

# **Ernæringsbehov og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk**

## **Del 2: Rognkjeks**

Ingrid Lein, Gerd Marit Berge, André Sture Bogevik, Kristin Hamre, Grete Hansen Aas, Trond Kortner, Katerina Kousoulaki, Åshild Krogdahl, Sofie Remø og Øystein Sæle





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

Nofima har om lag 370 ansatte.

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

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1431 ÅS

**Stavanger:**

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

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunnalsøra:**

Sjølsengvegen 22  
NO-6600 Sunndalsøra

**Alta:**

Kunnskapsparken, Markedsgata 3  
NO-9510 Alta

**Felles kontaktinformasjon:**

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

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

# Rapport

<p><i>Tittel:</i> <b>Ernæringsbehov og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk Del 2 Rognkjeks</b></p>	<p>ISBN 978-82-8296-691-7 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Nutritional needs and feeding for optimal health and survival of cleanerfish</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 28/2021</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Ingrid Lein, Gerd Marit Berge, André Sture Bøgevik, Kristin Hamre (HI), Grete Hansen Aas (NTNU Ålesund), Trond Kortner (NMBU Veterinærhøgskolen), Katerina Kousoulaki, Åshild Krogdahl (NMBU Veterinærhøgskolen), Sofie Remø (HI) og Øystein Sæle (HI)</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b></p> <p><i>Dato:</i> 23.09.2021</p>
<p><i>Avdeling:</i> Produksjonsbiologi</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 75</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 901331</p>
<p><i>Stikkord:</i> Rensefisk, berggylt, rognkjeks, ernæring, hovednæringsstoff, mikronæringsstoff, lipid, katarakt, fordøyelse og tarmfunksjon</p>	<p><i>Prosjektnr.:</i> 12034</p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p> <p>Rognkjeks har et velutviklet tarmsystem, men pH i magen faller først ved 1,0-1,5 gram. Rognkjeksen bør derfor tilbys agglomerert eller kaldekstrudert fôr fram til denne størrelsen.</p> <p>Fôr med 55 % protein, 17 % fett og 6 % karbohydrat ga raskest vekst, mens høyere og lavere proteinnivå ga suboptimal immunrespons. Høyt nivå av fett i fôret ga høyt nivå av fett i lever, muskel og i blindtarmene.</p> <p>Rognkjeks har høy kapasitet til å fordøye fett, medium kapasitet for protein, og lav for karbohydrater. Det kan være nødvendig å tilsette mer kolin i fôrene for å bedre transporten av fett fra tarm til lever og kropp. Veksten kan til en viss grad styres ved å bytte fett mot karbohydrater, men konsekvensen av ulik kroppssammensetning bør undersøkes.</p> <p>Behovet for vitamin C er trolig høyere enn for laks (&gt;360 mg/kg), mens behovet for andre mikronæringsstoffer tilsvarer behovet hos andre arter. Ekstra antioksidanter reduserte alvorlighetsgraden av katarakt noe. Finjustering av vitamin C, vitamin E og astaxantin og andre antioksidanter og utvalgte mineraler er nødvendig. Den høye forekomsten av katarakt i prosjektet tyder på en bør tenke nytt i forhold til fôrsammensetning for rognkjeks, bl.a. undersøke om mindre næringstette fôr gir bedre osmoregulering og dermed mindre katarakt.</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p> <p>The aim of this study was to provide new knowledge about nutritional needs of the cleaner fish species ballan wrasse and lumpfish.</p>	

## Forord

Prosjektet «**Ernæringsbehov og fôring for optimal helse og overlevelse av rensefisk**» ble opprettet med bakgrunn i et innspill til FHF fra Nofima, Nifes (nå HI), NMBU og NTNU Ålesund. Endelig prosjektbeskrivelse ble utformet etter innspill fra referansegruppen utnevnt av FHF.

Det har vært et stort og omfattende prosjekt, med mange forsøk og omfattende analysearbeid. Vi har derfor valgt å dele rapporten i to, en på rognkjeks og en på berggylt. Kapittel 2 – Innledning, og Kapittel 3 – Problemstilling og formål er identisk i de to rapportene.

Prosjektet har hatt et totalbudsjett på 22.915.000 kr, alt finansiert av FHF.

Finansiert av:



FOU-partnere:



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet



# Innhold

<b>1</b>	<b>Sammendrag (både på norsk og engelsk)</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>3</b>
2.1	Faglig bakgrunn for prosjektet .....	3
2.2	Prosjektets omfang.....	4
2.3	Prosjektorganisering.....	5
2.3.1	Nøkkelkompetanse, ansvar og roller til personer i prosjektgruppen: .....	5
<b>3</b>	<b>Problemstilling og formål</b> .....	<b>7</b>
3.1	Prosjektets effektmål .....	7
3.2	Prosjektets resultatmål .....	7
3.2.1	Hovedmål .....	7
3.2.2	Resultatmål for rognkjeks.....	7
3.2.3	Resultatmål for berggylt.....	8
3.3	Nytteverdi.....	8
<b>4</b>	<b>Prosjektgjennomføring og resultater – forsøk med rognkjeks</b> .....	<b>9</b>
4.1	Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks .....	9
4.1.1	Materiale og metoder .....	9
4.1.2	Resultat.....	13
4.1.3	Diskusjon .....	16
4.1.4	Konklusjon .....	17
4.2	Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks; tarmhelse og fordøyelighet .....	18
4.2.1	Materiale og metoder .....	18
4.2.2	Resultat.....	20
4.2.3	Diskusjon .....	30
4.2.4	Konklusjon .....	32
4.3	Mikronæringsstoff i fôr til rognkjeks .....	32
4.3.1	Materiale og metoder .....	33
4.3.2	Resultat og vurdering .....	37
4.3.3	Diskusjon .....	53
4.3.4	Konklusjon .....	54
4.4	Katarakt .....	54
4.4.1	Materiale og metoder .....	55
4.4.2	Resultat og vurdering .....	57
4.4.3	Diskusjon .....	65
4.4.4	Konklusjon .....	66
<b>5</b>	<b>Oppnådde resultater</b> .....	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Hovedfunn</b> .....	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Leveranser</b> .....	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>72</b>



## 1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

Prosjektet har hatt som hovedmål å styrke kunnskapsgrunnlaget innen ernæring av rensefisk, og med dette bidra til å utvikle fôr som sikrer produksjon av rensefisk med god overlevelse, helse og velferd, noe som er en forutsetning for at rensefisken skal fungere effektivt som lusespisere.

Det var større effekt av balanse mellom hovednæringsstoff for fisk fra 15-50 g enn for fisk på 1,7-10 g. Fôr med 55 % protein, 17 % fett og 6 % karbohydrat ga raskest vekst hos rognkjeks fra 15-50 gram. Fôr med høyere (68 %) og lavere (48 %) proteinnivå ga sub-optimal immunrespons, og anbefales derfor ikke. Fôret som ga raskest vekst hos rognkjeks fra 15-50 g resulterte imidlertid i svært høyt fettinnhold i muskel, lever og plasma. Fettet fortrengte vann i lever og muskel og i tillegg protein og muligens andre komponenter i lever. Vi kjenner ikke konsekvensen av det høye fettinnholdet.

Kartleggingen av tarmen viste strukturelle egenskaper som observert hos mange fiskearter, men med noen særegne trekk. Blindsekkene viste klare tegn på steatose som økte med økende fettinnhold i fôret, en indikasjon på liten tilførsel av kolin eller andre essensielle næringsstoffer som er nødvendige for utnyttelsen av kolin. Midttarmen hadde størst kapasitet for fordøyelse og absorpsjon av næringsstoffer. Innholdet av fordøyelsesenzymer i tarmen viste tilpasninger til fôrets sammensetning, tydeligst i midttarmen. Det samme gjaldt ekspresjon av immungener, og gener involvert i barriere- og strukturfunksjoner. Et fordøyelighetsforsøk viste høy kapasitet til å fordøye fett, med et gjennomsnitt godt over 90 %. Proteinfordøyeligheten var middels god (83 %). Kapasiteten til å fordøye stivelse var sterkt påvirket av nivåer i fôret, med en redusert fordøyelighet fra 84 til 57 % når en økte stivelsesnivået i fôret fra 7 til 12 %.

Behovet for vitamin C er antagelig høyere hos rognkjeks enn hos laks, mens behovet for de fleste andre vitaminene og mineralene ser ut til å ligge på lignende nivå som hos andre arter. For mange av mikronæringsstoffene var det høye nok nivå i fôrråstoffene. Mineraler er ofte giftige over et visst nivå, der de begynner å akkumulere i fisken. Vi har estimert et maksnivå for jod, jern og mangan i dette prosjektet. Biotin var også antagelig tilsatt over maksnivå, men vi kjenner ikke til giftigheten til dette vitaminet. Tilsetning av antioksidanter i fôret ser ut til å redusere alvorlighetsgraden av katarakt hos rognkjeks, men det vil være nødvendig å finjustere konsentrasjoner og forholdsmessig tilsetning av vitamin C, E og astaxantin, sammen med andre antioksidanter og utvalgte mineraler.

Histidin og taurin påvirket metabolismen, men effekten på utvikling av katarakt er uklar. Behovet for histidin og taurin hos rognkjeks er ikke kjent, og i dette forsøket ble kun ekstremer, dvs. lave og høye nivåer testet. Alle fôrsammensetningene som ble testet ga høy andel fisk med katarakt. En vei videre kan være å undersøke om mindre næringstette fôr gir bedre osmoregulering, og med det mindre katarakt.

Dette har vært et pionerprosjekt når det gjelder næringsbehov hos rensefisk, og bidrar med åpent tilgjengelig grunnleggende kunnskap om ernæring av rognkjeks som kan brukes i formulering av fôr til rognkjeks. Det vil likevel være behov for videre arbeid for å få mer utfyllende kunnskap om næringsbehovene hos denne arten.

## English summary

The aim of this study was to provide new knowledge about nutritional needs of the cleaner fish species lumpfish. The report describes effects of macronutrient balance, level of micronutrients and, antioxidant and amino acids on fish performance, gut health and function, immune response and prevalence and severity of eye cataract.



## 2 Innledning

### 2.1 Faglig bakgrunn for prosjektet

*Prosjektet har hatt som hovedmål å styrke kunnskapsgrunnlaget innen ernæring av rensefisk, og med dette bidra til å utvikle fôr som sikrer produksjon av rensefisk med god overlevelse, helse og velferd, noe som er en forutsetning for at rensefisken skal fungere effektivt som lusespisere.*

Rensefisk er en viktig ikke-medikamentell ressurs i bekjempelse av lakselus. I dag benyttes både villfanget og oppdrettet rensefisk i laksemerdene. Det gjøres en kraftig innsats for å øke produksjonen av oppdrettet rensefisk med mål om å dekke næringens behov. Rognkjeks og berggyll er de to artene det satses på. Derfor er det for disse artene kunnskapsbehovet er mest akutt og der innsatsen bør konsentreres når det gjelder ernæring og fôring.

Riktig fôrsammensetning og fôringsstrategi er blant de fundamentale forutsetningene for god funksjon, helse og velferd hos alle dyr i fangenskap. Kunnskap om fôr og ernæring til rensefisk var i utgangspunktet mangelfull, og det var derfor tvingende nødvendig å styrke dette kunnskapsgrunnlaget. Økt kunnskap om fôr og ernæring kan bidra til at oppdrettet rensefisk etter hvert kan dekke laksenæringens behov, slik at det ikke blir nødvendig å benytte villfanget fisk i laksemerdene. Dette vil være positivt i forhold til forvaltning av ville bestander av leppefisk, og samtidig sikre bedre kontroll med helse og velferd, noe som vil bidra til å bedre næringens omdømme.

Rognkjeks og berggyll er to arter med svært ulike fordøyelsessystem, noe som kan føre til forskjellige krav til fôr for de to artene. Mens berggyll mangler magesekk og blindtarm, og har en kort tarm, har rognkjeks både mage, blindsekk og en relativt lang tarm. Rognkjeks har et godt utviklet fordøyelsessystem allerede ved klekking, og kan startfôres direkte på formulert fôr. Berggylllarver har mindre størrelse, og er mindre utviklet ved startfôring, og må derfor startfôres med levende fôr. Rognkjeks er lite kresen, og ser ut til å akseptere de fleste aktuelle ingrediensene. Ved overgang til tørrfôr har berggyll vist seg å være svært kresen med hensyn til smakelighet på fôret, noe som har medført at fôr til berggylltyngel produseres ved bruk av utvalgte marine ingredienser av høy kvalitet, og dermed høye kostnader (Kousoulaki et al., 2015; Kousoulaki et al., 2021).

En god tarmfunksjon og helse er av avgjørende betydning for ethvert dyrs produksjon, helse og motstandskraft mot sykdom. Tarmen inneholder det største og kanskje mest komplekse immunogene organet i en dyreorganisme. Den har også en rekke andre strukturer og mekanismer som bidrar til at stoffer og organismer som kan true funksjon og helse, nøytraliseres. Tarmens immunforsvar kommuniserer aktivt med andre organer som utøver barrierefunksjoner som gjeller og skinn og også med hodenyre og milt. Det er derfor viktig å studere og dokumentere hvordan endringer i fôrsammensetning, fôringsregime og fôrets tekniske kvalitet kan påvirke disse funksjonene.

Rognkjeks kan vokse svært hurtig, noe som ikke nødvendigvis er positivt. Fisken blir raskt for stor til å fungere effektivt som lusespiser i merd. Berggyll vokser derimot sakte, noe som anses som positivt i sjøfasen fordi den kan følge laksen gjennom hele produksjonen. Det er viktig å ta hensyn til at forskjellige arter har forskjellig behov, og dessuten at næringsbehov er en dynamisk størrelse som varierer med fôrfaktor, veksthastighet, livsstadium og miljøforhold.

Robust rognkjeks og berggylt med solid helse og ernæringsstatus er målet. Dette innebærer lav dødelighet og lite deformiteter i produksjonssyklusen, og er en forutsetning for at rensefisken skal trives i laksemerdene og gjøre jobben sin der. Dagens fôr blir hovedsakelig formulert ut fra antatt minimumsbehov for næringsstoffer, basert på erfaringer og kunnskaper om andre fiskearter og analyser av villfisk av samme art (Hamre et al., 2013). Kunnskap om optimal sammensetning av fôr omfatter både balanse mellom hovednæringsstoffer, og behov for essensielle næringsstoffer og mikronæringsstoffer. Det er også viktig å kjenne behovet for energi i forhold til protein, slik at man kan legge til rette for optimal tilvekst for den enkelte art.

Denne type studier er svært ressurskrevende både med hensyn til gjennomføring av forsøk, fôrproduksjon, analyser og arbeidstimer. Prosjektet har derfor prioritert å legge ressursene på å klarlegge behov for makro- og mikronæringsstoffer, samt studier av hvordan de ulike fôrene påvirker fiskens tarmhelse og immunforsvar. For berggylt var også undersøkelse av alternative råstoffer til fôr et viktig tema.

Vi har valgt å vektlegge begge artene omtrent likt med hensyn til forsøksarbeid, selv om produksjonen av rognkjeks pr i dag er størst og kunnskapen om arten er minst. Dette fordi berggylt regnes som den mest effektive rensefisken av alle artene som i dag er i bruk, og den er også lite utsatt for sykdom. Utfordringen med å produsere et fôr som fungerer godt for berggylt er en viktig årsak til at produksjonen av berggylt er liten sammenlignet med rognkjeks. Dersom en lykkes med målene i dette prosjektet vil produksjonen av berggylt kunne forenkles og effektiviseres. Når det gjelder fôr og fôring i merd har vi lagt opp til at vi på bakgrunn av resultatene fra forsøkene som gjennomføres i prosjektet skal kunne designe fôr som er egnet for både rognkjeks og berggylt i sjø.

## 2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet startet i 2017, og avsluttes i 2021. Fordi en har jobbet med to arter som er nye i oppdrett har en støtt på enkelte utfordringer med tilgang og kvalitet på forsøksfisk noe som har medført forsinkelser. FHF har derfor innvilget en utsettelse på avslutning av prosjektet på ca. 1 år. Næringen (Mowi, Salmar, Havlandet Marin Yngel, Skjærneset fisk, og Lumarine AS) har raust bidratt med forsøksfisk av både rognkjeks og berggylt, og i tillegg øyerogn av rognkjeks for produksjon av forsøksfisk ved Nofima.

Prosjektet har totalt omfattet syv forsøk:

AP 1: Fôrteknologi og pelletkonsistens for berggylt.

AP 2.1: Fett i fôr til berggylt: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av fett, ulik andel fosfolipider, og type fosfolipid påvirket tilvekst, velferd og helse hos berggylt.

AP 2.2: Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks: Forsøket undersøkte hvordan balansen mellom protein, fett og karbohydrat i fôret påvirker tilvekst, velferd og helse hos rognkjeks fra 1 til 40 gram.

AP 3.1: Mikronæringsstoff berggylt: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av mikronæringsstoffer i fôret påvirker tilvekst, velferd og helse hos berggylt.

