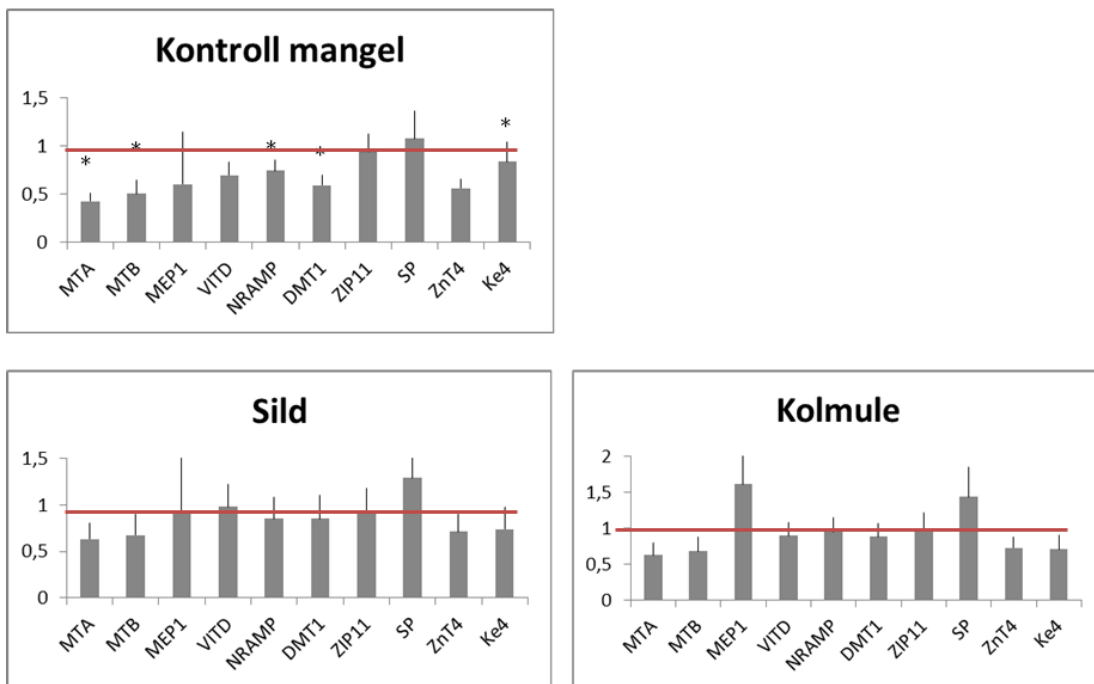
Fra mellomuttaket analyserte vi også pyloric caeca (PC, blindsekkene) for transkripsjon av genen NaPi. Denne var signifikant oppregulert i Lav P kontroll (D1), men ikke regulert verken for FBH sild eller FBH kolmule, Fig. 20. NaPi er en kjent markør for P opptak og det har tidligere vært vist at ved P mangel kan denne bli oppregulert.



Figur 20 Resultater fra real time qPCR av NaPi pyloric caeca fra Lav P kontroll diett (D1), FBH sild (D3) og FBH kolmule (D5). Rød linje indikerer normalnivå i positiv Na-P kontroll (D6). Signifikante transkripsjonsreguleringer er vist med *.

Sluttuttak

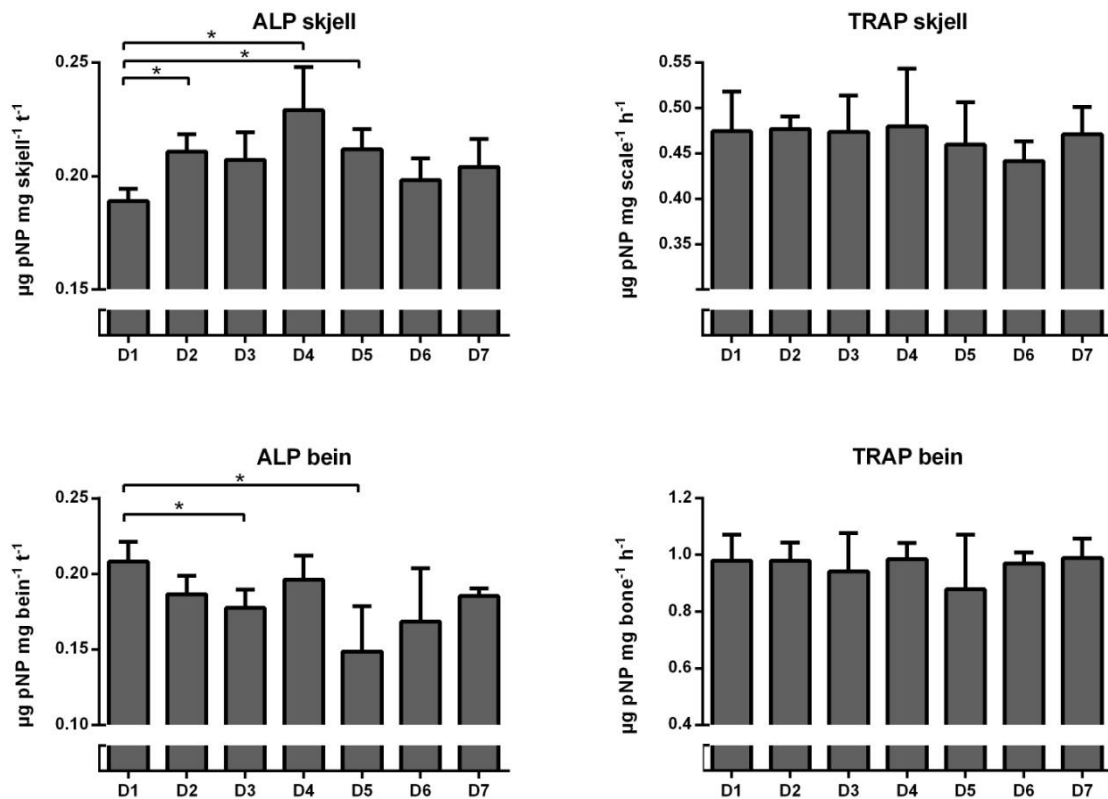
Ved sluttuttaket ble det funnet tilsvarende resultater som ved mellomuttaket. I lav P kontroll diett (D1) var det mange signifikante nedreguleringer i transkripsjonsprofilen (MTA, MTB, NRAMP, DMT1, Ke4), mens det ikke ble funnet nedregulering for mineral opptaksmarkører i FBH fra sild eller kolmule relativt til positiv Na-P kontroll, (Figur 21).



Figur 21 Resultater fra real time qPCR i midtarm fra Lav P kontroll diett (D1), FBH sild (D3) og FBH kolmule (D5). Rød linje indikerer normalnivå i positiv Na-P kontroll diett (D6). Signifikante transkripsjonsreguleringer er vist med *.