AP 3.2: Mikronæringsstoff rognkjeks: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av mikronæringsstoffer i fôret påvirker tilvekst, velferd og helse hos rognkjeks.

AP 4.1: Råvarer i fôr til berggyllt: Forsøket undersøkte om alternative råvarer kan brukes i stedet for dyre råvarer som reke og torskemuskel.

AP 5: Katarakt: Forsøket undersøkte hvordan ulike nivåer av enkelte aminosyrer, vitaminer og astaxanthin påvirker utvikling av katarakt hos rognkjeks.

AP 6: Tarmhelse og immunforsvar: I denne arbeidspakken er tarmfunksjon, tarmhelse og immunforsvar blitt undersøkt ved prøver fra flere av forsøkene.

## **2.3 Prosjektorganisering**

Prosjektet er ledet av Nofima som har hatt det administrative ansvaret overfor FHF. Det har vært et tett samarbeid mellom partnere på tvers av ansvarsområder og arbeidspakker. Prosjektet har en relativt stor referansegruppe, dette med bakgrunn i den store interessen fra næringen for prosjektet ved oppstart.

Prosjektet er resultat av diskusjoner mellom forskere ved Nofima, Nifes/Havforskningsinstituttet, NMBU Veterinærhøgskolen og NTNU Ålesund, og bygger på kunnskapsbehov som er definert både av næringsaktørene selv, og av forskningsmiljøene.

Alle de totalt sju fôringsforsøkene er utført ved Nofima sin forskningsstasjon på Sunndalsøra. Alle forsøksfôr er produsert ved Nofima sitt fôrteknologisenter i Bergen.

Havforskningsinstituttet (tidligere Nifes) har hatt ansvar for næringsstoffanalyser, og NMBU Veterinærhøgskolen har hatt ansvaret for analyser av tarmfunksjon og -helse.

Diskusjon og rapportering av resultater har vært et samarbeid mellom partnerne.

NTNU Ålesund skulle opprinnelig delta i arbeid med rensefisk i laksemerder i sjø, men på grunn av høye kostnader med de mer grunnleggende forsøkene på land ble forsøksaktivitet i sjø tatt ut av prosjektplanen etter diskusjoner med FHF og referansegruppen. NTNU Ålesund har derfor kun deltatt som diskusjonspartner i faser av prosjektet.

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

#### **Nofima:**

Ingrid Lein: Oppdrett av marin yngel, inkludert rensefisk  
Gerd Marit Berge: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk,  
Katerina Kousoulaki: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk  
Andre Sture Bogevik: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk  
Grete Bæverfjord: Fiskehelse og røntgenanalyser

#### **HI (Nifes):**

Øystein Sæle: Fiskeernæring marin fisk  
Kristin Hamre: Fiskeernæring, marin fisk og laksefisk  
Sofie Remø: Fiskeernæring, helse og velferd  
Elisabeth Holen: Immunologi

**NMBU-Veterinærhøgskolen:**

Åshild Krogdahl: Ernæring, tarmfunksjon og helse hos fisk

Trond Kortner: Ernæring, tarmfunksjon og helse hos fisk

Elvis Chikwati: Histopatologi og tarmhelse

PhD-student Weiwen Zhou: Ernæring, tarmfunksjon og helse hos fisk

**NTNU Ålesund:**

Grete Hansen Aas: Fiskeernæring og -velferd

**Referansegruppe ved avslutning av prosjektet:**

Kjetil Heggen - Lerøy Seafood Group ASA – leder av referansegruppen

Pål Skjold - Lerøy Seafood Group ASA

Helge Staven – SalMar ASA

Nina Iversen – Namdal Rensefisk AS

Henriette Glosvig – Mowi Norway AS

Unni Austefjord – Mowi Norway AS

Henny Førde – Måsøval Fiskeoppdrett AS

Halvard Hovland – Havlandet Marin Yngel AS

Det har vært noe utskiftning av medlemmer i referansegruppen i løpet av prosjektperioden.

### **3 Problemstilling og formål**

#### **3.1 Prosjektets effektmål**

Bruk av rensefisk har vært, og er, en viktig brikke i bekjempelse av lakselus, men det har over flere år vært problematisk at dødeligheten har vært høy for både rognkjeks og berggylt. Det er derfor nødvendig å skaffe kunnskap om alle faktorer som kan bidra til bedre velferd, helse og overlevelse hos rensefisk. Ernæring er sannsynligvis en av de viktigste faktorene, og mer kunnskap på dette området vil kunne medvirke til produksjon av rensefisk som fungerer bedre som lusespisere. Bedre velferd og overlevelse hos rensefisken er også en forutsetning for å få fortsatt samfunnsmessig aksept for å bruke rensefisk i laksemerdene framover.

Kunnskap om ernæringsbehovet hos dyr i oppdrett er grunnleggende for å kunne produsere friske dyr. Åpent tilgjengelig kunnskap om ernæring av rensefisk har vært begrenset, derfor forventes det å ha det stor nytteverdi at prosjektet framskaffer slik kunnskap. Dette vil kunne bidra til et bedre grunnlag for produksjon av fôr som næringen kan ta i bruk.

Prosjektet skal komme næringen til nytte ved å:

- Bidra til økt overlevelse, helse og velferd hos rognkjeks og berggylt gjennom optimalisering av fôrsammensetning.
- Gi kunnskap om artsspesifikke ernæringsbehov hos rognkjeks og berggylt.
- Bidra til å bedre næringens omdømme gjennom bedre overlevelse, helse og velferd hos rensefisken.
- Bidra til at næringen på en forsvarlig måte blir selvforsynt med oppdrettet rensefisk med god overlevelse og helse.
- Prosjektet vil gi informasjon som kan benyttes direkte i produksjonen av fôr til rensefisk.
- Prosjektet skal bidra til bedre overlevelse og helse hos rensefisken, og dermed bidra til bedre resultat hos oppdrettere både av rensefisk og laks.

#### **3.2 Prosjektets resultatmål**

##### **3.2.1 Hovedmål**

Prosjektet har som mål å styrke kunnskapsgrunnlaget innen ernæring og fôring for å kunne utvikle fôr og fôringsstrategier som sikrer at vi produserer rensefisk med god overlevelse, helse og velferd, og som fungerer effektivt som lusespisere.

##### **3.2.2 Resultatmål for rognkjeks**

- 1) Klarlegge effekter av ulik balanse mellom protein, fett og karbohydrater gjennom flere livsstadier hos rognkjeks.
- 2) Klarlegge behov for vitaminer og mineraler hos rognkjeks.
- 3) Klarlegge faktorer i fôr som kan påvirke rognkjeksens evne til osmoregulering, spesielt med tanke på katarakt.

### **3.2.3 Resultatmål for berggylt**

- 1) Klarlegge hvordan ulike teknologier i fôrproduksjonen påvirker vekst og utvikling hos berggylt, med spesiell vekt på tilvekst, overlevelse og utvikling av deformiteter.
- 2) Undersøke effekter av fettinnhold og -kvalitet i fôr til berggylt.
- 3) Klarlegge behov for vitaminer og mineraler hos berggylt.
- 4) Undersøke alternative råvarer i fôr til berggylt, for om mulig å kunne produsere billigere fôr.

### **3.3 Nytteverdi**

Prosjektet har gitt ny kunnskap som vil bidra til bedre tilpasset fôr til både berggylt og rognkjeks. Det har kommet fram ny kunnskap om behov for hovednæringsstoffer og mikronæringsstoffer hos begge arter. For rognkjeks er det kommet ny kunnskap om effekt av antioksidanter og aminosyrer i fôret på katarakt. For berggylt er også alternative, og billigere fôrråstoffer undersøkt i tillegg til effekt av prosesseringsmetoder i forbindelse med produksjon av fôr til tidlige stadier hos berggylt. Det siste viste at ekstrudering av fôret ved lavere temperatur enn standard har svært positiv effekt på overlevelse og beinutvikling hos berggylt. Denne informasjonen er allerede tatt i bruk hos kommersielle produsenter av fôr til rensefisk.

Det må understrekes at dette er blant de første systematiske ernæringsstudiene som har vært utført med rognkjeks og berggylt. Arbeidet har delvis vært påvirket av at kvaliteten på forsøksfisk ikke har vært tilfredsstillende, og dette kan til en viss grad ha påvirket resultatene. Likevel mener prosjektgruppen at dette er et pionerarbeid som har resultert i mye ny og grunnleggende kunnskap om ernæring hos disse to artene som kan benyttes inn mot både forskning og kommersiell produksjon av fôr til rensefisk.

## 4 Prosjektgjennomføring og resultater – forsøk med rognkjeks

Alle fôringsforsøk med rognkjeks er utført ved Nofimas forskningsstasjon på Sunndalsøra, i småskala enheter. Dette ble valgt for å ha kontrollerte forhold i forsøkene, og med en forutsetning om at hovedtrekkene i næringsbehov vil være de samme også når fiskene overføres til merder i sjø. Forsøk med rognkjeks i laksemerder er mer krevende fordi mange ytre faktorer kan påvirke resultatene, og når formålet er å undersøke grunnleggende næringsbehov, var det ønskelig å redusere andre faktorer enn det som var knyttet til fôrsammensetning i disse forsøkene. Det vil senere være nødvendig å undersøke hvordan ulike miljøfaktorer også kan påvirke rognkjeksens næringsbehov.

Produksjon av forsøksfôr ble gjort ved Nofimas fôrteknologisenter i Bergen. Til rognkjeks ble det brukt varmekstrudert fôr som ble knust ned og siktet til ønskede størrelsesfraksjoner. Gjennomføring av prosjektet har vært avhengig av å kunne få forsøksfisk eller egg fra kommersielle aktører.

### 4.1 Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks

Dette forsøket skulle undersøke optimal sammensetning av fôr til rognkjeks, basert på vekst, kroppssammensetning, velferdsindikatorer og immunrespons. Arbeidet ble planlagt som to separate forsøk, forsøk 1 med liten fisk fra startfôring og fram til størrelse for vaksinerings (ca. 10 g), forsøk 2 med vaksinert fisk fra ca. 10 g fram til størrelse for utsett i laksemerder (40-50 gram). I utgangspunktet var det planlagt å produsere forsøksfôr til alle faser fra og med startfôring. Etter oppstart av forsøk med startfôringsklare larver ble det raskt klart at fisken vokste unormalt dårlig med vårt startfôr. En sammenligning med kommersielt startfôr viste at dette fôret (Otohime©), et kaldekstrudert fôr, ga langt bedre vekst den første perioden. Derfor gjorde vi målinger av pH i magesekk hos larver av ulik størrelse, og fant at rognkjeks først ved en vekt på 1-2 gram har lav nok pH til å fordøye og utnytte varmekstrudert fôr. Det ble derfor planlagt en ny oppstart av forsøk med liten rognkjeks hvor fisken ble startfôret med Otohime©, og forsøket med egne forsøksfôr ble startet når fisken var 1,7 gram.

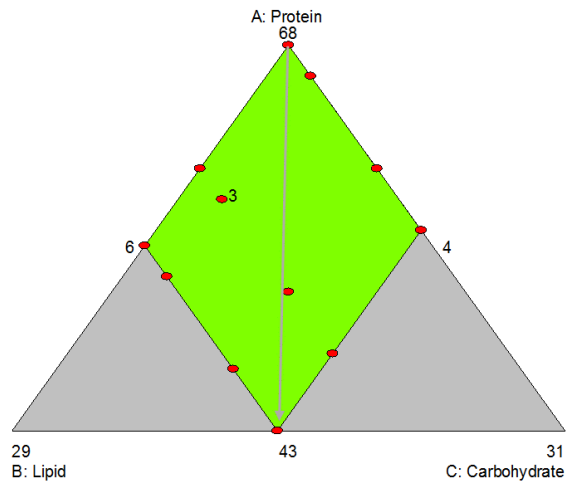
Detaljerte metoder og resultater fra forsøket vil bli publisert open access (Hamre et al., submitted).

#### 4.1.1 Materiale og metoder

##### *Forsøksdesign og fôr*

Begge forsøkene, både liten og stor fisk, ble gjennomført med et tre-komponent blandingsdesign (three-component mixture design, Cornell, 1990). Designet tillater at man kan ta inn tre forsøksfaktorer samtidig, her lipid, protein og karbohydrat, og se på effekter av hver faktor. Prinsippkisse for forsøksdesign er vist i Figur 1. Råvaresammensetning og kjemisk innhold i forsøksfôr er vist i Tabell 1.

Diet	Prot	Lipid	CH	SUM
1	68	4	6	78
2	60	12	6	78
3	55	17	6	78
4	66	4	8	78
5	58	12	8	78
6	53	17	8	78
7	60	4	14	78
8	52	12	14	78
9	47	17	14	78
10	56	4	18	78
11	48	12	18	78
12	43	17	18	78



Figur 1 Oversikt over trekant-design. Tabellen viser sammensetning av makronæringsstoffer i hvert av de 12 fôrene (% av våtvekt). Figuren viser spredning av fôrene innen det valgte (grønne) området på 68-43 % protein, 6-17 % fett og 4-18 % karbohydrat. Den grå pilen viser gradienten for proteininnhold. De røde punktene representerer hver sin diett, der ett fôr ble gitt til fisk i 3 kar, mens de andre 11 ble gitt til fisk i ett kar hver.



Tabell 1 Sammensetning av forsøksfôrene.

For nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Basisblanding:</b>												
Fiskemel	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50	24.50
Krill hydrolysat	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
Vitamin mix	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435	2.2435
Krill olje	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
Lysin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Kolin klorid	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Kolesterol	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Aquate	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Taurin	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Biomoss	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Carophyll Pink	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Yttrium oksyd	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
<b>Andre ingredienser:</b>												
Torskemuskel	30.5	26.1	23.3	28.4	24.0	21.2	23.4	19.1	16.3	20.0	15.6	12.9
Fiskeolje	0.05	7.90	12.85	0.10	7.95	12.90	0.35	8.15	13.00	0.50	8.25	13.10
Hvetegluten	30.50	26.10	23.33	28.38	23.98	21.20	23.43	19.08	16.30	19.95	15.58	12.85
Hvetemel	1.00	1.50	1.80	5.10	5.60	5.90	14.50	15.05	15.40	21.15	21.70	22.05
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.20	4.65	4.95	4.30	4.75	5.05	4.55	4.90	5.25	4.70	5.15	5.40
<b>Innhold analysert, g/100g as is</b>												
Protein	68.0	62.0	58.0	65.0	58.0	55.0	59.0	52.0	48.0	54.0	48.0	45.0
Fett	4.0	11.8	16.4	4.1	11.9	16.9	4.2	12.0	16.5	4.5	12.3	17.3
Karbohydrater	5.9	6.0	5.8	8.3	8.2	8.1	13.7	13.6	13.7	16.9	17.5	17.7
Aske	11.6	11.2	11.2	11.2	11.4	11.4	11.3	11.1	11.2	11.2	11.1	10.9
Tørrstoff	92.0	93.0	93.0	92.0	92.0	92.0	92.0	92.0	92.0	91.0	92.0	93.0

### *Forsøk med liten fisk (1,7 – 10 gram)*

Fisk til forsøket ble levert fra Lumarine AS på Tustna. Fisken ble satt ut direkte i 15 forsøkskar, samtidig som vekt og antall ble registrert. Forsøksenhetene var 150 liters grå, sirkulære (d=50cm) kar med konisk bunn. Karene var dekket med et gjennomsiktig lokk med åpning for fôring. Alle karene var utstyrt med belteautomater for utfôring, og et separat lyspunkt for hvert kar, plassert på lokket. Vann inn i karene var UV-behandlet og filtrert til 10 µm. Gjennomsnittlig vanntemperatur var 11,5 °C (10,1-12,0 °C), vanngjennomstrømming 4 l/minutt og oksygenmetning i utløp 80-100 %. Den første uka med tilvenning til karmiljø ble fiskene fôret med samme kommersielle fôr (Skretting) som de gikk på før levering til Nofima Sunndalsøra. Ved forsøksstart ble de satt over på 12 ulike forsøksfôr. Et «senterfôr» ble gitt til tre kar mens resten av fôrene ble gitt til ett kar hver, totalt 14 kar. I tillegg var det ett kontrollkar som fikk kommersielt fôr gjennom hele forsøksperioden.

Biomasse ved start var 570 gram pr kar, og gjennomsnittlig antall fisk var 508 per kar. Døde fisk ble fjernet daglig, antall og total vekt ble registrert. Antall og biomasse ble redusert i karene etter hvert som fisken vokste. Det ble tatt bulkvekter av fisk som ble tatt ut, og vektene ble brukt til å beregne tilvekst, og til å estimere fôrtildeling og pelletstørrelse videre i forsøket. Ved avslutning av forsøket ble det tatt prøver til analyser, og det ble gjort registrering av velferdsscore og forekomst av katarakt.