5.8 ALP og TRAP i bein og skjell

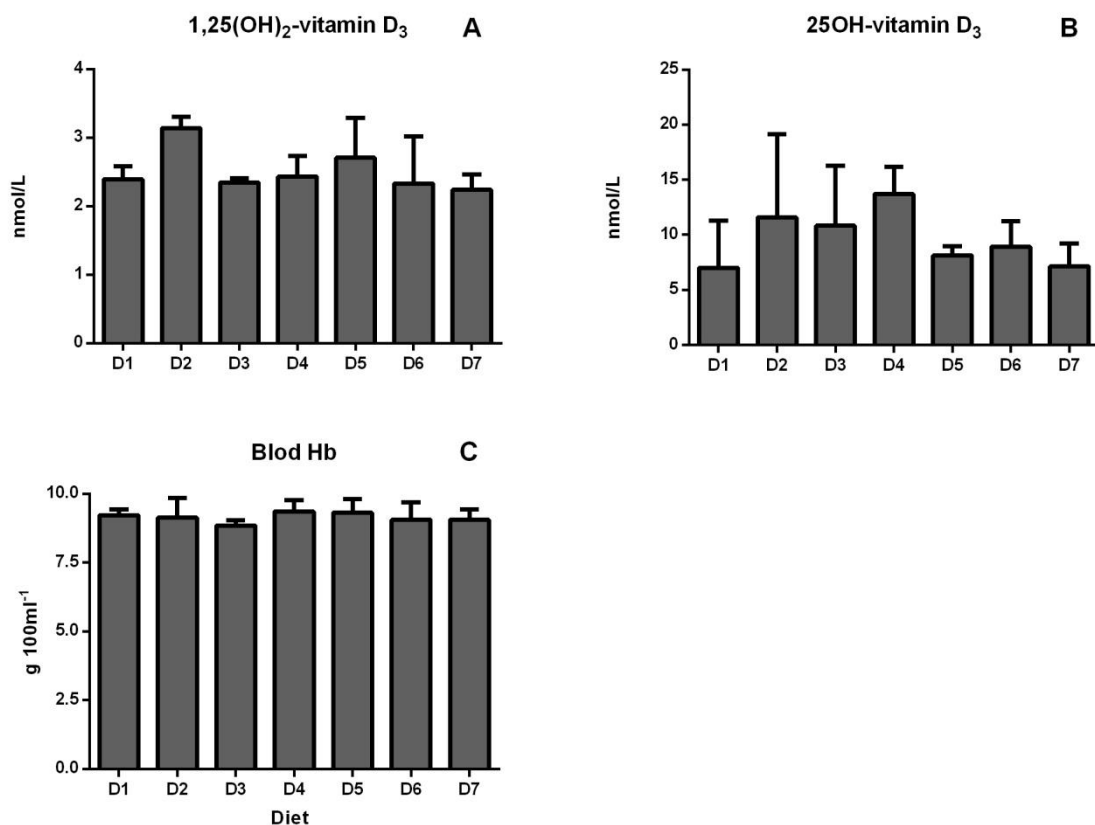
Økende innslag av FBH (D1-D3) reduserte ALP aktiviteten i bein, Figur 22. Lav P kontroll (D1) hadde høyest ALP aktivitet i bein og var signifikant høyere enn D3 og D5 ($p < 0,05$). Trenden var motsatt for ALP aktivitet i skjell, her var aktiviteten lavest i D1 og signifikant høyere i D2, D4 og D5 ($P < 0,05$). Det var ingen forskjeller i TRAP aktivitet mellom diettgruppene i skjell eller bein.



Figur 22 ALP og TRAP aktivitet ($\mu\text{g pNP mg bein}^{-1} \text{time}^{-1}$) i skjell og bein fra sluttuttaket. Signifikante forskjeller er vist med *

5.9 Vit D3 metabolitter i plasma og hemoglobin i blod

Konsentrasjonen av vitamin D metabolitten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ varierte mellom 2.01 og 3.33 nmol/L mens konsentrasjonen av $25(\text{OH})\text{D}_3$ varierte mellom 3.29 og 20.17 nmol/L, Figur 23. Dette er normale konsentrasjoner for laks ved denne størrelsen. Hemoglobin (Hb) varierte mellom 8.42 g/100ml og 9.86 g/100ml som er også normale konsentrasjoner for laks ved denne størrelsen. Det var ingen signifikante forskjeller ($p > 0,05$) i plasmakonsentrasjonen av $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ og $25(\text{OH})\text{D}_3$ og Hb i blod mellom noen av diettgruppene.



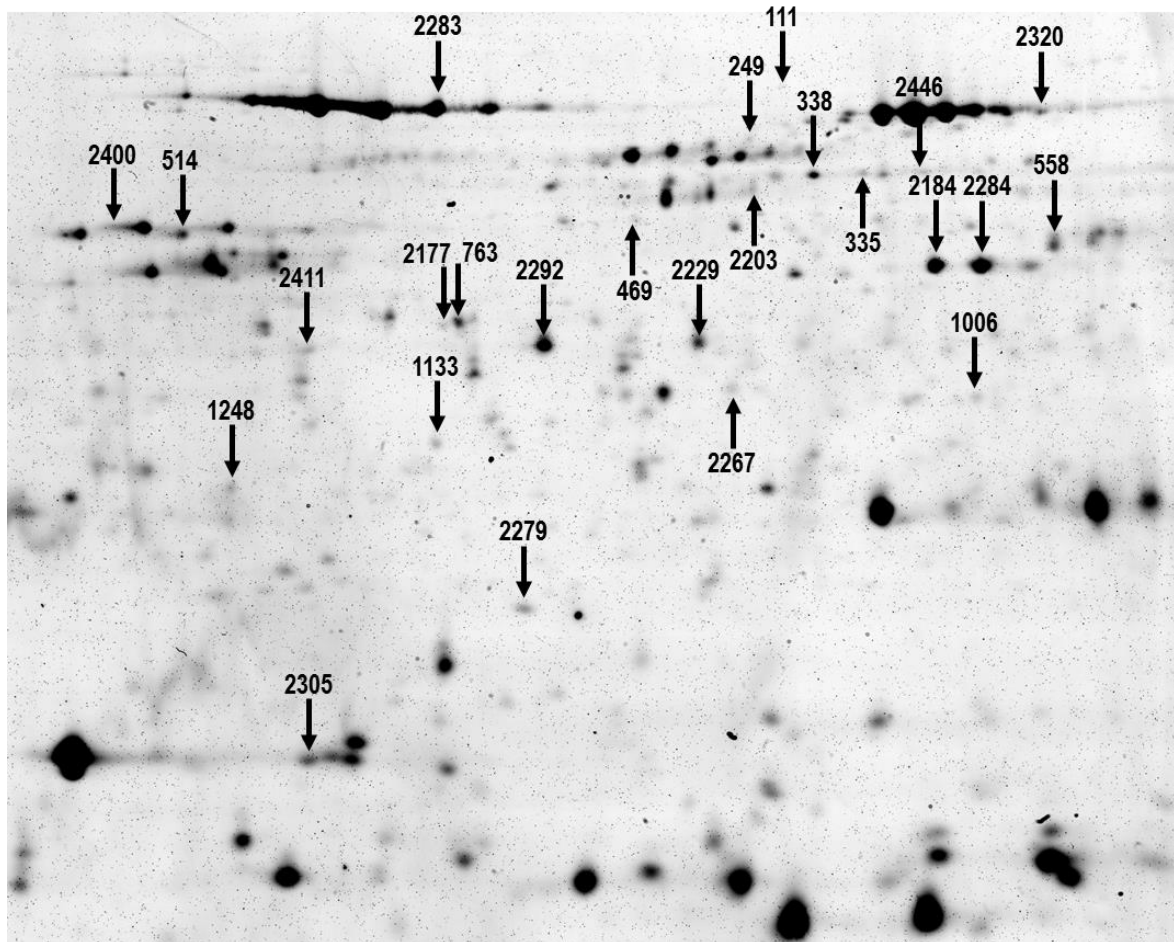
Figur 23 Vitamin D metabolittene 1,25(OH)₂D₃ (A) og 25(OH)D₃ (B) i plasmaprøver og hemoglobin(C) fra sluttuttaket

5.9.1 Mineraler i plasma

Makro og mikromineraler i plasma ved mellom- og sluttuttak viste ikke signifikant diettforskjeller ($p > 0,05$) med unntak av Co ($p < 0,05$). Lav P gruppen hadde lavest plasma Co, nivået økte gradert med økt innblanding av P fra FBH sild, og var signifikant høyest i fôrgruppe D6 og D7 tilsatt Na-P. As i plasma var høy i FBH kolmule gruppen, signifikant høyere enn lav P diett ($p < 0,05$), noe som mest sannsynlig skyldes naturlig høyt As nivå i kolmule råstoff.

5.10 Proteomikk

Det 2 fôrgruppene som ble tatt ut til proteomikkanalysene ved avslutning av forsøket var lav P kontroll diett (D1) og FBH kolmule (D5). Den statistiske analyse av 2DE-DIGE data viste at uttrykket til 25 proteiner var signifikant forandret (Figur 24) i ryggvirvel til fisk fôret med FBH kolmule (D5) sammenlignet med Lav P kontroll (D1). Av disse var 23 proteiner nedregulert og kun 2 oppregulert i FBH kolmule (D5). Elleve av de 23 nedregulerte proteinene ble identifisert (Tabell 5).



Figur 24 Et representativt bilde av en 2DE-gel av proteinfraksjonen i ryggspøyle. Proteiner som var signifikant forandret i fisk fôret med FBH kolmule (D5) sammenlignet med Lav P kontroll diett (D1) er angitt med nummer.

Tabell 5 Identifisering av signifikant endrede proteiner mellom fôrgruppene

Spot nr.	Protein
514	Enolase 3-1
763	Annexin A2-A
1006	Mimecan precursor
1133	Mimecan precursor
2184	Beta actin
2267	Capping protein (actin filament) muscle Z-line beta
2283	Serotransferrin-1 precursor
2284	Fast skeletal muscle alpha-actin
2292	Annexin A1
2305	Non-metastatic cells 1 protein
2411	Mimecan precursor

5.11 Mikroarray og qPCR analyse i skinn

Det ble funnet diett P responser og signifikante endringer i transkripsjonen av 198 gener, noe som illustrerer forskjellene mellom fisk fôret med henholdsvis høyt (D3, D5, D6) og lavt (D1) P innhold i fôr. Fôrgruppene D3, D5, D6 ble sammenlignet med Lav P kontroll (D1). Uttrykket for de fleste gener var oppregulert, som vist for utvalgte gener i Tabell 6, mens det ble funnet nedregulering for Heat shock protein 47 (hsp47). Transkripsjonsprofilene var av lik karakter uavhengig av P kilde, men det ble funnet størst diettpåvirkning for P fra FBH kolmule, noe som også ble bekreftet ved qPCR analyser (Tabell 7).

Tabell 6 Signifikant oppregulerte gener av betydning for celleaktivitet

Oppregulerte gener av betydning for celleaktivitet
Tubulin beta-2C chain
Ammonium transporter RhB
Aquaporin-1
Heat shock 70kDa
Sodium-dependent phosphate transporter 1-A
Rho guanine nucleotide exchange factor 18
Diaphanous homolog 3 isoform a
Regulator of chromosome condensation
GTP-binding protein Rheb
Exosome complex exonuclease RRP4
Tubulin tyrosine ligase-like family, member 12
Vesicle-associated protein 3
Retinol-binding protein I, cellular

Tabell 7 qPCR analyse av utvalgte gener for å bekrefte microarray resultatene

qPCR analyserte gener	Lav P	FBH sild	FBH kolmule
Ammonium transporter Rh type B	0.16	0.21	1.23
Sodium-dependent phosphate transporter 1-A	0.04	0.10	0.85
Heat shock protein 47	-1.85	-2.18	-2.89
Carbonic anhydrase	0.79	0.71	2.17
RhAG-like protein	0.59	0.43	1.70
Erythropoietin receptor precursor	0.34	0.67	0.81
MHC class I MHC class I	1.11	1.46	2.12
Hemoglobin subunit alpha-4	0.54	0.75	2.08

Det ble funnet økt transkripsjon av gener involvert i ulike vevsfunksjoner, som f.eks. gener som koder for ECM-komponenter, inkludert kollagen og glykaner, og gener involvert i celleadhesjon, kontroll av regenerering og differensiering av bestemte celler og cellestrukturer (endotel, epidermis) (Tabell 8). Nitten oppregulerte gener var spesifikke for erythrocytter, noe som kan knyttes til økt vaskularisering i skinnenet. Det ble også observert immunstimulering uten at det var tegn på betennelse.

Tabell 8 Utvalg av affiserte gener knyttet til spesifikke vevsfunksjoner

Effekt på gener av betydning for vevsfunksjoner	
Adhesjon	Integrin, Liprin
Differensiering	Homoebox, wnt
Ekstracellulær matrix	Kollagen, glycan, metalloproteaser
Erythrocytter	Hb, carbonic anhydrase, RhAG, EP reseptor
Epidermis/endothelium	Cadherin, G protein reseptor, amin transport protein
Neural funksjon	Tenascin, RAB3 GTPase, neuroendokrin convertase
Immunfunksjon	MHC1, TCR, IG, complement, akutfase proteiner

6 Diskusjon

I dette forsøket ble det oppnådd gode vekstbetingelser (SGR: 1.41 %; TGC: 3.78) med nær firedobling av fiskevekt i løpet av 12 uker. Det ble ikke funnet signifikante forskjeller i vekst mellom noen av fôrgruppene som fikk ekstra P tilførsel, $\geq 0,7$ % løselig P (D2 – D7). Fôrgruppe Lav P kontroll (D1) viste lavest tilvekst, men var signifikant forskjellig kun fra FBH kolmule. FBH sild tilførte henholdsvis 0,7, 0,9 og 1,1 % løselig P (D2, D3, D4), hvorav vi antok at 0,7 % løselig P ville være sub-optimalt for laksesmolt. Minimumsbehov for P til kaldtvannsfisk er 0,8 % (NRC, 2011). Det kan være vanskelig å ha god kontroll med biotilgjengelig P, bl.a. fordi en varierende mengde P i fiskemel vil være bundet i fiskebein, men også fordi planteprotein inneholder phytat-P (fytinsyre) som er lite tilgjengelig og antinæringsstoffer som kan hemme opptaket av P og andre mineraler (Kumar et al. 2012). Et overskudd av P i fôret utover behovet vil normalt bli regulert ved at fisken reduserer P opptaket i tarm samtidig som P utskillelsen i urin øker.

Resultatene i dette forsøket basert på vekst, P fordøyelighet, P retensjon og mineralisering i ulike vev indikerer at P behovet til laksesmolt var dekket med 0,69 % løselig P fra FBH sild. Dette er i overenstemmelse med resultat fra et tidligere smoltforsøk der vi oppnådde svært gode vekstbetingelser (SGR, 3,9; TGC: 4) og ingen avvik i vekst, mineralisering eller skjelettutvikling når fôret inneholdt 0,70 % P fra FBH kolmule og Na-P (Albrektsen et al., 2010, 2013). Dette betyr at forsøksfôrene var formulert på behov eller i overskudd på en måte som gjør at det ikke var mulig å ta ut graderte P effekter for FBH sild. Effektivitet i P utnyttelsen kan likevel evalueres relativt til Lav P kontroll diett (D1). Basisdietten med 0,46 % løselig P var ikke tilstrekkelig til å dekke P behovet for optimal vekst og mineralisering og det ble også funnet oppregulering av molekytlære markører for P mangel. Diett D3 (FBH sild), D5 (FBH kolmule) og D6 (mono Na-P) inneholdt likt nivå av løselig P og resultatene for disse fôrgruppene kan derfor sammenlignes direkte.

Mineralisering og næringsopptak

Røntgenanalysene indikerte en forskjell mellom Lav P diett (D1) relativt til alle andre fôrgrupper, med klare indikasjoner på undermineralisering i skjelettet. Dette ble bekreftet ved kjemisk analyse av aske og mineraler i hel fisk, bein og skjell. Røntgenanalysene viste videre at de morfologiske avvikene hadde liten alvorlighetsgrad, men at de var til stede i 33 % av fisk fôret med D1. Samtlige fôrgrupper hadde et visst innslag av fisk med fusjoner og fusjonsrelaterte avvik, men dette kunne ikke relateres til verken P nivå eller P kilder i forsøket. Andre faktorer, eventuell tøff behandling på tidligere stadier, kan være årsaken til disse fusjonene. Fisk som fikk ekstra tilførsel av P, tenderte til eller viste signifikant bedre vekst og mineralisering og ingen morfologiske avvik i skjelett, uavhengig av P nivå (FBH sild) og P kilder (FBH, Na-P).