### *Forsøk med stor fisk (15 – 50 gram)*

Ferdig vaksinert (Amarine micro 4-2, Pharmaq©) fisk til forsøket ble tatt inn fra Lumarine AS. Etter vaksinering gikk fisken en uke i produksjonsanlegget før de ble transportert til Nofima Sunndalsøra. Det ble satt ut 90 fisk i hvert av 15 kar, 14 kar til forsøksfôr, som i forsøket med liten fisk, og ett kontrollkar som fikk kommersielt fôr (Atlantic Gold©, Skretting). Det ble brukt samme kartype som i forsøk med liten fisk. Gjennomsnittstemperatur i forsøksperioden var 9,9 °C (9,0-10,6 °C). Ved oppstart ble det registrert bulkvekt og antall for hvert kvar og fisken hadde en gjennomsnittsvikt på 14,8 gram. Fra samme fiskegruppe ble det tatt ut 25 individer der det ble gjort velferdsskår, registrering av katarakt, samt vekter av helkropp og lever.

### *Prøvetaking*

Til analyse av vekst og kroppssammensetning: For analyse av hovednæringsstoffer i muskel og lever ble det tatt ut 20 fisk per kar i forsøk 1 (liten fisk) og 6 fisk per kar i forsøk 2 (stor fisk). I forsøk 2 ble det også tatt blodprøver og prøver av bindevevslaget under skinnet. Hvert vev ble sammenslått for 10 fisk per kar i forsøk 1 og for 6 fisk per kar i forsøk 2 før analyse av hovednæringsstoffer og plasmakomponenter. Individvekt og -lengde ble målt på prøvefiskene pluss 20 fisk per kar

Til observasjon av katarakt og velferdsskår: Til dette ble det fra hvert kar tatt ut 25 fisker.

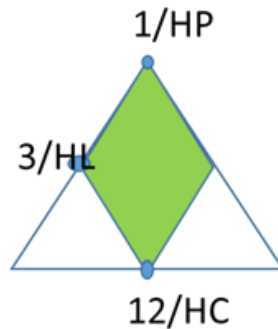
### *Analyser og statistikk*

Vanninnhold, protein, fett og aske ble målt ved hjelp av rutinemetoder på Havforskningsinstituttet. Karbohydrat ble estimert ved subtraksjon. Kortisol, laktat, glukose, magnesium kolesterol og triglyserider ble målt fotometrisk (Penta C400 HORIBA) ved Nofima, Sunndalsøra.

Katarakt ble målt ved hjelp av en split-lampe. Skåren på hvert øye var 0-4, slik at hver fisk fikk en skår på 0-8, avhengig av hvor stor del av hvert øye som var dekket med katarakt.

Data fra velferdsskåring ble analysert ved å beregne gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle fisk i hvert kar, og deretter summere gjennomsnittsverdiene til en sumindeks pr kar. Sumindeks ble deretter analysert statistisk på samme måte som andre registreringer per kar.

For å undersøke effekt av førsammensetning på immunrespons i rognkjeks ble immunceller fra hodenyre isolert fra fisk gitt tre ekstreme føer (Figur 2) og eksponert for lipopolysakkarid (LPS) for å simulere bakterieinfeksjon, og polyinosinic acid:polycytidylic acid (PIC) for å simulere virus-infeksjon. Uttrykk av en rekke gener som er kjent for å respondere på de nevnte infeksjonene ble målt, som uttrykk for immunresponsen.



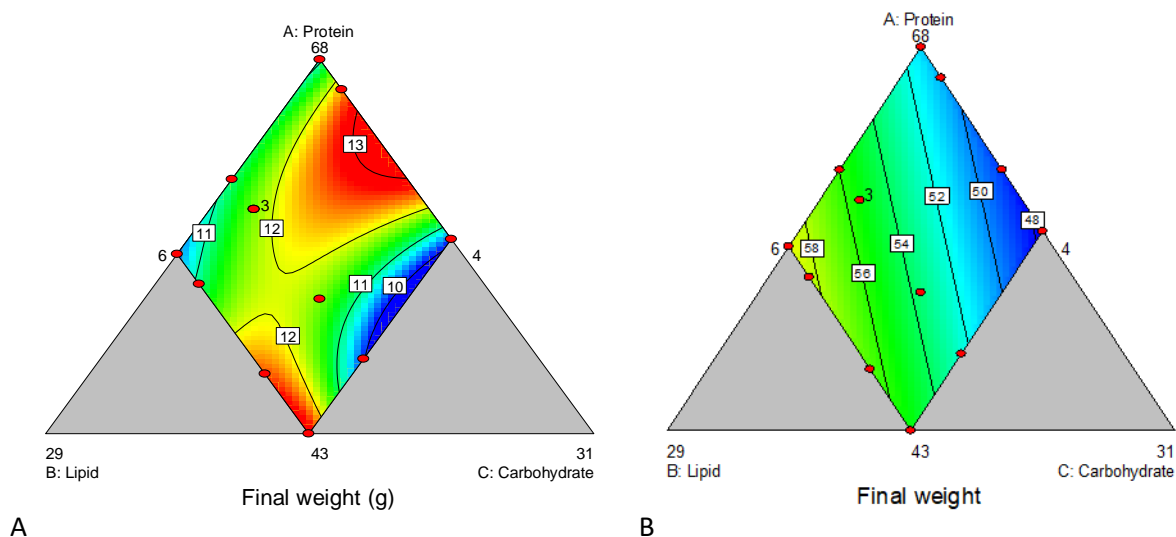
*Figur 2 Fisk gitt 3 ulike føer ved ytterkantene av designet ble brukt til måling av immunrespons i hodenyreceller: Diett 1/HP høyt protein; Diett 3/HL, høyt lipid, medium protein, lavt karbohydrat; Diett 12/HC, høyt karbohydrat, høyt fett og lavt protein.*

Modeller som beskriver respons på trekantdesignet, ble beregnet ved hjelp av programmet Design Expert version 8.04. Modeller ble tilpasset hvert datasett og den modellen som ga best og signifikant samsvar mellom data og funksjon ble valgt. Når ingen modell ga signifikant respons, ble datasettet presentert som gjennomsnitt og standardavvik. For identifikasjon av signifikante immunresponser ble to-veis ANOVA med Tukey's multiple comparison test, med føer og behandling med LPS eller PIC som uavhengige variabler, brukt til analysen. Innen en diett, blir alltid respons på behandling sammenlignet med diettens kontroll. Signifikansnivå  $p < 0.05$ .

#### **4.1.2 Resultat**

##### *Vekst*

Sluttvekt i forsøk 1 (Figur 3A) varierte mellom 10.1 og 12.7g, og datasettet ble tilpasset en «special cubic» modell ( $p=0.035$ ). Her var det to områder med høy vekst i forhold til resten av designet, og variasjonen i sluttvekt var relativt liten. I forsøk 2 (Figur 3B) varierte sluttvekten mellom 48 og 63 g og datasettet passet med en lineær modell med høy signifikans ( $p=0.002$ ). Det var høyest vekst på føret som inneholdt 55 % protein, 17 % fett og 6 % karbohydrat. De andre målene for vekst, som SGR og TGC ga lignende resultater som sluttvekt når det gjaldt tilpasning av modell og optimale førsammensetninger i forhold til rask vekst. Det var ingen systematisk variasjon i data på lengde og kondisjonsfaktor.

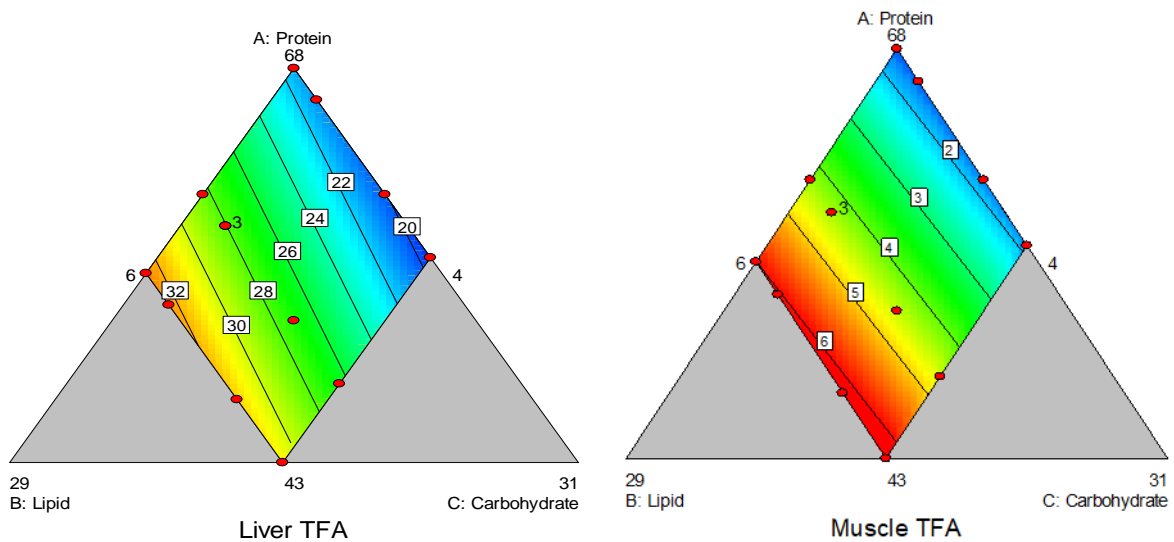


**Figur 3** Sluttvekt (g) hos rognkjeks i eksperiment 1 (1.7-10 g fisk, A) og 2 (15-50 g fisk, B). Tallene i de hvite firkantene viser vekt i gram. I forsøk 1 ble dataene tilpasset en «Special cubic» modell ( $p=0.035$ ), med to vekst maksima. I forsøk 2 passet dataene til en lineær modell ( $p=0.002$ ), med best vekst ved 55% protein, 17% fett og 6% karbohydrat.

#### Sammensetning av hovednæringsstoffer i vev hos rognkjeks

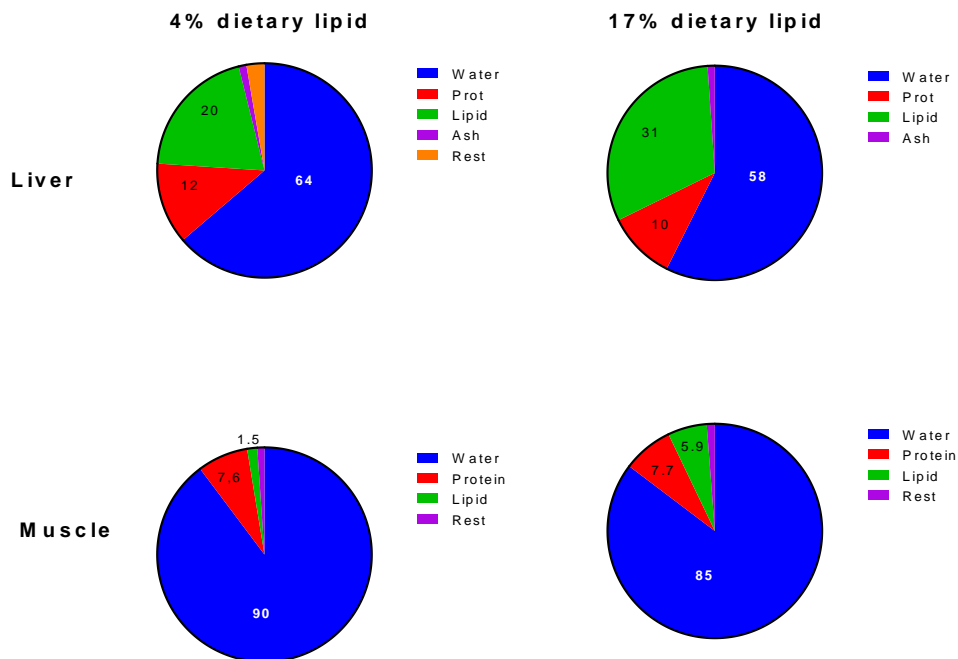
Variasjonen i fettinnhold i muskel og lever hos fisk fra sluttuttaket i forsøk 2 var henholdsvis 1.1-6.1 og 19-35 % av våtvekt (Figur 4). Begge fulgte lineære modeller med høy signifikans ( $p<10^{-4}$ ), som i hovedsak var styrt av mengde fett i fôret. I forsøk 1 med liten fisk, var modellene de samme ( $p<10^{-4}$ ), men med lavere totalt fettnivå (muskel 0.6-2.8 %, lever 10-25 %).

Variasjon i tørrstoff fulgte stort sett variasjonen i fett. Protein i leveren varierte mellom 10 og 13 % av våtvekt i begge forsøk og fulgte lineære modeller, med motsatt retning av fettinnholdet, det vil si med høyt protein når fisken var fôret med lite fett ( $p=0.011$  og  $p<10^{-4}$ , for henholdsvis liten og stor fisk). Protein i muskel viste liten eller ingen variasjon som funksjon av fôrsammensetning. Av plasmakomponentene målt i forsøk 2, var det kun triglyserider som viste signifikant systematisk variasjon fra 3.64 til 6.08 mmol/L. Datasettet ble tilpasset en lineær modell ( $p<10^{-4}$ ), med høyt triglyserid i plasma ved høyt nivå av fett i fôret.



Figur 4 Totale fettsyrer (TFA, representerer fettinnhold, % av våtvekt) i lever og muskel i forsøk 2, 15-50 g fisk. Begge datasett passet til lineære funksjoner ( $p < 10^{-4}$ ) med fett-nivå i fôret som den styrende faktoren.

Kroppssammensetningen hos rognkjeks var altså en tilnærmet lineær funksjon av fettinnholdet i fôret. Figur 5 viser sammensetning av muskel og lever ved ytterpunktene, høyt og lavt fett i fôret. Fett fortrenget vann i både muskel og lever når fisken ble fôret med høyt fett, men i leveren ble også protein og rest, som ble beregnet ved subtraksjon av vann, fett, protein og aske fra 100 %, og antatt å representere karbohydrat, fortrenget av fett.



Figur 5 Sammensetning (% av våtvekt) av muskel og lever hos fisk som hadde fått fôr med lavt og høyt fett i forsøk 2.

### *Katarakt, velferd og immunrespons*

Kataraktskår ble målt i forsøk 2. Ved start hadde 8 av 25 fisk skår 1, en fisk skår 2, resten 0. Ved slutten av forsøket hadde all fisken katarakt og skåren varierte mellom 3.6 og 5.7, uten at man kunne påvise systematisk effekt av fôrene.

Sum-indeks for velferdsskåring varierte mellom 4.25 og 6.4 i forsøk 1, men variasjonen var ikke systematisk (høyere sum-indeks betyr flere feil). Finneskader var den mest fremtredende feilen, med 0.55-2.55 per finnetype, mens kjeve, skinn og gjellelokk hadde skårer på 0-0.2. I forsøk 2 varierte sum-indeks mellom 4.8 og 6.8 og kun finneskader var påvist. I dette forsøket var det en trend med høyere sum-indeks (flere feil) ved lave nivå av fett ( $p=0.12$ ).

Hodenyreceller isolert fra rognkjeks fôret med fôrene HP, HL og HC (se materialer og metoder) ble stimulert med LPS og PIC. Responsen på virus-mimic var vanskelig å tolke, noe som har sammenheng med at det er første gang et slikt forsøk ble utført med rognkjeks. LPS stimulering ga normalt uttrykk av markører for bakterieinfeksjon (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) hos fisk som fikk fôr med høyt lipid (HL) og høyt karbohydratnivå (HC), men ikke hos fisk som fikk fôr med høyt proteinnivå (HP). Det var også indikasjoner på at fisk fôret med HC fôret hadde suboptimal immunrespons. Konklusjonene her er at fisk fôret med middels høye proteinnivå (rundt 55 %) hadde best immunrespons.

### **4.1.3 Diskusjon**

#### *Begrunnelse for bruk av tre-komponent blandingsdesign*

Når man skal undersøke behov for hovednæringsstoffene, støter man på den utfordringen at de utgjør en så stor del av fôret at når man forandrer på en av dem, fører det automatisk til forandring av en eller begge de to andre. Man har som oftest løst dette ved å designe forsøk der man varierer 2 av næringsstoffene mens man holder det tredje konstant eller ved å undersøke effekt av forholdet mellom protein- og energi-nivå. I begge tilfeller får man en endimensjonal x-akse, f.eks. forholdet mellom protein og fett når karbohydrat er konstant, og undersøker dermed bare utvalgte deler av den mulige variasjonen i fôret. Man må da gjøre flere forsøk for å få et helhetlig bilde. Når man bruker protein/energi design, antar man også at karbohydrat og fett kun bidrar i form av energi, selv om det er store forskjeller i f.eks. fordøyelighet og funksjon mellom dem. Ved å gjøre x-aksen to-dimensjonal som i tre-komponent designet, får man med alle mulige blandinger av de tre hovednæringsstoffene. Man får da en responsflate som er tredimensjonal og man kan lese ut effekten av hvert enkelt av de tre næringsstoffene og interaksjonene mellom dem. I vårt design har vi valgt ut variasjonsområde for hvert av hovednæringsstoffene og fordelt fôrene innenfor dette området (Figur 1).