Energifordøyeligheten i fisk økte som funksjon av P i fôret, og den økte veksten i laks kan mest sannsynlig forklares ut fra bedre næringsopptak i tarmen og primært ved økt fett/energiopptak. I et tidligere smoltforsøk ble det funnet økt fordøyelighet av næringsstoffer i fisk fôret med P fra FBH kolmule (Albrektsen et al., 2010, 2013), mens i dette forsøket var den økte energifordøyeligheten relatert til diett P nivå og uavhengig av P kilde. Det er kjent at uttalt P mangel kan påvirke fettomsetning i fisk og gi fettakkumulering (Skonberg et al., 1997; Albrektsen et al., 2009, Kousoulaki et al., 2010). Mekanismen er ikke kjent, men det antas at P mangel kan påvirke β -oxidation eller oksidativ fosforylering i fisk (Skonberg et al., 1997). I smoltforsøket ble det ikke funnet akkumulering av fett, men det ble heller ikke påvist uttalt P mangel. Fettinnhold i lever og muskel var lavest for Lav

P gruppen etter 6 ukers foring, noe som støtter resultat mht redusert fett og energiopptak i fisk fôret med sub-optimalt P nivå, selv om forskjellene var mindre etter 12 ukers fôring. Mineralstatusen viste også større diettforskjeller etter 6 uker enn etter 12 uker, noe som indikerer at fisken over tid kan ha evne til å tilvenne seg nye fôr P kilder og P nivå. Resultat basert på analysert innhold av makro- og mikromineraler i hel fisk og i bein i dette forsøk indikerer at mineralstatus i laks etter 12 ukers fôring var nokså lik og uavhengig av de ulike P kildene som ble sammenlignet, dvs P fra FBH (sild og kolmule) og fra Na-P. Ca og P nivået i skjell var ca. 15 % lavere enn i bein, men dette veivet syntes noe mer sensitiv mht diettvariasjoner i P nivå og viste størst forskjell i P status mellom Lav P kontroll diett og de andre fôrgruppene.

P utnyttelse og miljøeffekter

Fordøyeligheten av P ble som forventet redusert med økende P innhold i fôret, mens P retensjonen var lik for fôrgruppene D2 – D7. Dette indikerer at endring i P fordøyelighet er en biologisk tilpasning til et overskudd av P i fôret. Resultatene indikerer at P tilførsel høyere enn 0,7 % løselig P ikke gir bedre vekst, mineralopptak eller mineralisering i laks av denne størrelsen. Dette er viktige funn med tanke på å optimalisere P nivåene i fiskefôr – for å redusere bruk av P som en begrenset ressurs og for å minke de negative konsekvensene av P overskudd som slippes ut i naturen.

Utnyttelsen av P var høyest ved sub-optimalt P nivå i fôret (D1) og ble drastisk redusert fra 45 til 25 % med økende P i fôret. Ut fra resultat i dette forsøket vil P behovet være et sted mellom 0,5 og 0,7 % løselig P i fôr. Diett D2 (0,7 % løselig P) antas å være den dietten som er formulert nærmest et reelt P behov. For denne dietten så vi både høy P fordøyelighet og høy P retensjon, samt god diettutnyttelse av P. De 4 diettene som inneholdt likt innhold av løselig P, diett D3, D5, D6 og D7, viste lik P fordøyelighet, P retensjon og P utnyttelse fra fôret, og det kan konkluderes med at P fra FBH er like tilgjengelig som mono Na-P, uavhengig av P kilde, i laksesmolt. Tilsvarende konklusjon er gjort i et tidligere smoltforsøk både med hensyn til P behov og P utnyttelse fra FBH kolmule relativt til P fra et løselig mono Na/K-fosfat salt (Albrektsen et al., 2010, 2013).

Prosjektet har demonstrert at man kan frigjøre omtrent 90 % av P i sildebein ved syrehydrolyse, og at man kan oppnå opp mot 80 % fordøyelighet av løselig P når fôrene er formulert nær eller litt i underkant av P behovet. Ved å frigjøre og øke tilgjengeligheten av P fra fiskebein, oppnår man økt fordøyelighet og retensjon av total P i det marine råstoffet, samtidig som man reduserer behovet for å tilsette andre løselige P salter i fôret. Begge deler vil bidra til å redusere miljøutslipp og gjøre det lettere å møte restriksjoner i utslipp av P pålagt i EU-s vanddirektiv.

Hovedgevinsten ved de nye marine ingrediensene er at en stor andel av P i fiskebein (~90 %) kan frigjøres og utnyttes som en effektiv P kilde i fôr til laks og redusere behovet for å tilsette P salter.

Markører for P status i tarm

Forsøksresultat viste at samtlige fôr var formulert på behovsnivå eller i overskudd og dette medførte at det ikke var mulig å studere graderte effekter av P fra FBH sild (D2, D3, D4). Som en følge av dette ble de molekytlære analysene sentrert rundt Lav P kontroll diett (D1) og testdiettene FBH Sild (D3), FBH Kolmule (D5) og Na-P (D6), ettersom disse inneholdt likt nivå av løselig P og var direkte sammenlignbare. Fra mellomuttaket analyserte vi blindsekkene for transkripsjon av genet NaPi og midttarmen for en rekke gener involvert i mineralopptak og strukturell oppbygging. Fra sluttuttaket

analyserte vi kun midttarm. Midttarm ble valgt da denne delen av tarmen jevnt over har vist mest stabile og mest respons på ulike markører og behandlinger (Ytteborg et al., in prep.).

NaPi er en kjent markør for P opptak og det har tidligere vært vist at NaPi kan bli høyt oppregulert ved P-mangel i dietten. I blindsekk fra fisk foret med D1 fant vi at NaPi var signifikant oppregulert ved mellomuttaket. Dette så vi ikke i blindsekkene fra fisk foret med de andre diettene. Oppregulering av NaPi i blindsekkene bekrefter tidligere forsøk med at NaPi er en sensitiv markør for P opptak i tarm.

Lav P kontroll (D1) viste en god profil på hvordan gener for mineralopptak og struktur reguleres i tarmen ved underdekning av P. D1 var derfor en god verifikasjon av både markører og modell. Genene i midttarm var generelt nedregulert i fisk foret med D1, noe som bl.a. kan skyldes tidsaspektet for sampling. På mellomuttaket hadde fisken fått testfôret i seks uker. Det er et kjent fenomen fra litteraturen at etter en viss periode vil organismer skru ned transkripsjonen av gener hvis det ikke lenger kan oppnås effekter av å øke mengde genprodukt, en prosess som er svært energikrevende. I en mangelsituasjon vil genene involvert i opptak av mangelvaren ofte skrues på i begynnelsen for å sikre økt opptak, men dersom dette blir ineffektivt vil genene etter hvert nedreguleres igjen. Vedvarende mangel vil generelt gi nedregulerte transkripsjonprofiler.

Testdiettene med FBH (D3 og D5) hadde lignende tendens til nedregulering av mineral opptaksmarkører som D1 ved mellomuttaket, men resultatene var ikke signifikante. Ved sammenlikning av markører i tarm, var MEP1, Il1 β og Hsp70 oppregulert i D5 (FBH kolmule). Høyt innhold av Ca og P i dietten har vært vist å nedregulere Il1 β i midttarm hos gris sammenlignet med dietter som inneholdt lave mengder Ca og P ([Metzler-Zebeli et al., 2012](#)). MEP 1 er involvert i P opptak, men er også med på å opprettholde tarmepitelets børstekant. At disse genene var oppregulert i FBH kolmule kan tyde på morfologiske avvik i tarmcellene og at kolmule inneholder noe som stresser cellene (hsp70). Dette igjen kan påvirke opptaket av P, og andre funksjoner i tarmen. Alternativt kan det hende at FBH har en beskyttende egenskap, f.eks. Wischmeyer et. al (1997) analyserte effekten av glutamin på tarmepitel celler og fant at glutamin hadde en beskyttende rolle mot stress. Denne effekten ble forklart med at glutamin induserte hsp70 i cellene, som igjen beskyttet cellene mot stressfaktoren.

Ved sluttuttaket ble det funnet tilsvarende resultater som ved mellomuttaket. I lav P kontroll (D1) fant vi flere signifikante nedreguleringer, men det ble ikke funnet nedregulering for mineral opptaksmarkører i FBH sild eller kolmule relativt til positiv kontroll (D6). Transkripsjonsanalysene støtter opp om mineralanalysene, som også viste sterkere variasjoner etter 6 uker sammenlignet med 12 uker.

Studier på mineralopptak i tarm komplementerer tradisjonelle analyser av skjelettstrukturer på en god måte og gir en status på mekanismene involvert i opptak. Identifiserte markører vil kunne brukes til tidlig detektering av fôr kvalitet og for å avsløre eventuelle mangler. I dette forsøket viste markørene at opptaksmekanismer, helsestatus og tarmintegritet var relativt uforandret i testdiettene og vi konkluderer med at det ikke var noen alvorlige negative tarmeffekter ved bruk av FBH fra sild eller kolmule.

ALP og TRAP aktivitet i bein og skjell

Aktiviteten av enzymet ALP er en mye brukt markør for osteoblastaktivitet. Osteoblaster er beindannende celler som skiller ut en organisk, ikke-mineralisert substans, osteoid. Denne organiske substansen må mineraliseres for å danne beinvev. ALP kan frigjøre P fra biofosfater og dermed øke tilgjengeligheten av mineraler for deponering i bein. Aktiviteten av enzymet TRAP er en mye brukt markør for osteoklastaktivitet. Osteoklaster er "beinspisende" celler som bryter ned beinvev og som kan frigjøre mineraler ved suboptimale tilstander. Diettgruppe D1 hadde forhøyet ALP aktivitet i bein. Dette kan tolkes som en tilstand med suboptimal P der fisken har utilstrekkelig mineral tilstede for å lage et sterkt nok bein og prøver å kompensere ved å produsere mer ALP. Dette har tidligere vært observert av Fjelldal et al. (2012a) der en diett med suboptimal P ga redusert mineralinnhold, økt ALP aktivitet og redusert TRACP aktivitet i bein. Skjell er en mineralisert struktur som i likhet med bein kan benyttes som kilde til mineraler i perioder med lav tilgang fra dietten. Det er foreslått at fisk primært vil bruke skjell som kilde til mineraler og spare bein fra osteoklastnedbrytning (Carragher & Sumpter, 1991; Skonberg et al., 1997; Persson et al., 1999). En lav ALP aktivitet i skjell men høy ALP aktivitet i bein kan tyde på at mineraliseringen av bein favoriseres foran mineralisering av skjell. I diettgrupper med mye tilgjengelig P (D4) er ALP aktiviteten i både skjell og bein høy. I dette forsøket var det ingen forskjeller i TRAP aktivitet mellom gruppene, noe som kan tyde på at diettforskjellene ikke var store nok til å gi utslag på denne markøren.

Tidligere forsøk (Fjelldal et al., 2009, 2012) har vist at P mangel gir økte nivåer av vitamin D metabolitten $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ som har som funksjon å gjenopprette Ca og P balansen ved suboptimale tilstander. I dette forsøket var det ingen forskjeller i vitamin D metabolitter mellom diettgruppene. Dette kan også tyde på at diettforskjellene ikke var store nok til å gi utslag på denne biomarkøren. Til sammenligning hadde laks med 0.4% tilgjengelig P 40% økt konsentrasjon av $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sammenlignet med laks som fikk 0.8% tilgjengelig P (Fjelldal et al 2012).

Microarray

Skinns fra laks som hadde fått P tilførsel i dietten synes å ha en mer aktiv og dynamisk status, det vil si rask fornyelse og økt differensiering. Dette ble observert i alle fôrgrupper som fikk høyt P innhold (D3, D5, D6), men det var indikasjoner på at effekten var sterkest for FBH kolmule (D5). Kolmule var den gruppen som også ga best tilvekst i dette forsøket. Økt transkripsjon av gener involvert i celleadhesjon, kontroll av regenerering og differensiering av endotelceller og epidermis, oppregulering av gener involvert i cytoskjelett-dannelse og vedlikehold av kromosomer bekrefter dette og tyder på rask fornyelse av cellene i skinn. Det ble videre funnet oppregulering av gener spesifikke for erytrocytter, noe som kan settes i direkte sammenheng med økt vaskularisering og den generelt oppregulerte aktiviteten i skinn fra fisk med god tilgang til P. I tillegg ble det funnet en oppregulert transkripsjon av genene til flere sentrale transportører som Na avhengig P transportør 1 - A, Aquaporin – 1 (vannkanal) og ammonium transportør Rh type B. Oppregulering av NaPi reseptoren i skinn ved sluttuttaket kan basere seg på ulike prioriteringer i ulike organer. Man har tidligere sett at ved knapphet i P kan skjelettstrukturer prioriteres framfor skjell. Skjellene synes å være et lettere tilgjengelig P reservoar enn skjelettet hos fisk, og blir oftere «fylt/tømt» for P avhengig av tilgang på tilgjengelig P i dietten. Muligens er NaPi transkripsjon i skinn en mer følsom markør i forsøk der fisk har vært føret med samme diett over lengere tid sammenlignet med NaPi i tarm. Det ble videre funnet mange endringer på vevsnivå i respons til økt P tilførsel uavhengig av P kilde, herunder økt deponering av ECM-komponenter som kollagen og glykaner. Et annet sentralt funn var nedregulering av hsp47, som er viktig for å regulere struktur av kollagenfibre. Vi har tidligere

sett markert induksjon av hsp47 i flere studier der det har oppstått misdannelser. En reduksjon i hsp47 indikerer normale tilstander for kollagendeponering.

Microarray-resultat indikerer normale og sunne skinnforhold i fisk fôret med tilstrekkelig P mengde. Ingen unormale funn ble avdekket og ingen grupper av gener var affisert på en måte som tydet på forskjeller i helsetilstand mellom fôrgruppene FBH sild (D3), FBH kolmule (D5) og Na-P (D6), men det ble observert forskjeller relativt til Lav P kontroll diett (D1). Den økte immunstimulering vi fant var ikke knyttet til betennelse og må derfor undersøkes nærmere for å begrunnes. Påviste forskjeller i transkripsjon av gener synes å være funksjon av P nivå, ikke P kilde.

Proteomikk

I 2D-gel analysene ble kontroll Lav P (D1) og FBH Kolmule (D5) sammenlignet. FBH kolmule var den varianten som ga best vekstresultat og ble derfor videre studert med proteomikk fremfor FBH sild (D3). Analysene viste at 25 proteiner var signifikant ulike mellom de to gruppene. Blant disse var proteiner involvert i utvikling av beinceller (e.g. Annexin A2a, annexin, serotransferrin) og selve mineraliseringsprosessen (e.g. mimecan) (Hong et al., 2010; Messer et al., 2010; Damazo et al., 2007; Gillette og Nielsen-Press, 2004; Bentz et al., 1989; Rehn et al., 2008) nedregulert i fisk som var fôret med D5 sammenlignet med de som hadde fått D1.