#### *Vekst, kroppssammensetning, velferd og immunrespons*

Datasettene for vekst i forsøk 1 og 2 fulgte henholdsvis en «special cubic» og en lineær modell. Det var større effekter av fôr og høyere signifikans av modellen i forsøk 2 enn i forsøk 1. Dette kan tolkes som at fisken i forsøk 1 som var 1.7-10.0 g, i liten grad hadde utviklet preferanse for bestemte fôrsammensetninger. Det er velkjent at fiskelarver har et høyt behov for protein, og den større fisken i forsøk 2 (15-50g) hadde bedre vekst med høyt nivå av fett. Fisken i forsøk 1 var antagelig i en mellomfase mellom larvestadiet og påvekst-stadiet, hvor den forandret sine preferanser, dermed er vekstresultatet i forsøk 1 uklart.

I forsøk 2 var det en klar sammenheng mellom forsammensetning og vekst, der fisk fôret med høyt fett (17 %), lavt karbohydrat (6 %) og medium nivå av protein (55 %) hadde den raskeste veksten. Denne fisken hadde imidlertid svært høyt fettinnhold i muskel, lever og plasma. Fettet fortrenget vann i lever og muskel og i tillegg protein og muligens andre komponenter i lever. Fisk i alle gruppene utviklet likt og høyt nivå av katarakt, mens det var en tendens ( $p=0.12$ ) til at fisk gitt høyt fett hadde bedre velferdsskår. Fôrene med de høyeste og laveste proteinnivåene ga indikasjoner på suboptimal immunrespons. Konklusjonen på dette burde være at fôret med 55 % protein, 17 % fett og 6 % karbohydrat er best om man primært ønsker rask tilvekst, men vi kjenner ikke fullt ut konsekvensen av det høye fettnivået i fôret. Det har i ulike sammenhenger vært antydning at det høye innslaget av katarakt i rognkjeks kan ha sammenheng med osmotisk ubalanse og da er fortrenkning av vann en mulig risikofaktor.

Rognkjeks inneholder svært mye vann i muskel, lever og underhuds bindevevslag, sammenlignet med andre fiskearter. Dette kan sees på som en mekanisme for å bedre oppdriften, siden rognkjeks ikke har svømmeblære og er en langsom svømmer (Davenport and Kjørsvik, 1986). Akkumulering av fett i vevene vil ha samme funksjon. Det kan være krevende å opprettholde vann- og ionebalansen i sjøvann med en slik sammensetning. Egg fra oppdrettet rognkjeks hadde også høyere innhold av natrium og kalium, i tillegg til en rekke andre næringsstoffer, sammenlignet med egg fra villfisk (Hamre, 2016). I en epidemiologisk studie av katarakt i rognkjeks fant (Jonassen et al., 2017) at en del frie aminosyrer var til stede i høye nivå i muskel og øyelinsene hos oppdrettet i forhold til vill rognkjeks.

Den naturlige dietten til rognkjeks ser ut til å være svært forskjellig fra de fôrene vi tradisjonelt bruker til oppdrettsfisk. En hovedfagsoppgave (Haugland, 2001) undersøkte mageinnholdet fra 547 rognkjeks fanget i Nordøst-Atlanteren og fant at 83 % av tørrstoffet stammet fra maneter, 11 % fra krepsdyr mens 6% ikke kunne identifiseres. Maneter har typisk høyt vanninnhold (>95 %). I tørrstoffet utgjør aske gjerne ca. 70 %, protein ca. 20 % og fett ca. 10 %. Karbohydratinnholdet i maneter er svært lavt, noe som stemmer med resultatene fra forsøk 2, og asken har sannsynligvis lav biotilgjengelighet. Rognkjeks kan spise maneter tilsvarende sin egen kroppsvekt i løpet av et døgn (Haugland, 2001). Den fraksjonen av maneten som inneholder hovednæringsstoffene ligner litt på det fôret som ga best vekst i forsøk 2, men er enda litt høyere på fett. Det kan hende at man ville få bedre resultater når det gjelder utvikling av katarakt og annen sykdom hvis man brukte en inert ingrediens i rognkjeks-fôret, som kunne hatt den samme funksjonen som asken i maneter. Fôr med høyt vanninnhold er også en mulighet, men dette er teknisk vanskelig. Krepsdyr er svært næringsrike og vil kunne kompensere for den lave næringsverdien av maneter selv om de utgjør en liten del av fôdeinntaket.

Den målte immunresponsen viste klart at fôret med høyest protein (HP) var suboptimalt for rognkjeks. Når det gjelder fôret med høyt karbohydrat, høyt lipid og lavest protein (HC) er resultatet mer usikkert, men det gir en indikasjon på at dette fôret også er suboptimalt i forhold til fôret som ga best vekst (HL), høyt fett, lavt karbohydrat og medium protein.

#### **4.1.4 Konklusjon**

1. Dersom man ønsker høy vekst hos rognkjeks fra 15 til 50 g, er fôret som inneholdt 55 % protein, 17 % fett og 6 % karbohydrat av våtvekt det mest optimale. Fôrene med høyest (68 %) og lavest (43 %) protein-nivå så ut til å gi suboptimal immunrespons, derfor anbefales et middels nivå av protein (ca. 55 %). Høyt fettnivå i fôr fører til svært høyt fettinnhold i lever, muskel og plasma, og konsekvensen av dette er ikke kjent.

2. Ved oppdrett av rognkjeks, ønsker man ofte å holde tilbake veksten for at ikke fisken skal bli for stor når den settes ut i laksemerden. En mulighet er da å bruke fôr med ca. 55 % protein, øke karbohydratinnhold til 11 % og senke fettinnhold til 12 %, slik at man befinner seg midt i designet for dette forsøket. Et slikt fôr vil også kunne brukes til liten rognkjeks, som antagelig kan få fôr med fett- og karbohydrat-innhold som varierer i hele designets område.
3. Videre arbeid bør fokusere på osmoregulering og bruk av fôr med inerte ingredienser til rognkjeks.

## **4.2 Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks; tarmhelse og fordøyelighet**

En del av målet med forsøket som er beskrevet i kapittel 4.1 var å få kjennskap til tarmens funksjon og helse hos berggylt. Fra dette forsøket ble det tatt ut prøver til de fleste analysene som var planlagt gjennomført vedrørende tarmhelse og fordøyelsesfunksjoner. Men prøver til undersøkelse av fordøyelighet av hovednæringsstoffene lyktes vi ikke med å få prøver til. Rognkjeksens kapasitet til å fordøye næringsstoffer har til nå ikke vært kartlagt. Det skyldes trolig flere forhold, ikke minst at det er vanskelig å få representative prøver av faeces fra disse fiskene. Det er av avgjørende betydning for utvikling av optimalt fôr til rognkjeks at vi kjenner til kapasiteten til å fordøye næringsstoffer hos disse fiskene. Det gjelder særlig hovednæringsstoffene. Da vi ikke fikk tilstrekkelig med faeces fra det store forsøket som ble gjennomført for å finne optimal balanse mellom hovednæringsstoffene, ble det gjennomført et separat forsøk der alle forhold ble lagt til rette for å kunne få tilstrekkelige mengder faeces til å kunne analysere for innhold av protein, fett, karbohydrater og markør, slik at fordøyelighet kunne beregnes.

### **4.2.1 Materiale og metoder**

#### Studier av effekter på tarmfunksjon

Effekt av fôrsammensetning på tarmfunksjon og helse ble undersøkt i rognkjeks fra forsøk 2, beskrevet i kapittel 4.1. Fra 6 fisker per kar ble det tatt ut prøver av tarminnhold og tarmvev fra tre tarmavsnitt. Prøvene ble benyttet til studier av fordøyelses-, barriere- og immunfunksjoner ved bruk av histologiske, biokjemiske og molekylære metoder (Figur 6). Leverprøver ble tatt fra de samme fiskene. Da det viste seg at det ikke var tilstrekkelig tarminnhold i baktarmen hos disse fiskene til at fordøyelighet av næringsstoffene kunne analyseres, ble innhold i baktarmen hos større fisk i et eget fordøyelsesforsøk samlet for slike bestemmelser.





Figur 6 Bildet viser mage-tarmkanalen hos rognkjeks med piler som indikerer hvordan den ble delt inn i ulike seksjoner: pylorusblindsekker (PI, mellom a og b), midttarm (MI, mellom b og c) og baktarm (DI, mellom c og d (anus)).

Tarmfunksjoner ble studert med metoder som er veletablerte ved NMBU Veterinærhøgskolen og er de samme som er brukt i en rekke studier av tarmfunksjon hos Atlantisk laks (Gajardo et al., 2017; Kortner et al., 2016; Krogdahl et al., 2020b; Li et al., 2020; Li et al., 2019). De omfattet måling av aktivitet av fordøyelsesenzymene trypsin, lipase, leucine aminopeptidase (Lap), maltase, nivå i tarminnholdet av gallesyrer, histologisk undersøkelse av struktur i tarmavsnitt og lever ved farging med hematoksylin og eosin. Genekspresjon ble studert med qPCR metode i blindsekker der sekvensinformasjon var basert på informasjon fra «in house» RNA seq bibliotek ved HI, midt- og baktarm ble observert for genene som er involvert i følgende: a) Transport av næringsstoffer: *Sl*, *slc27a4*, *slc15a1*, *npc111*; b) lonebytting: *slc12a1*; c) Struktur i tight junctions: *occludin*; d) Immunfunksjon og regulering: *cox2*, *lgm*; *ikbkb*, *C5*, *IL8*, *TNFA*, *NFKB*, *rela*, *Il1b*, *CD40*, *TLR5*, *MHCII*, *TCR*; e) Cellermodellering: *mmp13*; f) Celleproliferasjon: *pcna*. Understrekede gener ble også observert i lever. Sammenligninger av resultater fra fisker i enkelte kar, ble gjort på grunnlag av enveis ANOVA og Duncans multiple range test. Histologiske resultater ble sammenlignet på grunnlag av Fisher exact test og Post hoc analyser for signifikans ved Fisher exact test ved bruk av R statistical package (version 3.6.2; 2019).

### Bestemmelse av fordøyelighet

#### *Fôr og forsøksdesign*

Basert på resultatene fôringsforsøket med hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks (Kap. 4.1) formulerte vi fôr med proteinnivå nær antatt optimalt nivå (55 %), og høyt, medium og lavt nivå av fett og karbohydrat. Fôrene inneholdt de samme råvarene, men hadde ulike nivå av fett og karbohydrat. De ulike fettnivåene ble balansert med ulike nivå av karbohydrater. Fôrene ble produsert ved Nofima sitt forteteknologisenter i Bergen. Hvert av de tre forsøksfôrene ble gitt til fisk i tre kar.

### *Fiskeforsøk*

Forsøket ble gjort med rognkjeks med snittvekt omkring 100 g. Fisken var overskuddsfisk etter tidligere forsøk, opprinnelig fra Lumarine AS på Tustna. Det ble satt ut 100 fisk i hvert av 9 kar, biomasse omkring 10 kg. Forsøkskarene var sylindriske kar med flat bunn, sorte vegger og effektivt volum 350 liter. Alle kar var utstyrt med belteautomater for utfôring, og separat lyspunkt (konstant lys 24 timer). Innløpsvannet var filtrert til 10 µm og UV-behandlet. Gjennomsnittlig vanntemperatur var 11,6 °C (10,9-12,4 °C), vanngjennomstrømming 12 l/minutt og oksygenmetningen ble holdt på 80-100 %. Forsøket ble avsluttet etter 14 dager, med oppsamling av faeces, samleprøver fra hvert kar. Det er ikke mulig å stryke faeces fra rognkjeks på grunn av fisken form, derfor ble alle fisk avlivet og innhold i baktarm ble dissekert ut.

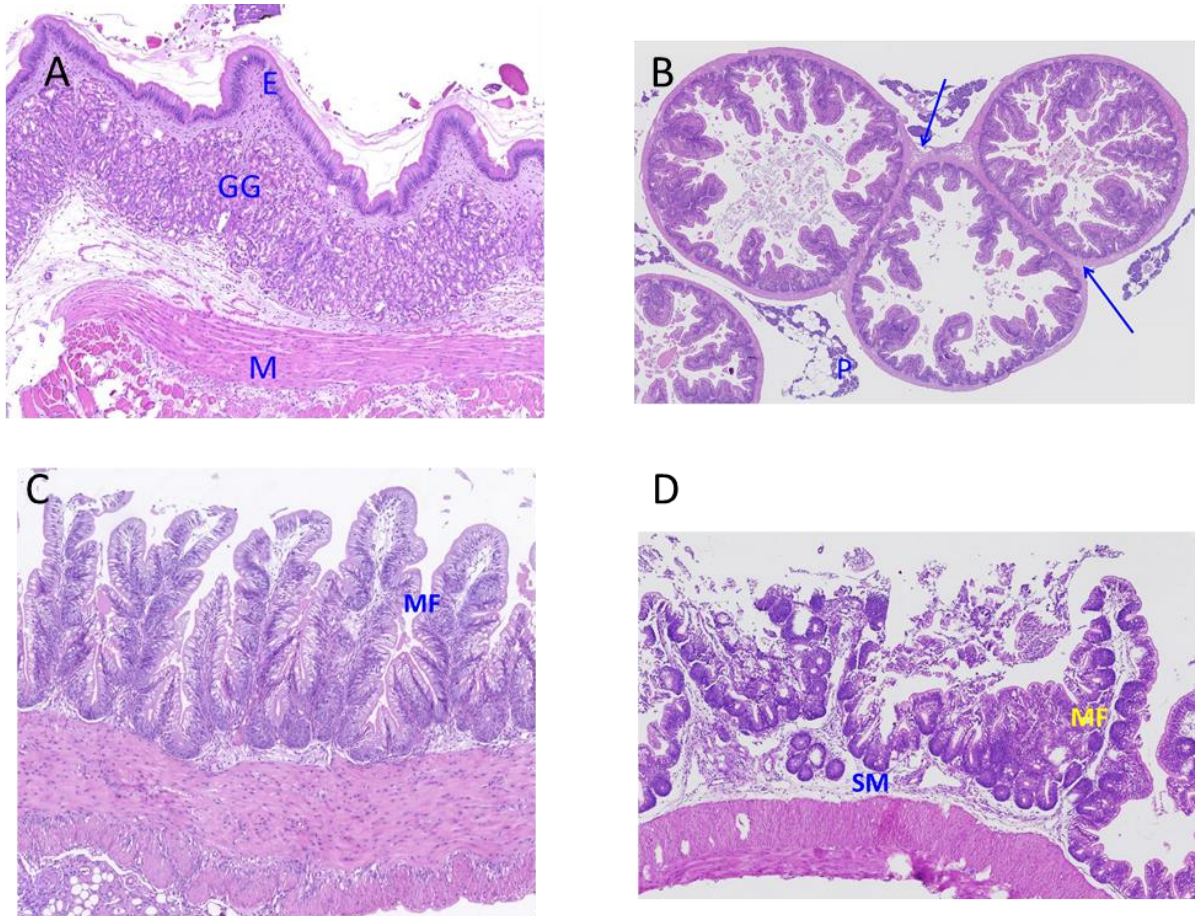
Fôr og faeces ble analysert for råprotein, råfett, stivelse og yttrium, og fordøyelighetskoeffisienter ble beregnet for råprotein, fett og stivelse som beskrevet av (Romarheim et al., 2005).