Fra røntgenanalysene så vi tydelig at fôrgruppe D1 var undermineralisert sammenlignet med D5, så nedregulering av disse proteinene kan ikke bety dårligere mineralisering. Vi vet fra tidligere studier at rask vekst kan resultere i nedregulering av gener involvert i mineralisering (Ytteborg et al., 2010), noe som er et tegn på at modningen av beinstrukturene henger etter resten av utviklingen. Produksjon av bein er en tidkrevende prosess, der matriks skal skilles ut fra beincellene, organiseres og struktureres før det til slutt mineraliseres gjennom inkorporering av mineraler i matriks (modning). Fisk som fikk D5 vokste raskt over kort tid, noe som kan forklare de nedregulerte proteinene i denne gruppen. Alternativt kan resultatene tolkes slik at proteinene var oppregulert i fôrgruppe D1, noe som kan tyde på en kompensatorisk respons i Lav P diett. Dette vil være en naturlig respons når mineraltilførselen er for dårlig til å opprettholde et sterkt skjelett. Etersom det ble valgt å teste kun Lav P diett mot FBH kolmule, de to gruppene som hadde lavest og høyest vekst er det ikke mulig å konkludere om proteomikk resultatene er en ren P effekt, eller om det kan være en råstoff-effekt av kolmule.

På transkripsjonsnivå så vi størst effekt av kolmuledietten (D5) sammenlignet med de andre diettene. Det ble også påviste størst diettpåvirkning for D5 i microarray analysene, mens tidligere *in vitro* forsøk på beinceller (Albrektsen et al., 2014) har vist at FBH kolmule har en større forsinkende effekt på modning av osteoblaster sammenlignet med FBH sild. Det er ikke fullt ut forstått hvorfor FBH fra kolmule oppfører seg litt annerledes enn FBH fra sild (basert på transkripsjonsanalysene, proteomikk, microarray og vekstdata), og om dette kan skyldes en effekt av fremstillingsprosessen (bruk av ulike nøytraliseringsmidler) eller andre råstoff relaterte forskjeller. Det antas at nøytraliseringsmiddelet kan ha betydning for biologiske responser både *in vivo* og *in vitro*, og det er gjennomført *in vitro* forsøk for å prøve å få en avklaring (Østby et al., 2014). Vi har indikasjoner på at sulfatmengden i FBH (fra svovelsyre) er en faktor som kan ha betydning for biologiske resultat og at KOH kan være et bedre nøytraliseringsmiddel enn ammoniakk.

Konklusjoner

Det er utviklet og tilpasset en prosess for syrehydrolyse av P i beinfraksjon fra sildeavskjær, og resultatene våre viser at omtrent 90 % av P i avskjæret kan frigjøres ved hydrolyse i sterke syrer (H_2SO_4). Basert på resultat for vekst, røntgen, P fordøyelighet, P retensjon, spesifikt P nivå i hel fisk, bein og skjell, samt utnyttelse av P fra fôret, kan det konkluderes med at P i FBH er like biologisk tilgjengelig som mono Na-P i hurtigvoksende laksesmolt rett etter utsett.

Prosjektet har dokumentert nye anbefalinger om P behov basert på løselig P i fôr til smolt på 0.70 %. Dette gir grunnlag for å formulere laksefôr med større sikkerhet nær reelt P behov slik at man oppnår maksimal P fordøyelighet og P retensjon i fisk, og redusert P utslipp til miljøet. Bedre utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser som demonstrert for P i sildeavskjær kan bidra til et mer bærekraftig og miljøvennlig fiskeoppdrett og godt omdømme for norsk oppdrettsfisk globalt.

Det er funnet oppregulering av en markør for opptak av P i tarm (NaP1) og av en markør for beindannelse i virvler (ALP) hos smolt fôret med suboptimalt P nivå i fôret (0.46 % løselig P), noe som indikerer at disse markørene kan fungere som sensitive P mangelmarkører i laksesmolt.

7 Referanser

- Aksnes, A. (2002, revidert 2007a). Framgangsmåte for å forbedre den biologiske fordøybarheten til et fôrprodukt, samt produkt resulterende derav, samt anvendelse av produktet. Mineraler. Søknadsnr 20045728
- Albrektsen, S., Hope, B. and Aksnes A. (2009). Phosphorous (P) deficiency due to low P availability in fish meal produced from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in feed for under-yearling Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture* 296.318-328
- Albrektsen, S. (2009) Novel method to improve efficiency of fish feed and to reduce effluents to environment. Sluttrapport FORNY prosjekt. NFR prosjekt 184014 (2007-2008).
- Albrektsen, S., Thorsen, K. og Nygaard, H. (2010). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. First Marine Ingredients Conference, Holmenkollen Park Hotel, Oslo, 20-21 September. Poster presentation.
- Albrektsen, S., Thorsen, KH., Bæverfjord, G., Nygaard, H., (2013). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. *Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB)*, 2013. Poster.
- Albrektsen, S (2013). Løselig fosfor i fôr - egnet som mål på tilgjengelig fosfor i laks?. *Norsk Fiskeoppdrett* (11) p. 38-40
- Albrektsen, S., Bæverfjord, G., Lock EJ., Pedersen, M., Takle, H., Ørnsrud, R., Veiseth-Kent, E., Waagbø, R., Ytteborg., E (2014). Nye marine ingredienser fra sildeavskjær som P kilde i fôr til lakseyngel (*Salmo salar* L.). *Nofima rapport 09/2014*, 51 sider.
- Bentz, H., Nathan, R.M., Rosen, D.M., Armstrong, R.M., Thompson, A.Y., Segarini, P.R., Mathews, M.C., Dasch, J.R., Piez, K.A. and Seyedin, S.M. (1989). Purification and Characterization of a Unique Osteoinductive Factor from Bovine Bone. *Journal of Biological Chemistry* 264: 20805-20810.
- Bæverfjord G, Åsgård T, Shearer KD. (1998) Development and detection of phosphorus deficiency in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition*, 4:1-11.
- Carragher, J.F. and Sumpter, J.P., (1991). The Mobilization of Calcium from Calcified Tissues of Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*) Induced to Synthesize Vitellogenin. *Comp. Bioch. Physiol. A-Physiol.*, 99, 169-172.
- Cho, C.Y. and D.P. Bureau (2001). A review of diet formulation strategies and feeding systems to reduce excretory and feed wastes in aquaculture. *Aquaculture Research* 32: 349-360
- Damazo, A.S., Moradi-Bidhendi, N., Oliani, S.M. and Flower, R.J., (2007). Role of annexin 1 gene expression in mouse craniofacial bone development. *Birth Defects Research Part a-Clinical and Molecular Teratology* 79: 524-532.
- Fjelldal, P.G., Lock, EJ, Hansen T, Waagbø R, Wargelius A, Gil Martens L, El-Mowafi, A, Ørnsrud R. (2012)a. Continuous light induced bone resorption and affects vertebral morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a phosphorous deficient diet. *Aquaculture Nutrition* 18, 610-619
- Fjelldal, P.G., Hansen, T. og Albrektsen, S. (2012). Inadequate phosphorus nutrition in juvenile Atlantic salmon has a negative effect on long-term bone health.
- Fjelldal, P.G., Hansen, T., Breck, O., Sandvik, R., Waagbø, R., Berg, A., Ørnsrud, R., (2009). Supplementation of dietary minerals during the early seawater phase increase vertebral strength and reduce the prevalence of vertebral deformities in fast growing under-yearling Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. *Aquaculture Nutr.*, 1365-2095.