#### **4.2.2 Resultat**

##### *Analyser av tarm – Struktur og funksjon*

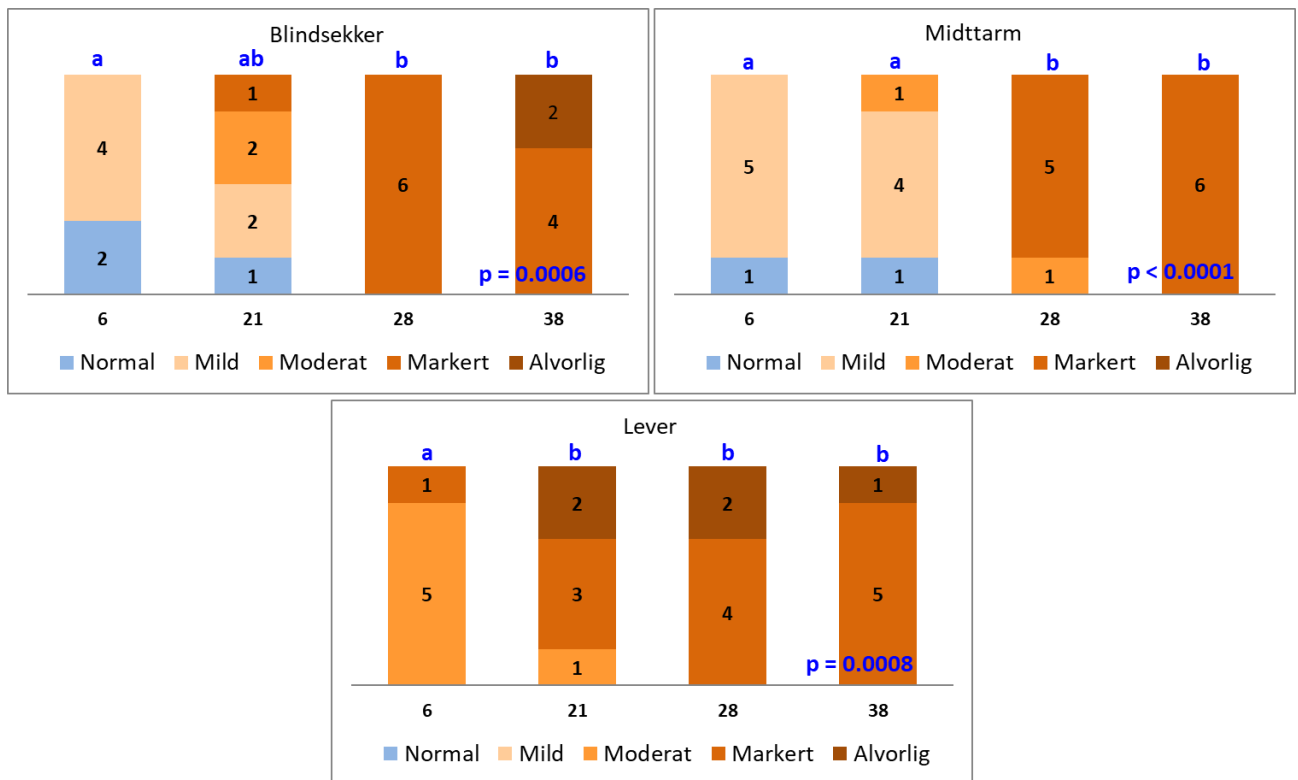
Magesekk, blindsekker og midttarm utgjorde omtrent like mye av hele mage-tarmkanalen, henholdsvis 27, 35 og 28 % av vekten. Baktarmen utgjorde 10 %.

Histologiske undersøkelser av mage og tarmvev ble gjennomført for fisk fra fire av fôrene, dvs. Fôr 1, 3, 5 og 12, med fettinnhold som varierte fra 5 til 20 %. Sett i forhold til proteininnholdet, var fettinnholdet i disse henholdsvis 6, 28, 14 og 38 g/g protein. Resultater av de histologiske undersøkelsene av tarmen hos rognkjeks er illustrert i figurene 7 og 8. Figur 7 viser representative eksempler på strukturen i mage- og tarmvegg i de ulike deler av tarmen. Veggen i magesekken viste en enkel struktur med søyleformede celler, sekretoriske kjertler og lag med glatte muskelceller i et indre sirkulært, og et ytre longitudinelt lag. Blindsekkene viste en unik struktur, der flere blindsekker deler muskel- og serosalag slik at de henger sammen. Midttarmen viste korte mukosafolder med enkle, korte forgreninger og smal *lamina propria*. Også submukosa var smal og cellulariteten var liten. Muskellaget var forholdsvis tykt. Baktarmen viste enkle folder med kompleks forgrening som var høyere enn for midttarmen. Enterocytene i baktarmen var uten supranukleære vakuoler som hos laks er til stede når fisken er i aktivt næringsopptak. *Lamina propria* og submucosa i baktarmen inneholdt fibrøst vev og viste liten cellularitet.



**Figur 7** Illustrasjon av histologiske egenskaper i mukosa i magesekk (A), blindsekker (PI), midttarm (MI) og baktarm (DI) hos rognkjeks basert på histologiske snitt farget med hematoksylin og eosin. Bilde A viser en enkel struktur med søyleformede celler i epitelet (E), kjertler (GG) og lag med glatte muskelceller (M) i et indre og ytre lag. I bilde B indikerer blå linjer en unik egenskap med fusjonerte blindsekker som deler muskel- og serosavegg. I bilde C vises korte mukosafolder (MF) med enkel forgrening og tynn lamina propria og submukosa, med liten forekomst av infiltrerende celler, og et tykt muskellag. Baktarmen (bilde D) viste enkle folder med kompleks forgrening (MF) som var høyere enn for MI, enterocytter uten vacuoler og en lamina propria and submucosa (SM) med fibrøst vev og liten cellularitet.

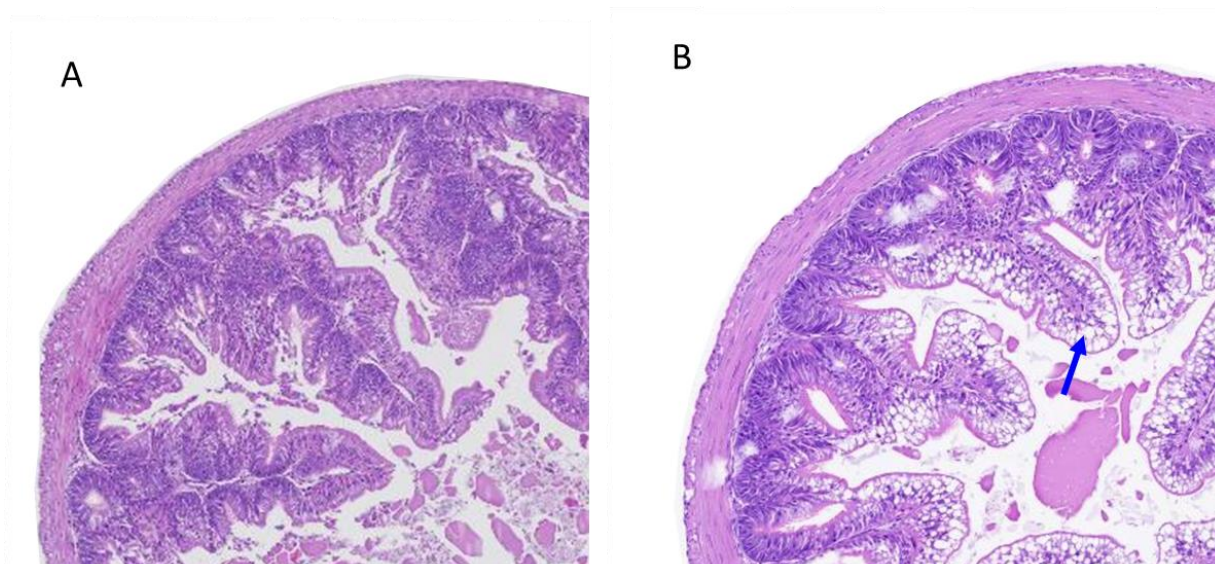
Strukturen i tarmavsnittene viste ikke klare effekter av fôr. Unntaket var forekomsten av lipidvakuoler i blindsekkene og, i noe mindre grad, i midttarmen som økte med økende lipid i fôret (Figur 8). Også leverhistologien viste en slik sammenheng mellom fettinnhold i fôret og lipidvakuolisering. Disse observasjonene kan tyde på at fôret ikke inneholdt tilstrekkelige mengder kolin for effektiv transport av lipid igjennom vevet til blodsirkulasjonen. Nyere studier av kolinbehov hos laks har vist betydelig høyere behov enn tidligere antatt. Fôrene som ble brukt til rognkjeksen i dette forsøket inneholdt, i mg/kg: Fôr 1: 5030; Fôr 3: 4739; Fôr 5: 4870; Fôr 12: 4460.



Figur 8 Resultater av histologisk skåring av grad av vakuolisering i enterocytene i blindsekker og midttarm, og i hepatocytene i lever. Tallene på x-aksen indikerer fettinnholdet i fôret i g/100g protein, dvs. i fôrene i rekkefølge fra venstre til høyre: Fôr 1, 5, 3, 12.

Laksens behov for kolin ser ut til å ligge omtrent i området som her er målt for disse rognkjeksfôrene, når fôret inneholder mye fett og fôropptaket er stort (Upubliserte resultater fra FHF-prosjektet 901435 – GutMatters). Det er en viss mulighet for at opphopningen av fett i tarmen hos rognkjeksen kan skyldes mangel på andre essensielle næringsstoffer som riboflavin, niacin, pyridoksin, folat, B12 og/eller sink, ettersom alle disse komponentene er nødvendige for at kolin skal kunne utnyttet effektivt (Mahmoud and Ali, 2019). Hvorvidt rognkjeksen trenger mer kolin i fôret enn laksen, eller eventuelt mer av de nevnte b-vitaminene, bør studeres i framtidige forsøk.

Figur 9 viser histologiske snitt av blindsekker med lite og mye lipidakkumulering.



Figur 9 Bilder av blindsekker med normal utseende (A) og med tydelige tegn på lipidakkumulering (B: hvite områder, blå pil).

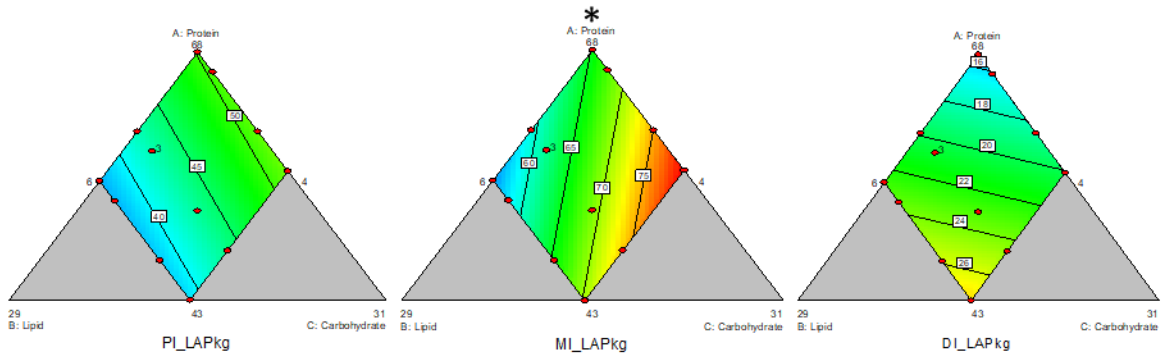
Resultatene av analysene av kapasiteten til å fordøye og absorbere peptider langs tarmkanalen, uttrykt som total aktivitet i avsnittet (U/kg fisk) er vist i Tabell 2. Tabellen viser også aktivitet av trypsin og lipase, og konsentrasjon av gallesyrer i midttarmen. Figur 10-12 illustrerer disse resultatene.

Tabell 2 Estimerte regresjons linjer for sammenhengen mellom fôrets sammensetning og biomarkører for fordøyelse uttrykt i enheter per kg fisk. For de sammenhengene som viste signifikante resultater, ga en rettlinjet funksjon beste tilpasning:  $Y=A*\text{protein} + B*\text{lipid} + C*\text{karbohydrat}$ . Fargene indikerer signifikansnivået\*

Response	Model	A	B	C
PI_LAP	Rettlinjet	0.68	-0.30	0.82
PI_MALTASE	NS ( $p \geq 0.10$ )			
MI_LAP	Rettlinjet	0.78	0.04	2.01
MI_MALTASE	Rettlinjet	0.11	-0.082	0.25
DI_LAP	Rettlinjet	0.14	0.70	0.53
DI_MALTASE	Rettlinjet	0.013	0.070	0.073
MI_Gallesalter	Rettlinjet	0.83	-0.35	0.58
MI Lipase	Rettlinjet	6.4	-7.4	-4.9
MI Trypsin	NS ( $p \geq 0.10$ )			

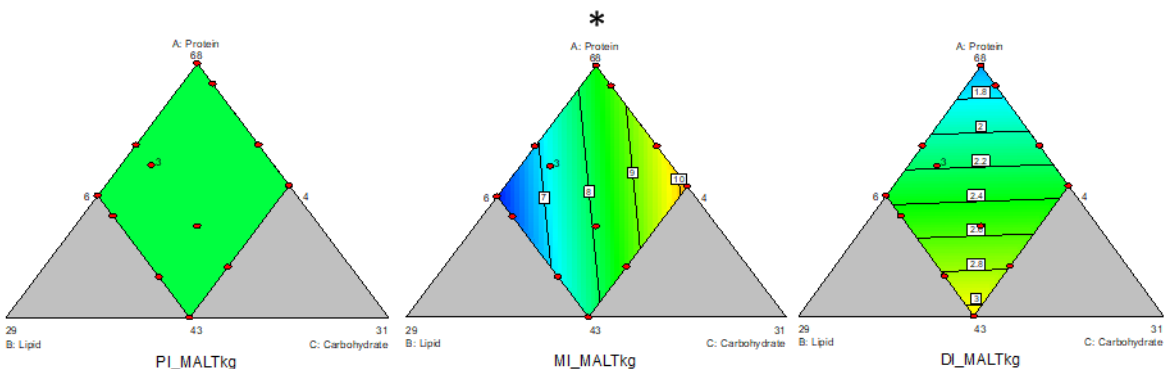
\*Fargekoder:  $p < 0.01$ ;  $0.01 \leq p < 0.05$ ;  $0.05 \leq p < 0.10$ ;  $p \geq 0.10$

Kapasiteten til å fordøye og absorbere peptider, som indikert av total aktivitet av LAP i vevet, viste klar sammenheng med variasjon i fôrets sammensetning i midttarmen, med høyest aktivitet ved høyt karbohydratnivå og lavt fettnivå. Proteinnivået så ikke ut til å påvirke kapasiteten i midttarmen vesentlig. Blindsekkene viste en liknende trend, men sammenhengen var ikke signifikant. Baktarmen viste et annet bilde, med høy LAP-kapasitet ved lavt proteinnivå og høyt innhold av både fett og karbohydrater.



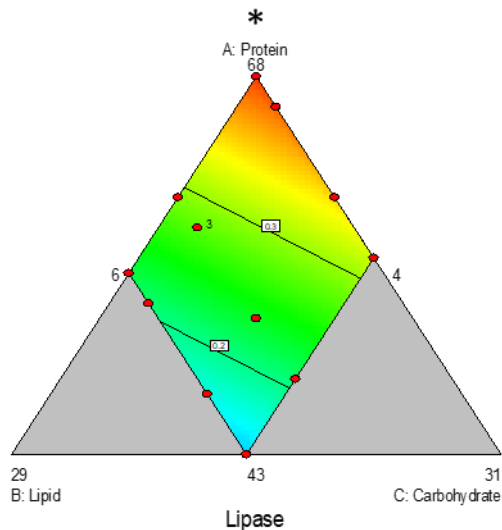
Figur 10 Effekt av nivå av protein, fett og karbohydrater i fôret på kapasiteten til å fordøye peptider i blindsekker (PI), midttarm (MI) og baktarm (DI), målt som total aktivitet av LAP i tarmavsnittet. Resultater som viste  $p \leq 0.05$  for sammenhengen med fôrets sammensetning er merket med stjerne.

Kapasiteten for fordøyelse og absorpsjon av disakkarider, som indikert av total aktivitet av maltase i organet (Tabell 2 og Figur 11) viste et lignende bilde som for LAP. Bare midttarmen viste signifikant sammenheng med fôrets sammensetning og de høyeste verdiene ble observert hos fisk som fikk fôr med høyt innhold av karbohydrater og lavt innhold av fett. Protein så ikke ut til å ha vesentlig effekt på kapasiteten. Blindsekkene viste samme trend, mens baktarmen viste et annet bilde med høyest aktivitet for fôr med lavt proteininnhold og høyt innhold av både fett og karbohydrater.



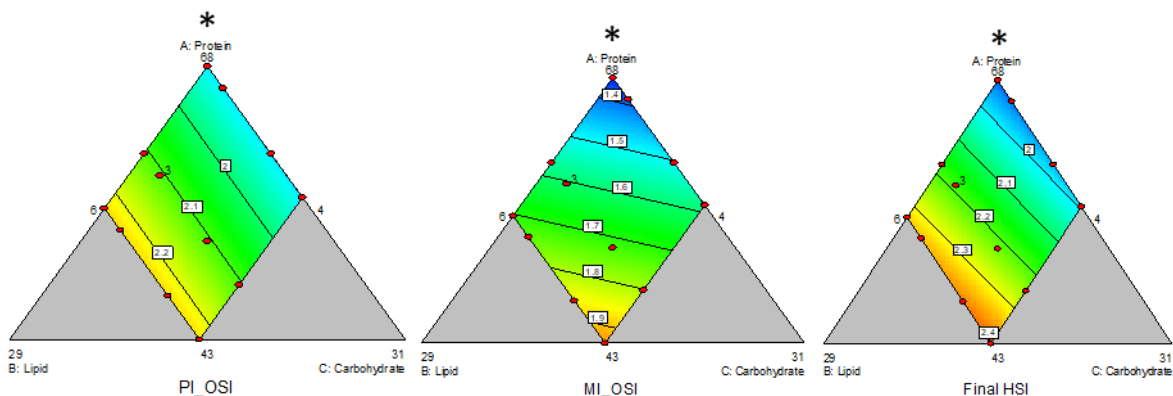
Figur 11 Effekt av nivå av protein, lipid og karbohydrater i fôret på kapasiteten til å fordøye maltose i blindsekker (PI), midttarm (MI) og baktarm (DI), målt som total aktivitet av maltase (Malt) i tarmavsnittet. Resultater som viste  $p \leq 0.05$  for sammenhengen med fôrets sammensetning er merket med stjerne.