- Fjellidal G, Hansen TJ, Berg AE: (2007) A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 273:721-728.
- Fjellidal PG, Lock EJ, Grotmol S, Totland GK, Nordgarden U, Flik G & Hansen T (2006): Impact of smolt production strategy on vertebral growth and mineralisation during smoltification and the early seawater phase in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 261: 715-728.
- Gillette, J.M. and Nielsen-Preiss, S.M., (2004). The role of annexin 2 in osteoblastic mineralization. *J Cell Sci* 117: 441-449.
- Helland S, Denstadli V, Witten PE, Hjelde K, Storebakken T, Skrede A, Asgard T, Baeverfjord G: (2006) Hyper dense vertebrae and mineral content in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with graded levels of phytic acid. *Aquaculture*, 261:603-614.
- Hovde, G. (2013). Validation of a method for analysis of soluble phosphorus by use of alkaline extraction and spectrophotometric determination.
- Hong, D., Chen, H.X., Yu, H.Q., Liang, Y., Wang, C., Lian, Q.Q., Deng, H.T. and Ge, R.S., (2010). Morphological and proteomic analysis of early stage of osteoblast differentiation in osteoblastic progenitor cells. *Exp Cell Res* 316: 2291-2300.
- Hua, K., Liu, L., Bureau, D.P., (2005). Determination of phosphorus fractions in animal protein ingredients. *J. Agricult. Food Chem.* 53, 1571–1574. Ito, N., Fukumoto S., 2005. FGF23 and bone metabolism. *Clin. calcium* 15, 43-48.
- Krasnov A, Timmerhaus G, Afanasyev S, Jørgensen SM. (2011). Development and assessment of oligonucleotide microarrays for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 6: 31-38.
- Kirchner S, McDaniel NK, Sugiura SH, Soteropoulos P, Tian B, Fletcher JW, Ferraris RP (2007) Salmonid microarrays identify intestinal genes that reliably monitor P deficiency in rainbow trout aquaculture. *Animal Genetics* Kolarevic, J., Selset, R., Felip, O., Good, C., Snekvik, K., Takle, H., Ytteborg, E., Bæverfjord, G., Åsgård, T., Terjesen, B.F. (2013). Influence of long term ammonia exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr growth and welfare. *Aquaculture Research*. 44, 1649-1664.
- Kousoulaki, K., Fjellidal, P.G., Aksnes, A. & Albrektsen, S. (2010). Growth and tissue mineralisation of atlantic cod (*Gadus morhua*) fed soluble P and Ca salts in the diet. *Aquaculture*, 309, 1-4, 181-192.
- Kumar, V, Sinha, AK, Makkar HPS, De Boeck G, Becker, K. (2012). Phytate and phytase in fish nutrition. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 96, 335-364
- Lall, S.P. (2002). Mineral Nutrition. Pp 260-308. In: J.E. Halver and R.W. Hardy (ed.), *Fish Nutrition*, 3rd ed., Academic Press, San Diego, USA.
- Lall SP, Lewis-McCrea LM: (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish - An overview. *Aquaculture*, 267: 3-19.
- Messer, J.G., Cooney, P.T. and Kipp, D.E., (2010). Iron chelator deferoxamine alters iron-regulatory genes and proteins and suppresses osteoblast phenotype in fetal rat calvaria cells. *Bone* 46: 1408-1415.
- Metzler-Zebeli BU., Gänzle MG., Mosenthin R., Zijlstra RT. (2012) Oat β -glucan and dietary calcium and phosphorus differentially modify intestinal expression of proinflammatory cytokines and monocarboxylate transporter 1 and cecal morphology in weaned pigs. *Journal of Nutrition* 02; 142(4):668-74.
- NRC and N. R. Council (2011). *Nutrient requirements of fish*. Washington D.C., National Academic Press.

- Persson, P., Björnsson, B.T., Takagi, Y., (1999). Characterization of morphology and physiological actions of scale osteoclasts in the rainbow trout. *J. Fish Biol.*, 54, 669-684.
- Rehn, A.P., Cerny, R., Sugars, R.V., Kaukua, N. and Wendel, M., (2008). Osteoadherin is upregulated by mature osteoblasts and enhances their in vitro differentiation and mineralization. *Calcif Tissue Int* 82: 454-464.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. (2002)Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30.
- Roy PK, Witten PE, Hall BK, Lall SP: (2002) Effects of dietary phosphorus on bone growth and mineralisation of vertebrae in haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 35-48.
- Ruban, V., López-Sánchez, J.F., Pardo, P., Rauret, G., Muntau, H., Quevauviller, P.(2001). Harmonized protocol and certified reference material for the determination of extractable contents of phosphorus in freshwater sediments – A synthesis of recent works. *Fresenius J. Anal. Chem.* 370, 224–228.
- Skonberg, D.I., Yogev, L., Hardy, R.W., Dong, F.M., (1997). Metabolic response to dietary phosphorus intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 157, 11–24.
- Sugiura, S.H., Hardy, R.W., Roberts, R.J. (2004a). The pathology of phosphorus deficiency in fish –a review. *J. Fish Dis.* 27, 25–265.
- Sugiura SH., McDaniel NK., Ferraris RP., (2004b) Dietary phosphorous-responsive genes in the intestine, pyloric caeca and kidney of rainbow trout. *American Journal of Physiology – Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 287, 541-550.
- Ytteborg, E., Baeverfjord, G., Hjelde, K., Torgersen, J., Takle, H. (2010). Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Physiology*, 10:12.
- Ytteborg, E., Torgersen, J., Baeverfjord, G., Takle, H. (2010). Morphological and molecular characterization of developing vertebral fusions using a teleost model. *BMC Physiology*, 10:13.

Appendiks

Appendiks A1. Diett sammensetting

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Løselig P (g P kg ⁻¹)	5.0	7.0	9.0	11.0	9.0	9.0	9.0
<i>Ingredienser, gkg⁻¹</i>							
Fiskemel	300	300	300	300	300	300	300
FBM Sild		23	46	68			
FBM Kolmule					45		
SPC	150	150	150	150	150	150	150
Hvetegluten	82	76	71	66	84	85	88
Lysine-HCl	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
Thr	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Fiskeolje ^b	235	235	235	235	235	235	235
Maisgluten	50	50	50	50	50	50	50
Hvetemel	143	126	108	91	97	123	105
Betafin	5	5	5	5	5	5	5
Vitamin miks ^c	20	20	20	20	20	20	20
Mineral miks ^d	5.2	5.2	5.2	5.2		5.2	5.2
Mineral miks ^e					3.76		
NaH ₂ PO ₄ , 24 %, T24/10						17	17
(NH ₄) ₂ SO ₄ , 99.5 %							14.6
Carophyll Pink, 10%	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
Y ₂ O ₃	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

^a LT fiskemel, SILFAS, N-5892, Bergen, Norway. Protein: 708 gkg⁻¹, Fett: 110 gkg⁻¹, aske: 108 gkg⁻¹, vann: 87 gkg⁻¹.

^b Fiskebeinhydrolysat (FBM) Sild: Protein: 300 gkg⁻¹, Fett: 16 gkg⁻¹, aske: 322 gkg⁻¹, vann: 22 gkg⁻¹.

^c Fiskebeinmel (FBM) Kolmule: Protein: 89 gkg⁻¹, Fett: 16 gkg⁻¹, aske: 677 gkg⁻¹, vann: 38 gkg⁻¹.

^b Norsalmoil, Norsildmel AL, N-5141 Fyllingsdalen, Norway

^e Tilsatt per kg fôr: vitamin D₃, 3000 I.E., 160 mg; vitamin E, 136 mg; thiamin, 20 mg; riboflavin, 30 mg; pyrodoxine-HCl, 25 mg; vitamin C, 200 mg; calcium pantothenate, 60 mg; biotin, 1 mg; folic acid, 10 mg; niacin, 200 mg; vitamin B₁₂, 0,05 mg; menadion bisulphite, 20 mg

^f Tilsatt per kg fôr: magnesium 500 mg; potassium, 600 mg; zinc, 120 mg; iron, 60 mg; manganese, 30 mg; copper, 6 mg.

Appendiks A2. Kjemisk sammensetting og energi innhold, samt mineraler i forsøksfôr

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Løselig P (g P kg ⁻¹)	5.0	7.0	9.0	11.0	9.0	9.0	9.0
<i>Ingredienser</i>							
Protein, g kg ⁻¹	439	446	440	440	436	433	437
Fett, g kg ⁻¹	277	294	294	294	300	286	291
Vann, g kg ⁻¹	94	64	63	78	71	89	74
Aske, g kg ⁻¹	51	57	66	69	78	62	64
Total energi ¹ , MJ kg ⁻¹	22,9	23,6	23,4	22,8	23,2	22,9	23,3
<i>Mineraler, g kg⁻¹ diet</i>							
Ca	6.5	6.6	6.7	6.8	6.2	5.9	7.1
Mg	2.1	2.0	2.1	2.1	2.1	2.0	2.3
Total P	8.0	10.3	12.3	14.4	12.1	11.7	11.6
Løselig P	4.6	6.9	9.8	11.3	9.3	8.7	9.1
pH	6.3	5.8	5.6	5.4	5.6	6.1	6.1

Appendiks A3. Daglig tilvekst (SGR, %), fôrinntak og fôrutnyttelse (FCR) i laks fôret med Lav P kontroll diett (D1), gradert økt P fra FBM sild (D2, D3 and D4), P fra FBH kolmule (D5) og Na-P salts (D6, D7). Diett D7 er også tilsatt ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$) for å studere effekt av prosess. Alle verdier er gitt som gjennomsnitt og SEM (n=3).

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	ANOVA
Løselig P (g P kg ⁻¹)	5.0	7.0	9.0	11.0	9.0	9.0	9.0	P ¹ <
Sluttvekt, g	737 (10)	755 (7)	777 (21)	746 (17)	793 (12)	760 (3)	782 (8)	0.06 ²
Tilvekst, g	522 (8) ^a	542 (6) ^{ab}	564 (21) ^{ab}	534 (116) ^{ab}	580 (13) ^b	547 (4) ^{ab}	569 (7) ^{ab}	0.05
SGR, %	1.36 (0.01) ^a	1.39 (<0.01) ^{ab}	1.42 (0.03) ^{ab}	1.38 (0.02) ^{ab}	1.44 (0.02) ^b	1.40 (0.02) ^{ab}	1.43 (0.01) ^{ab}	0.05
TGC	3.62 (0.04) ^a	3.72 (0.02) ^{ab}	3.82 (0.10) ^{ab}	3.68 (0.07) ^{ab}	3.90 (0.06) ^b	3.74 (0.04) ^{ab}	3.84 (0.02) ^{ab}	0.05
Fôr inntak, g/d/fish	4.84 (0.1)	4.80 (0.06)	5.12 (0.23)	4.99 (0.14)	5.21 (0.11)	5.03 (0.04)	5.16 (0.07)	Ns
Fôr inntak, %/BW/d	1.02 (0.01)	0.99 (0.01)	1.03 (0.03)	1.04 (0.01)	1.04 (0.01)	1.03 (0.01)	1.04 (0.02)	Ns
FCR	0.79 (0.01)	0.75 (<0.01)	0.78 (0.02)	0.80 (<0.01)	0.77 (<0.01)	0.78 (<0.01)	0.78 (0.02)	Ns

¹Signifikante forskjeller er angitt med ulike bokstaver, P < 0.05. ns = not significant.

² D1 og D5 er signifikant forskjellig, p < 0.08, post-hoc test.

Appendiks A4. Makromineraler i hel fisk ved mellomuttak (6 uker) og sluttuttak (13 uker)

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	ANOVA
Løselig P (g P kg ⁻¹)	5.0	7.0	9.0	11.0	9.0	9.0	9.0	p ¹ <
6 uker								
Aske	1,64	1,77	1,77	1,74	1,74	1,79 ²	1,73	0,10
Ca	2233 ^a	3103 ^{b3}	2910 ^{ab}	2860 ^{ab}	2567 ^{ab}	2917 ^{ab}	3063 ^{b3}	0,05
P	3600 ^a	4193 ^{b4}	4107 ^{ab}	4067 ^{ab}	4247 ^b	4127 ^{ab}	4257 ^b	0,05
Mg	339	355	361	360	334	350	351	ns
Ca:P	0,62	0,74	0,71	0,70	0,61	0,71	0,72	ns
13 uker								
Aske	1,58 ^a	1,64 ^{ab}	1,61 ^{ab}	0,70 ^{ab}	1,63 ^{ab}	1,68 ^b	1,69 ^b	0,05
Ca	2200	2670	2693	2150	2613	2160	2713	Ns
P	3777	4033	4100	3827	4090	3867	4177	Ns
Mg	332	339	341	337	342	340	357	Ns
Ca:P	0,58	0,66	0,66	0,56	0,63	0,56	0,65	Ns

¹Signifikante forskjeller er angitt med ulike bokstaver, P < 0.05. ns = not significant.

² p<0.06; D6 ≠ D1 ³ p<0.06; D2 og D7 ≠ D1 ⁴ p<0.08; D2 ≠ D1

Appendiks A5. Makromineraler i ryggbein ved mellomuttak (6 uker) og sluttuttak (13 uker)

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	ANOVA
Løselig P (g P kg ⁻¹)	5.0	7.0	9.0	11.0	9.0	9.0	9.0	P ¹ <
6 uker								
Ca	49800	56767	55733	54800	54833	56467	54633	ns
P	26200	28900	27533	28600	28267	27733	27900	ns
Mg	655	753 ²	732	720	722	746 ³	704	0,07
Ca:P	1,90	1,96	2,03	1,91	1,94	2,04	1,96	ns
13 uker								
Ca	48167	50633	52500	50433	51500	53500	52467	ns
P	27600	29833	31267	32467	31033	32467	31167	ns
Mg	614	662	704	674	682	742	711	ns
Ca:P	1,75	1,71	1,69	1,55	1,68	1,65	1,68	ns

¹ Signifikante forskjeller er angitt med ulike bokstaver, P < 0.05. ns = not significant. ² p<0.06; D2 ≠ D1 ³ p<0.08; D6 ≠ D1

Appendiks A6. Makromineraler i skjell ved sluttuttak (13 uker)

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	ANOVA
Løselig P (g P kg ⁻¹)	5.0	7.0	9.0	11.0	9.0	9.0	9.0	P ¹ <
13 uker								
Ca	33150 ^a	38300 ^{ab}	37733 ^{ab}	39300 ^{b2}	36800 ^{ab}	38667 ^{ab}	40733 ^b	0,05
P	19850 ^a	23767 ^{b3}	23400 ^{ab}	23333 ^{ab}	22633 ^{ab}	23833 ^{b3}	24367 ^b	0,05
Mg	819	978	965	1023	969	969	991	Ns
Ca:P	1,67	1,61	1,61	1,68	1,63	1,62	1,67	Ns

¹ Signifikante forskjeller er angitt med ulike bokstaver, P < 0.05, ns = not significant.

² p<0.08; D4 ≠ D1

³ p<0.10; D2 og D6 ≠ D1

Appendiks A7. Fordøyelighet av total P og løselig P, samt P retensjon i laks

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	ANOVA
Løselig P (g P kg ⁻¹)	5.0	7.0	9.0	11.0	9.0	9.0	9.0	P ¹ <
Fordøyelighet								
Total P	46,2 (2,7) ^a	43,7 (4,7) ^a	35,5 (2,9) ^{ab}	26,7 (5,3) ^b	37,7 (7,6) ^{ab}	40,4 (0,2) ^a	40,0 (3,7) ^a	0,01
Løselig P	77,7 (4,5) ^a	68,0 (5,7) ^{ab}	67,8 (7,9) ^{ab}	57,9 (1,6) ^{bc}	55,3 (6,5) ^{bc}	56,3 (10,1) ^{bc}	63,0 (4,0) ^{ac}	0,01
P utnyttelse								
P retensjon, % av P spist	46,2 (2,7) ^a	43,7 (4,7) ^a	35,5 (2,9) ^{ab}	26,7 (5,3) ^b	37,7 (7,6) ^{ab}	40,4 (0,2) ^a	40,0 (3,7) ^b	0,01
P retensjon, g P/kg vekst	3,20 (0,23)	3,53 (0,39)	3,64 (0,35)	3,55 (0,50)	3,66 (0,72)	3,64 (0,01)	3,74 (0,23)	ns

¹ Signifikante forskjeller er angitt med ulike bokstaver, P < 0.05, ns = not significant.