Lipaseaktiviteten, som kun ble målt i midttarmen, viste også klar sammenheng med fôrets sammensetning (Illustrert i Figur 12). Aktiviteten var høyest hos fisk som fikk fôr med høyt proteininnhold og lavt innhold av både fett og karbohydrater.



Figur 12 Effekt av nivå av protein, lipid og karbohydrater i fôret på lipaseaktivitet i innholdet i midttarmen. En rettlinet funksjon passet dataene best og var signifikant.

Effekter av fôrets sammensetning på organindekser (organvekt/kroppsvekt) for tarmavsnitt og lever, og på ekspresjon av gener som indikerer barriere- og immunfunksjoner er vist i Tabell 3 og illustrert i Figur 13. Fôrets sammensetning påvirket indeksene for blindsekkene, midttarmen og leveren, men ikke baktarmen. For lever og tarmavsnittene som viste signifikant sammenheng med fôrets sammensetning var verdiene høyest for fisk som hadde fått fôr med høyt fett- og lavt proteininnhold. For midttarmen og leveren var det også en klar effekt av karbohydratnivå, med høyere verdier for fisk som var fôret høyt nivå både av fett og karbohydrater.



Figur 13 Effekt av nivå av protein, lipid og karbohydrater i fôret på organindekser for blindsekk (PI\_OSI), midttarm (MI\_OSI) og lever (HSI). Baktarmen viste ingen sammenheng med fôrets sammensetning. Stjerne indikerer  $p \leq 0.05$ .

Tabell 3 Oversikt over alle resultater som gjelder sammenhenger mellom fôrets sammensetning og genekspresjon i vev fra blindsekker (PI) midt- (MI) og baktarm (DI) og lever. De biomarkørene som ikke viste noen signifikante effekter av nivå av næringsstoff er markert med NS.

Gen	Funksjon	PI	MI	DI	Lever
<i>Sl</i>	Fordøyelse og transport	Rettlinjet	Rettlinjet	NS	
<i>slc27a4</i>	Fordøyelse og transport	NS	NS	NS	
<i>npc1l1</i>	Fordøyelse og transport	NS	Rettlinjet	NS	
<i>slc12a1</i>	Osmoregulering	NS	Rettlinjet	NS	
<i>slc15a1</i>	Osmoregulering	Rettlinjet	Rettlinjet	NS	
<i>occludin</i>	Tight junction	NS	NS	Rettlinjet	
<i>Cox2</i>	Immunforsvar	NS	Kvadratisk	NS	
<i>Igm</i>	Immunforsvar	Rettlinjet	Rettlinjet	Kvadratisk	
<i>ikbkb</i>	Immunforsvar	NS	Kvadratisk	NS	
<u><i>C5</i></u>	Immunforsvar	NS	NS	NS	Rettlinjet
<u><i>IL8</i></u>	Immunforsvar	Kvadratisk	Kvadratisk	Kvadratisk	Kubisk
<u><i>TNFa</i></u>	Immunforsvar	NS	NS	NS	NS
<u><i>NFkB</i></u>	Immunforsvar	NS	Kubisk	NS	NS
<i>rela</i>	Immunforsvar	Rettlinjet	Rettlinjet	NS	
<i>Il1b</i>	Immunforsvar	NS	NS	NS	
<u><i>CD40</i></u>	Immunforsvar	NS	Rettlinjet	NS	NS
<i>TLR5</i>	Immunforsvar	NS	NS	NS	
<u><i>MCHII</i></u>	Immunforsvar	NS	NS	NS	NS
<u><i>TCR</i></u>	Immunforsvar	NS	Rettlinjet	NS	NS
<u><i>mmp13</i></u>	Celleremodellering	NS	Rettlinjet	Kubisk	NS
<u><i>pcna</i></u>	Celleproliferasjon	NS	Kvadratisk	NS	Kvadratisk

\* Gener som ikke har understreking ble ikke analysert i levervev

Resultatene i Tabell 4. viser at det er midttarmen som responderer i størst grad på variasjon i fôrets sammensetning, mens blindsekkene og baktarmen bare for noen få gener viser effekt av fôrsammensetningen.



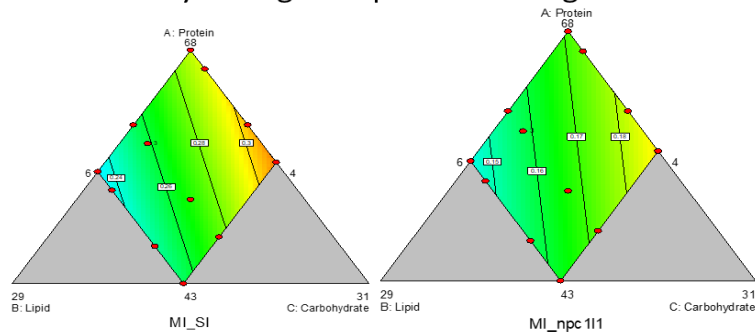
Tabell 4 Regresjonsparametre for estimert sammenheng mellom fôrets sammensetning og relativ vekt (OSI) av blindsekker (PI), midttarm (MI) og lever (HSI), og ekspresjon av gener i mukosa i tarmavsnittene som viste signifikant eller nær signifikant effekt basert på følgende modell:  $Y=A*\text{protein} + B*\text{lipid} + C*\text{karbohydrat} + A*B*\text{protein}*\text{lipid} + A*C*\text{lipid}*\text{karbohydrat} + B*C*\text{lipid}*\text{karbohydrat}$ . For de biomarkørene som ikke viste signifikante annengradsledd, er resultatene for estimering av rettlinjet sammenheng presentert. Fargene indikerer signifikansnivå\*

Response	Model	A	B	C	AB	AC	BC
PI_OSI	Rettlinjet	0.023	0.048	0.023			
MI_OSI	Rettlinjet	0.014	0.042	0.034			
HSI	Rettlinjet	0.023	0.054	0.029			
L_pcna	Kvadratisk	0.0053	0.038	0.13	-0.00033	-0.0021	-0.0031
PI_RelA	Rettlinjet	0.0059	-0.0018	0.0054			
PI_IgM	Rettlinjet	$2.6*10^{-5}$	$-3.5*10^{-5}$	$4.6*10^{-5}$			
MI_ikbb	Kvadratisk	$4.8*10^{-4}$	-0.0052	-0.0074	$8.5*10^{-5}$	$1.4*10^{-4}$	$2.5*10^{-4}$
MI_RelA	Kvadratisk	0.0016	-0.022	-0.050	$3.8*10^{-4}$	$9.5*10^{-4}$	0.0013
MI_IgM	Rettlinjet	$2.1*10^{-5}$	$-2.4*10^{-5}$	$1.1*10^{-5}$			
MI_cox2	Kvadratisk	$1.3*10^{-4}$	$2.9*10^{-4}$	$6.5*10^{-4}$	$-7.1*10^{-6}$	$-1.4*10^{-5}$	$4.1*10^{-6}$
MI_aquap1	Kvadratisk	$3.3*10^{-4}$	-0.0034	-0.0075	$5.3*10^{-5}$	$1.4*10^{-4}$	$2.3*10^{-4}$
MI_pcna	Kvadratisk	0.0033	-0.030	-0.011	$5.8*10^{-4}$	$2.1*10^{-4}$	$9.2*10^{-4}$
DI_IgM	Kvadratisk	$3.5*10^{-5}$	$8.0*10^{-4}$	$1.6*10^{-5}$	$-1.3*10^{-5}$	$1.5*10^{-6}$	$-1.9*10^{-5}$

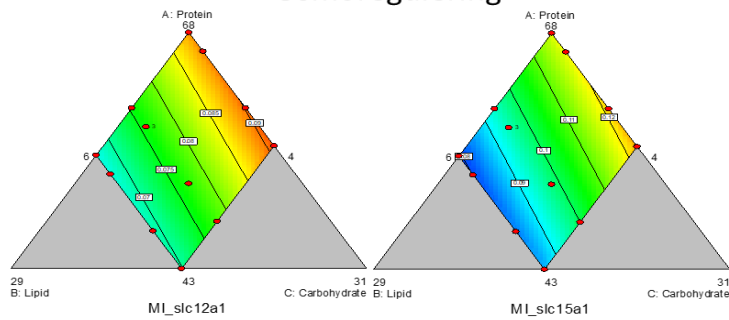
\*Fargekoder:  $p<0.01$ ;  $0.01\leq p<0.05$ ;  $0.05\leq p<0.10$ ;  $p\geq 0.10$ ; NS: Ikke signifikant, ingen trend.

Figur 14 og 15 illustrerer resultatene for gener som viste signifikante effekter i midttarmen.

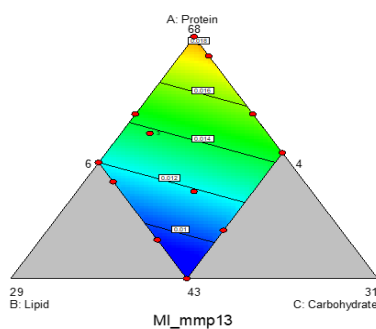
## Fordøyelse og transport av næringsstoffer:



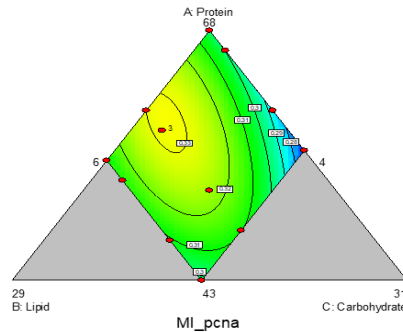
## Osmoregulering



## Remodellering



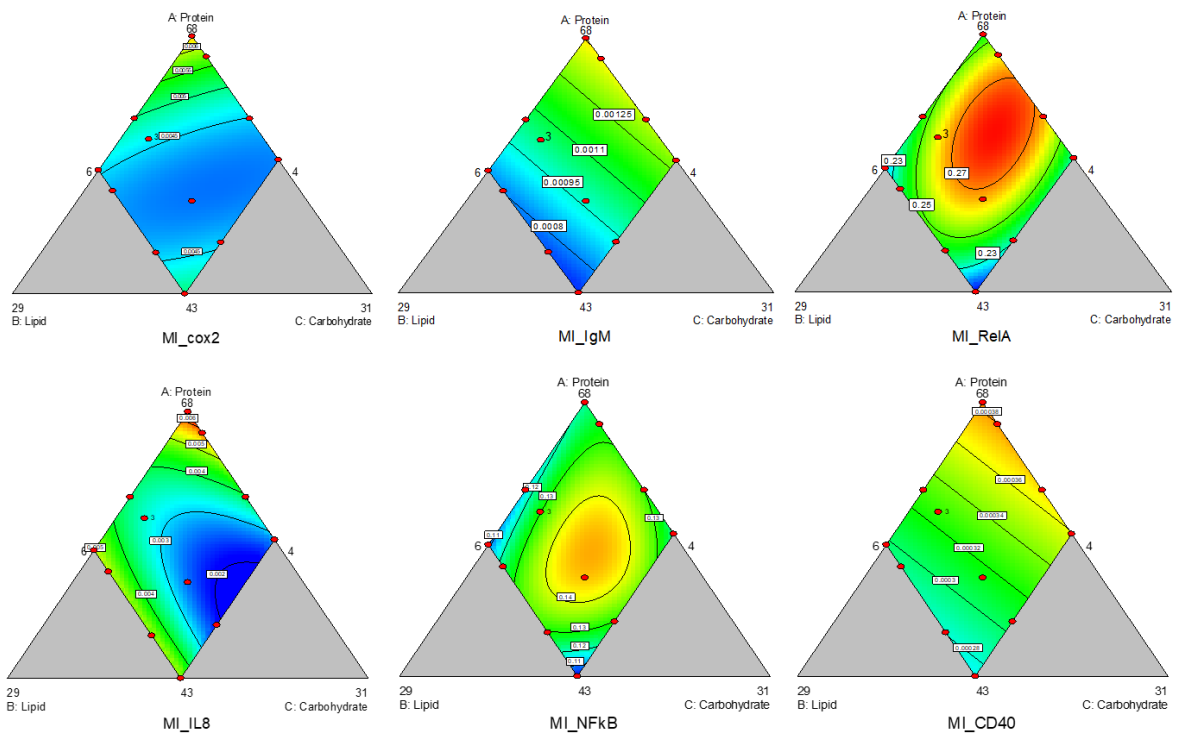
## Celleproliferasjon



Figur 14 Resultater av evaluering av effekter av variasjon i innhold av protein, fett og karbohydrater på genekspresjon i midttarm for gener involvert i fordøyelse og transport av næringsstoffer, osmoregulering, remodellering og celleproliferasjon og som viste signifikante effekter.

De av de observerte genene som er involvert i fordøyelsesfunksjoner og væsketransport og som viste signifikant effekt av fôrets sammensetning, dvs *si* (sucrase-isomaltase), og *npc1L1* (kolesterol transport), og *slc12a1* og *slc15a1* (væske transport) viste høye verdier ved høyt til moderat innhold av protein og lavt fettinnhold. Genet for enzymet matriks metalloproteinase, *mmp13*, som er involvert i restrukturering av vev, viste høyest ekspresjon ved høyt proteinnivå, og lavere ved økende fett og karbohydratnivå. Ekspresjon av *pcna*, et gen som er involvert i reguleringen av celledeling, viste et noe annet bilde, med høy ekspresjon ved moderat proteinnivå og høyt fettinnhold, lavest ved moderat proteinnivå og høyt karbohydratnivå.

## Immunfunksjoner i midttarmen



**Figur 15** Resultater av evaluering av effekter av variasjon i innhold av protein, fett og karbohydrater på genekspresjon i midttarm for gener involvert i fordøyelse og transport av næringsstoffer, osmoregulering, remodellering og celleproliferasjon og som viste signifikante effekter.

For de fleste av de observerte genene som er involvert i immunfunksjoner, og som viste signifikant effekt av fôrets sammensetning på ekspresjon, var ekspresjonen høyest ved høye proteinnivåer. Det gjaldt følgende gener: *cox2* (cyklooksygenase 2), som er involvert i produksjon av prostaglandiner og derigjennom i betennelsesresponser; *Igm* (koder for produksjon av immunoglobulin M); *ReIA* (som koder for transkripsjonsfaktorer som er involvert i regulering av betennelses- og immunresponser) som viste høy aktivitet over et større variasjonsområde. Det vil si at aktiviteten av disse genene var høy også ved midlere protein- og høyere fettnivå; *IL8* (koder for proteiner som stimulerer vandring av immunceller og opptak av patogener i disse); *CD40* (involvert i antigenpresentasjon). Unntaket var *NFkB* (involvert i regulering av transkripsjoner som påvirkes av cytokiner, bakterier og virus), som viste høyest ekspresjon ved de midlere nivåene av alle de tre hovednæringsstoffene.

### Fordøyelighet av hovednæringsstoffer

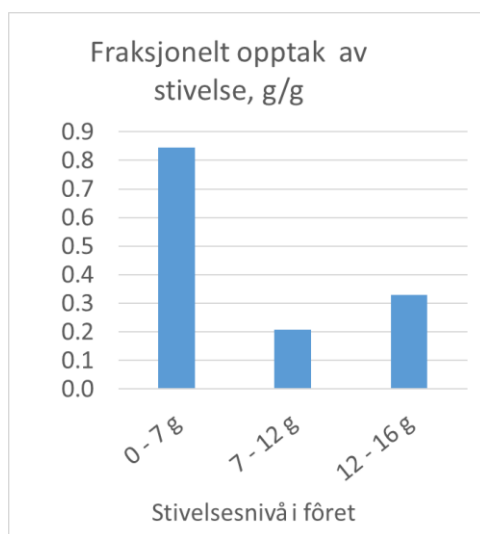
Prøvene av tarminnhold som vi fikk fra et eget forsøk i prosjektet, ga resultat for fordøyelighet av hovednæringsstoffene i fôret som vist i Tabell 5.

Tabell 5 Innhold i fôret og fordøyelighet av hovednæringsstoffer\*

	Innhold i fôret, %			Fordøyelighet, %		
	Råprotein	Lipid	Stivelse	Råprotein	Lipid	Stivelse
Fôr 1	53.4	15.8	6.6	82.5	96.0 <sup>a</sup>	84.3 <sup>a</sup>
Fôr 2	51.8	11.0	11.7	81.9	95.5 <sup>a</sup>	56.6 <sup>b</sup>
Fôr 3	53.6	5.7	16.0	83.7	92.7 <sup>b</sup>	50.2 <sup>b</sup>

\* Tall med ulike bokstaver er signifikant forskjellige ( $p \leq 0.05$ )

Proteinfordøyeligheten så ikke ut til å påvirkes av fôrets innhold av fett og karbohydrater. Bytting av fett med karbohydrater medførte reduksjon både i fett- og stivelsesfordøyeligheten. Effekten var vesentlig mindre for fettfordøyeligheten enn for stivelsesfordøyeligheten. En reduksjon i stivelsesfordøyeligheten, fra 84,3 % ved et innblandingsnivå på 6,6 % til 50,2 % ved en innblanding på 16,0 %, forårsaker betydelige endringer i fordøyelsesprosessene i tarmen. Årsaken til den lavere fettfordøyeligheten (92,7 %) ved høyt stivelsesinnhold i fôret, kan skyldes forstyrrelser fra ufordøyd stivelse. Reduksjonen i stivelsesfordøyelighet fra det laveste innblandingsnivået til det mellomste og det høyeste indikerer at rognkjeksens, som laks, har begrenset kapasitet til å fordøye stivelse. Av stivelsen ved laveste nivå ble 83 % fordøyd, mens de 5 g økning som kom i tillegg i Fôr 2, viste en fordøyelighet på 21 %, og de ytterligere 4 g som kom i tillegg i Fôr 3 viste en fordøyelighet på 33 % (Fig. 16). Ut fra dette kan det se ut som om kapasiteten til å fordøye stivelse ligger i nærheten av 7 % i fôret.



Figur 16 Fraksjonelt opptak av stivelse med økende stivelsesinnhold i fôret hos rognkjeks.

#### 4.2.3 Diskusjon

##### Tarmstruktur

De histologiske undersøkelsene ga ny kunnskap om strukturen i veggen i mage-tarmkanalen og indikerte generelt god funksjon hos fisken som inngikk i dette forsøket. Akkumuleringen av lipid i blindsekkene hos fisken som fikk høye nivåer av fett, som bekreftes av organindeksene som også var høyere for fisk som fikk fôr med høyt fettinnhold, indikerer at tilførselen av komponenter som er nødvendige for fettransport var mangelfull. Kolin er en aktuell komponent i denne sammenhengen. I

forsøk med laks er opphopning av fett i blindsekkene påvist som følge av kolinmangel, i mange tilfelle med redusert fettfordøyelighet som konsekvens (Krogdahl et al., 2020a). Resultatene indikerer at behovet for kolin hos rognkjeks bør studeres for å kunne optimalisere innholdet i fôret.

### *Tarmfunksjon og helse*

Den klare, positive sammenhengen mellom ekspresjon av *mmp13* og proteininnholdet i fôret, tyder på stor dynamikk i vevet hos fisk som fikk fôr med høyt proteinnivå. Når det gjelder tarmvev, kan dette indikere stress og «økte oppgaver». Når det gjelder celledeling, som også indikerer vevsdynamikk, var resultatet noe forskjøvet med høyest verdi for fisk som fikk fôr med middels innhold av alle de tre næringsstoffene. Hos laks øker nedbrytningen av strukturelle proteiner og celledelingen betydelig når tarmvevet er betent, for eksempel på grunn av antinæringsstoffer (Chikwati et al., 2013).

Dagens kunnskaper om rognkjeksens forsvarsmekanismer er ikke tilstrekkelige til å kunne si noe sikkert om hvorvidt resultatene for genene involvert i fiskens immunforsvar er til fordel eller ulempe for fisken. Høy ekspresjon av gener som er involvert i betennelsesresponser, i antigenpresentasjon og produksjon av immunoglobuliner, vandring av immunceller og opptak av patogener i disse kan, i denne sammenhengen være indikasjon på at høye proteinnivåer i fôret er nødvendig for å opprettholde en riktig immunologisk beredskap, men det kan også bety at fôr med høyt proteinnivå setter fisken i alarmberedskap, for eksempel som følge av ubalanse i forholdet mellom protein og energi i fôret. Fisken som fikk fôr med de høyeste proteinnivåene viste redusert vekst sammenlignet med de som fikk fôr lavere protein- og høyere fettinnhold. Årsaken kan være det faktum at høyt proteinnivå gir forbruk av aminosyrer til energiformål og høy produksjon av ammoniakk og økte nivåer i blodet. Dette vil kunne påvirke flere organer og prosesser hos fisken. Selv om fisk kvitter seg med ammoniakk over gjellene, uten forutgående detoksifisering, vil trolig ammoniakknivået i blodet være forhøyet hos fisk som gis fôr med svært høye proteinnivåer. Fra forsøk med laks er det kjent at høyt proteinnivå i fôret reduserer veksten (Hillestad and Johnsen, 1994). Studier av pattedyr og mennesker har vist at høye ammoniakknivåer i blodet kan medføre nedsatt proteinsyntese, økt apoptose (celledød), muskeldegenerasjon og neurologiske skader (Stern and Mozdzia, 2019). Det er derfor ikke usannsynlig at de høye ekspresjonsnivåene som er observert i midttarmen hos rognkjeks for immunrelaterte gener, er tegn på negative konsekvenser av høyt proteinnivå i fôret.

Det forholdet at resultatene for midttarmen ga de tydeligste effektene av fôrets sammensetning indikerer at denne delen av fordøyelseskanaalen er den viktigste for reguleringen av tarmfunksjoner. At aktiviteten av maltase i midttarmen var høyest i fisk som fikk fôr med høyt innhold av karbohydrater og derved midlere innhold av protein, kan være en konsekvens av at økt innhold av karbohydrater induserer produksjon av enzymer som skal fordøye karbohydrater. At Lap viser det samme bildet, er vanskeligere å forklare. Det var også uventet at lipaseaktiviteten viste svært tydelig positiv sammenheng med proteinnivået, og var høyest for fôret med lavt innhold av både fett og karbohydrater.

Alle resultatene som indikerer effekter av fôrsammensetning på fordøyelsesfunksjoner, dvs. ekspresjon av genene som er involvert i fordøyelsesfunksjoner og osmoregulering, og kapasiteten av Lap og maltase, viste høye verdier hos fisk som fikk fôr med høyt karbohydratinnhold, middels proteininnhold og lavt fettinnhold. Dette kan tyde på at det er de samme faktorene som påvirker alle disse fordøyelsesrelaterte biomarkørene, og at kanskje ikke nivået av hovednæringsstoffene er de viktigste. Disse resultatene, sett i sammenheng med resultatene fra fordøyelighetsanalysene, som viste at kapasiteten hos rognkjeks til å fordøye stivelse er lav, reiser spørsmålet om hvorvidt

variasjonsområdene som er beskrevet for innhold av hovednæringsstoffer i hovedforsøket er uttrykt på best mulig måte. Det er sannsynlig at, dersom vi hadde hatt fordøyelighetstall fra dette forsøket, slik at innholdet av hovednæringsstoffer kunne vært uttrykt som innhold av fordøyelige næringsstoffer, ville dette gitt et noe annet og riktigere bilde av sammenhenger mellom innhold og effekt. Basert på fordøyelighetstallene som framkom, var variasjonsbredden i innhold av fordøyelig stivelse fra 5 - 8 %. Men, konklusjonen om at fôr med lavt innhold av stivelse gir størst vekst, vil gjelde uansett uttrykksmåte.

#### 4.2.4 Konklusjon

1. Midttarm har størst kapasitet til fordøyelse og absorpsjon, og innhold av fordøyelsesenzymmer i tarmen viste tilpasninger til forsammensetning.
2. Høye nivåer av fett i fôr førte til akkumulering av fett blindsekker, noe som kan indikere mangel på kolin eller andre næringsstoffer som er viktig i absorpsjon og transport av fett.
3. Ekspresjon av immungener, og gener involvert i barriere- og strukturfunksjoner viste også respons på fôrsammensetning.
4. Fordøyelighet av protein var ikke påvirket av fett- og karbohydratnivå i fôr, mens økt innhold av karbohydrat førte til redusert fordøyelighet av både fett og stivelse.
5. Fettfordøyeligheten var høy (93-96 %), proteinfordøyeligheten var middels (82-84 %), og stivelse fordøyes bra (>80 %) ved lave nivå i fôr og dårligere (50-60 %) ved høyere nivå.

### 4.3 Mikronæringsstoff i fôr til rognkjeks

Behov for mineraler og vitaminer er per i dag ukjent for rognkjeks. Per i dag er praksis å basere nivåene på erfaring fra andre marine arter, samt generelle råd fra NRC. Alle arter har sine særegenheter. Rognkjeks har ikke svømmeblære og har flere tilpasninger som gjør at den har svært lav tetthet. Store mengder subkutinøst geleaktig bindevev og lav mineralisering av skjelett er en tilpasning som trolig er en del av rognkjeksens strategi for å holde lav kroppstetthet. Hva dette betyr for ernæringsbehovet er ikke kjent. Som for andre arter i oppdrett, har også rognkjeks en del produksjonslidelser. Oppdrettet rognkjeks utvikler ofte katarakt (grå stær), og er tillegg mottakelig for en rekke sykdommer, primært bakterielle. Målet med denne arbeidspakken var å undersøke i hvor stor grad en optimal mikronæringsstoffsammensetning kan bidra til mer robust immunforsvar og helse hos rognkjeks. Resultatene er evaluert ut fra tilvekst, overlevelse, og ytre velferdsparametere (katarakt).

Tarmstruktur, funksjon og helse ble videre studert ved hjelp av histomorfologiske, biokjemiske og molekylære analyser som er veletablerte ved Veterinærhøgskolen ved NMBU og er de samme som er brukt i en rekke studier av tarmfunksjon hos Atlantisk laks (Gajardo et al., 2017; Kortner et al., 2016; Krogdahl et al., 2020b; Li et al., 2020; Li et al., 2019).

Immunstatus ble analysert for fisk fra tre av behandlingsgruppene vurdert ut fra tilvekst og overlevelse. Forsøksfisk fra alle gruppene ble analysert for mineraler og vitaminer ved avslutning av forsøksperioden.

#### 4.3.1 Materiale og metoder

##### *Fôr og forsøksdesign*

Basert på resultatene i AP 2.2 (Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks) formulerte vi fôr med antatt optimal balanse mellom hovednæringsstoffene. Fôrblanding ble laget uten vitamin og mineraltilskudd og brukt som basis for innblanding av ulike nivåer av mikronæringsstoffer.

Studiet ble utført etter et regresjonsdesign hvor en blanding av 5 mineraler og 9 vitaminer ble tilsatt grunndietten i 7 ulike konsentrasjoner.. Vitamin- og mineralblanding ble komponert basert på "beste gjetning" og generelle råd fra (NRC, 2011). Denne mikronæringsstoffpakken ble tilsatt fôret i syv ulike nivåer: 0, 25, 50, 100, 125, 150 og 200 %, der 100 % tilsvarer antatt behov ifølge NRC (NRC, 2011). Planlagt sammensetning av forsøksfôrene er vist i Tabell 6, og Tabell 7 viser faktisk innhold av de ulike mikronæringsstoffene etter at de ferdige fôrene var analysert. Alle fôr ble gitt til fisk i to parallelle kar, bortsett fra 100 %-fôret, som ble gitt til fisk i tre kar.

##### *Fiskeforsøk*

Rognkjeks til forsøket ble produsert av Lumarine AS på Tustna. Fisken ble satt ut i forsøkskar ved ankomst til stasjonen, og fikk først samme kommersielle fôr som tidligere. Etter 5 dager tilvenning ble forsøksfôrene introdusert. Totalt 100 fisk ble satt ut i hvert av 15 forsøkskar, og i tillegg ble det satt ut samme antall fisk i et kar som kontroll med et kommersielt fôr. Forsøkskarene var sylindriske kar med konisk bunn, 150 liter volum, 50 cm diameter, og grå vegger. Karene var dekket med et transparent lokk med åpning for fôring. Alle kar var utstyrt med belteautomater for utfôring, og separat lyspunkt (konstant lys 24 timer) som var plassert på lokket. Innløpsvannet var filtrert til 10 µm og UV-behandlet. Gjennomsnittlig vanntemperatur var 11,3 °C (8,1-12,0 °C), vanngjennomstrømming 4 l/minutt og oksygenmetningen ble holdt på 80-100 %. Gjennomsnittsvekt for forsøksfisk ved start var 12,9 gram. Etter 18 dager ble det tatt vektprøve av 25 fisk pr kar, og ved forsøksavslutning etter 40 dager ble all fisk veid.

Tabell 6 Fôrformulering mikronæringsstoff rognkjeks.

	0	25 %	50 %	100 %	150 %	200 %	400 %
<b>Ingredienser, g/100g</b>							
Krill hydrolysat	3,00	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Fiskemel	55,15	55,15	55,15	55,15	55,15	55,15	55,15
Hvetegluten	23,12	23,12	23,12	23,12	23,12	23,12	23,12
Hvete	4,149	4,149	4,149	4,149	4,149	4,149	4,149
Fiskeolje	8,70	8,70	8,70	8,70	8,70	8,70	8,70
Krillolje	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Cellulose	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559	0,559
Biomoss	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Lysin	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Yttrium oksyd	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Vitamin D					0,00039	0,00139	0,00539
Vitamin E			0,0017300	0,0142280	0,0267280	0,0392300	0,0892400
Vitamin K							0,0000015038
Thiamin				0,000240	0,000490	0,000749	0,001760
Riboflavin				0,0003077	0,0008179	0,0013281	0,0033689
Vit B6		0,000014	0,000193	0,000550	0,000907	0,001264	0,002693
Vit B12				0,0000129	0,0000280	0,0000430	0,0001040
Folate		0,000024	0,000101	0,000256	0,000411	0,000566	0,001184
Pantothenic acid			0,0000019	0,0000144	0,0000269	0,0000394	0,0000894
Niacin					0,0000055	0,0000305	0,0001306
Biotin					0,0000056	0,0000182	0,0000687
Vitamin C	0,0114287	0,0114287	0,0114287	0,0228570	0,0342800	0,0457100	0,0914285
Kobber			0,0004	0,0023	0,0043	0,0063	0,0142
Jern				0,0247	0,0621	0,0995	0,2486
Sink				0,0142	0,0283	0,0424	0,0987
Mangan				0,0010	0,0033	0,0050	0,0129
Jod				0,000041	0,000114	0,000187	0,000477
Cobolt		0,0000226	0,0000479	0,0000984	0,0001489	0,0001994	0,0004014
sum	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000



Tabell 7 Analysert innhold av mikronæringsstoffer i forsøksfôrene.

	0	25 %	50 %	100 %	150 %	200 %	400 %
Mikronæringsstoff							
Thiamin	2.1	2.1	2.2	5.5	7.5	8.1	16
Riboflavin	8.5	8	8	11	15	20	37
Vitamin B6	2.4	2.4	3.1	4.8	6.6	7.9	12
Pantotensyre	13	13	12	13	13	13	14
Niacin	67	68	68	67	71	74	78
Folat	0.6	0.85	1.5	2.9	4.3	5.6	10
Cobalamin	0.12	0.12	0.12	0.27	0.4	0.47	1
Biotin	0.37	0.37	0.38	0.36	0.43	0.56	1
Vitamin C	125	121	124	176	220	254	361.15
Vitamin D	0.09	0.07	0.09	0.08	0.1	0.1	0.19
Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol)	34	35	41	93	148	200	430
Vitamin K	0.107	0.099	0.103	0.095	0.097	0.095	0.097
Mangan	21	21	21	25	31	43	65
Jern	180	170	160	200	290	370	710
Kobolt	0.17	0.38	0.59	1.1	1.5	2	3.9
Kobber	6.3	5.8	6.7	12	18	25	48
Sink	59	60	59	110	160	210	400
Jod	2.5	2.4	2.4	2.5	3.1	3.7	5.8

### Prøveuttak

Ved avslutning ble det tatt ut 30 fisk pr kar for registrering av katarakt, og 20 fisk pr kar til analyser av mikronæringsstoffer hel fisk og organer. For evaluering av tarmfunksjon og tarmhelse, ble det tatt prøver fra tarmvev, tarminnhold og lever fra seks fisk per kar. Tarmen fra hvert individ ble inndelt og merket som vist i figur 6 (Kap. 4.2). Vekt av individuelle tarmavsnitt og lever ble registrert for hver fisk. Restfisk ble brukt til velferdsskåring

Muskelvev ble analysert for tiamin, riboflavin, vit. B6, niacin, biotin og vitamin D, mens folat og cobalamin ble analysert i lever (Figur 21).

Tabell 8 Metoder brukt for vitamin og mineral analyser.

Analytt	Prinsipp	Referanse
Vitamin C	HPLC	(Mæland and Waagbø, 1998)
Biotin	Mikrobiologisk	(Mæland et al., 2000)
Folat	Mikrobiologisk	(Mæland et al., 2000)
Niacin	Mikrobiologisk	(Mæland et al., 2000)
Pantoten	Mikrobiologisk	(Mæland et al., 2000)
Vitamin B6	HPLC	(CEN, 2005)
Tiamin	HPLC	(CEN, 2003a)
Riboflavin	HPLC	(CEN, 2003b)
Cobalamin	Mikrobiologisk	(Mæland et al., 2000)
Vitamin A	HPLC	(Moren et al., 2004)
Vitamin D	HPLC	(CEN, 1999)
Vitamin E	HPLC	(Hamre et al., 2010)
Vitamin K	HPLC	(CEN, 2003c)
Mikromineraler	ICP-MS	(Julshamn et al., 2004)

### Immunrespons i isolerte leukocytter fra hodenyre

Isolasjon av hodenyreceller for å måle immunrespons, samt qPCR av immungener som beskrevet under kap 4.4.

### Beregninger og analyser

Vekstrate, SGR (% pr dag) =  $(\ln W_2 - \ln W_1) / (t) \cdot 100$

$W_1$  og  $W_2$  er gjennomsnittsvekt (g) ved start og slutt av forsøksperioden, og t er antall dager i perioden.

Data fra velferdsskåring ble analysert ved å beregne gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle fisk i hvert kar, og deretter summere gjennomsnittsverdiene til en sumindeks pr kar. Både gjennomsnittsverdier for alle egenskaper og sumindeks ble deretter analysert statistisk på samme måte som andre registreringer pr kar.

Statistisk analyse av forskjeller i vekst, kroppssammensetning og genuttrykk ble gjort med enveis ANOVA. Signifikant effekt ble definert ved  $p < 0,05$ . Sammenhengen mellom vitamin, eller mineralnivå i fôr og kroppsvev ble beskrevet med lineære regressjoner. Brudd i linje sammenheng ble analysert med «stykkedelt lineær regresjon med bruddpunkt» (Statistica 11 Statsoft).

### *Tarmfunksjon og tarmhelse*

Prøver for histomorfologisk analyse ble preparert fra alle blindsekker, midttarm 2 og baktarm og farget med H&E. Tarmseksjonene ble evaluert ved bruk av lysmikroskopi. I evalueringen ble det lagt vekt på morfologiske endringer assosiert med betennelsesreaksjoner og fettopphopning (steatose) i tarmen. Andre morfologiske trekk som er unike for rognkjeks ble også registrert og gradert under den histologiske evalueringen. Grad av endringer i tarmmorfologi ble vurdert etter et skåringssystem med en skala fra 0-4 hvor 0 er normal; 1, milde endringer; 2, moderate endringer, 3; markerte endringer, og 4. alvorlige endringer.

Tarmvev ble videre analysert for aktivitet av børstesøms-fordøyelsesenzymene leucine aminopeptidase (LAP) og maltase som beskrevet i (Krogdahl and Bakke-McKellep, 2005), det vil si på samme måte som beskrevet ovenfor i Kap. 4.2. Enzymaktiviteten er vist som spesifikk aktivitet, per mg protein i homogenatet, og som total aktivitet per enhet kroppsvekt. Trypsinaktivitet og gallesaltnivå i tarminnhold ble også analysert etter etablerte metoder.

Fra baktarmsvev ble det også etablert og analysert genekspressjons-profiler av et panel på 20 gener som har sentrale funksjoner i tarmens immun- barriere og fordøyelsesfunksjon. Primerdesign og optimalisering, prøveopparbeidelse, kvalitetskontroll og qPCR ble gjennomført som beskrevet i (Kortner et al., 2013), og i Kap. 4.2.

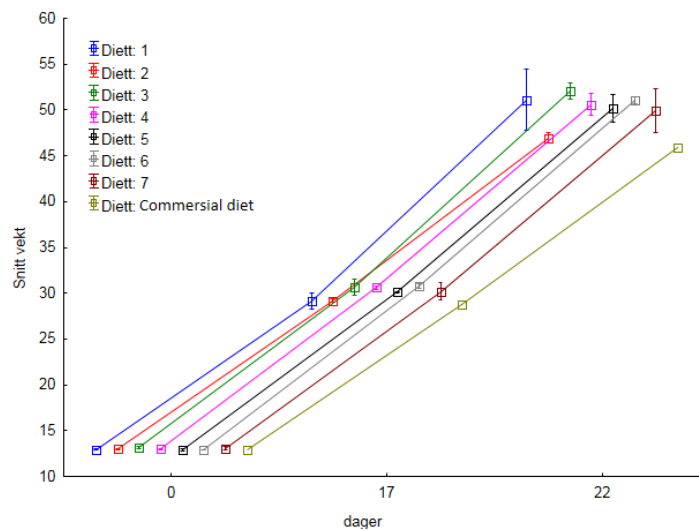
### **4.3.2 Resultat og vurdering**

#### *Vekst, dødelighet og sammensetning av hovednæringsstoffer, vann og aske i hel fisk*

Det var ingen dødelighet i løpet av den 40 dager lange forsøksperioden, bortsett fra en enkelt fisk som døde i løpet av den tredje uken. Vekter og tilvekst er vist i Tabell 9, vektutvikling vist i Figur 17. Det var ingen vekstforskjeller mellom gruppene. Snittvekten økte fra  $13,0 \pm 0,1$  til  $50,0 \pm 2,0$  g på 40 dager.

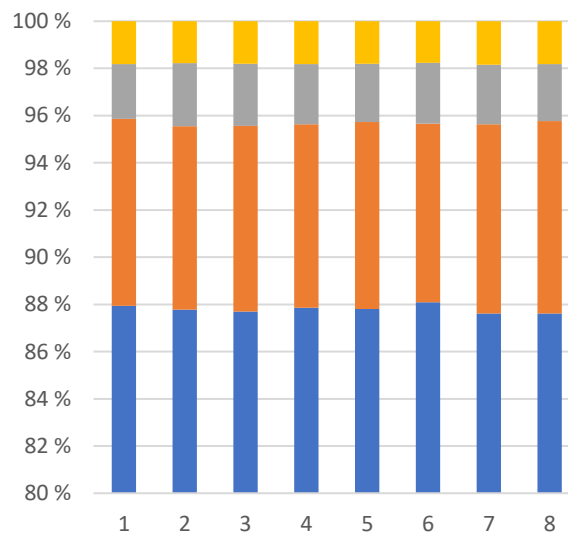
Tabell 9 Vekst og vekstrate (SGR). Tabellen viser gjennomsnitt og standardfeil.

	0 %	25 %	50 %	100 %	150 %	200 %	400 %	ANOVA
<b>Startvekt</b>	12,84 ± 0,02	12,98 ± 0,07	13,01 ± 0,01	12,95 ± 0,04	12,77 ± 0,06	12,85 ± 0,02	12,95 ± 0,11	0,09
<b>Vekt midt</b>	29,20 ± 0,60	29,20 ± 0,20	30,65 ± 0,65	30,63 ± 0,12	30,15 ± 0,05	30,80 ± 0,20	30,20 ± 0,70	0,10
<b>Sluttvekt</b>	51,10 ± 2,40	46,95 ± 0,45	52,10 ± 0,60	50,57 ± 0,67	50,20 ± 1,10	51,05 ± 0,25	49,90 ± 1,70	0,22
<b>SGR1</b>	4,95 ± 0,14	4,89 ± 0,07	5,17 ± 0,13	5,20 ± 0,01	5,18 ± 0,04	5,28 ± 0,03	5,11 ± 0,19	0,15
<b>SGR2</b>	2,58 ± 0,12	2,19 ± 0,07	2,44 ± 0,15	2,31 ± 0,08	2,35 ± 0,11	2,32 ± 0,05	2,31 ± 0,06	0,26
<b>SGR-total</b>	3,61 ± 0,13	3,35 ± 0,01	3,62 ± 0,03	3,55 ± 0,04	3,58 ± 0,05	3,60 ± 0,02	3,52 ± 0,11	0,19



Figur 17 Vektutvikling i de forskjellige fôrgruppene.

Sammensetning av hovednæringsstoffer, vann og aske i hel fisk var også lik i alle gruppene (Figur 18). Som tidligere vist har rognkjeksken svært lav tetthet, noe som vises med den høye andelen av vann på  $87,1 \pm 0,2$  %. Den resterende fraksjonen besto av  $7,8 \pm 0,2$  % protein,  $2,5 \pm 0,2$  fett og  $1,80 \pm 0,04$  mineraler.



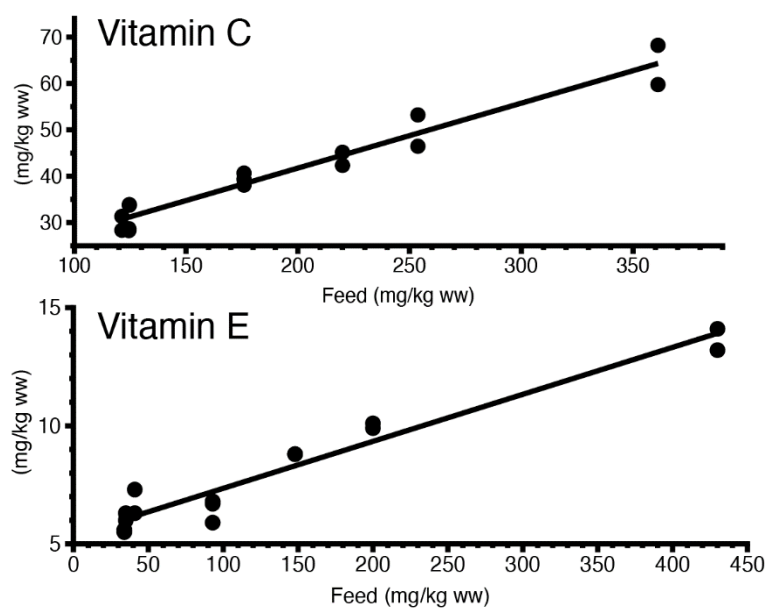
Figur 18 Sammensetning av hovednæringsstoffer, vann og aske i hel fisk i de forskjellige fôrgruppene (gul: mineraler (aske), grå: totalfett, oransje: protein, blå: vann).

#### Estimerte behov for mikronæringsstoff

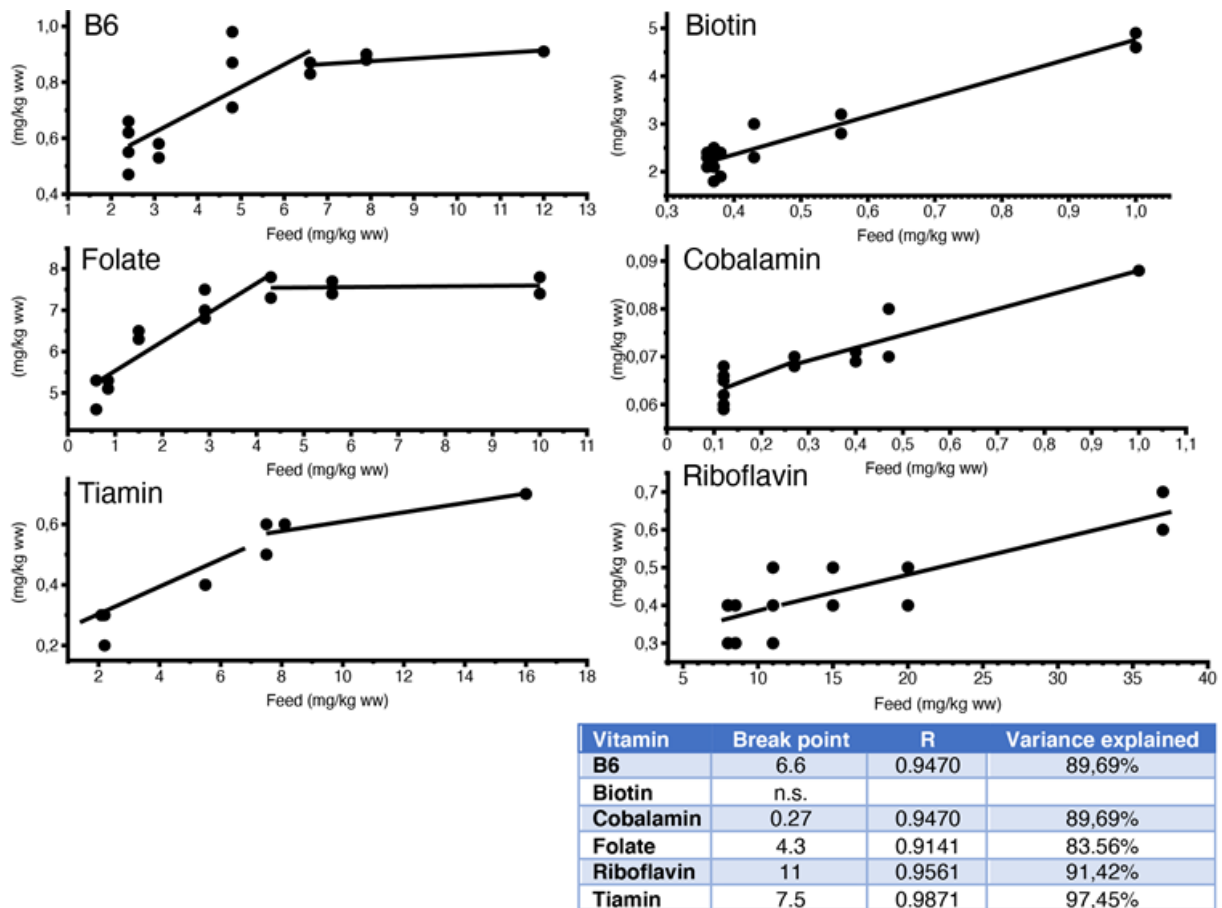
Bakgrunnen for estimat av mikronæringsstoffbehov på den måten vi har gjort det her, er at mange av vitaminene og mineralene akkumulerer i fisken opp til et visst nivå der vevet blir mettet og kurven flater ut. Siden vitaminer og mineraler som oftest er co-faktorer til enzymene i metabolismen, antar

man at vevsmetning betyr at enzymene har full aktivitet og at metabolismen går uten hindringer. Hvis fisken får mer mikronæringsstoffer enn det som er behovet, skilles overskuddet ut. Det er først og fremst de vannløselige vitaminene og noen av mineralene som har disse egenskapene. De fettløselige vitaminene akkumulerer ofte i lineært fisken i forhold til innholdet i fôret og behovet kan derfor ikke alltid bestemmes med denne metoden. For mange av næringsstoffene ser man også en akkumulering når nivået blir mye høyere enn behovet og fisken ikke har kapasitet til å skille ut alt. Det er mulig at dette på sikt vil være toksisk for fisken. I dette prosjektet har vi gjort en screening og fått med mange mikronæringsstoffer i samme forsøk. Det har den fordelen at man får mye informasjon med relativt liten innsats, men også at eventuelle samspillseffekter kan gi feilinformasjon.

Mengde vitamin C er vannløselig og ble målt i lever. Når fisken får mer vitamin C enn behovet krever vil mengde vitamin i leveren ikke øke ytterligere selv om mengden i fôret økes. I dette forsøket ser det ut til at vi ikke nådde nivået hvor behovet er dekket. Dette kan bety at rognkjeksken trenger mer vitamin C enn 360 mg/kg som var det høyeste nivået. Vitamin E er fettløselig, noe som kan forklare hvorfor fisken ikke slutter å akkumulere dette vitaminet i takt med økte mengder i fôret (Figur 19).



Figur 19 Vitamin C i lever og vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) i muskel fra fisk fôret med økende mengde vitaminer.



Figur 20 Opptak av B-vitaminer i rognkjeks. B6, Biotin, Riboflavin og Tiamin ble analysert i muskel mens Folat og Cobalamin ble analysert i lever. Der to linjeretilpasninger gav signifikant bedre statistisk tilpasning (R) enn en rett linje er dette gjort. Brekkpunktet viser at fisken metaboliserer overskudd av vitaminet etter at den får dekket behovet.

B-vitaminene (Figur 20) er vannløselige. Her så vi at vi fikk nok vitamin inn i fôrene til å gi signifikante brekkpunkt for alle de målte vitaminene, unntatt Biotin. Vitamin B6, Folat og Tiamin ga helt klare brekkpunkt ved henholdsvis 6.6, 4.3 og 7.5 mg/kg. Dette samsvarer godt med behovene i andre arter (Tabell 10). Cobalamin og Riboflavin hadde signifikante brekkpunkt på henholdsvis 0.27 og 11 mg/kg (Figur 20), selv om figurene ikke er så tydelige. Dette kan henge sammen med at fisken som fikk 400 %-fôrene antagelig ikke hadde kapasitet til å skille ut vitaminene, slik at de akkumulerte over vevsmetning og linje egentlig skulle vært tre-delt. Brekkpunktet for begge disse vitaminene ligger litt høyere, men i samme område som i andre arter. Denne forskjellen kan ha sammenheng med den relativt lave presisjonen i analyseverdiene for Biotin i vårt forsøk. Biotinbehovet i andre arter varierer mellom 0.05 og 0.3 mg/kg. I vårt forsøk var Biotin i fôrråvarene allerede 0.33 mg/kg, så det er sannsynlig at alle fôrnivåene lå over behovet, og at fisken ikke hadde kapasitet til å skille ut overskudd (Figur 20). For Biotin kan vi derfor anta at behovet er lavere enn 0.33 mg/kg.

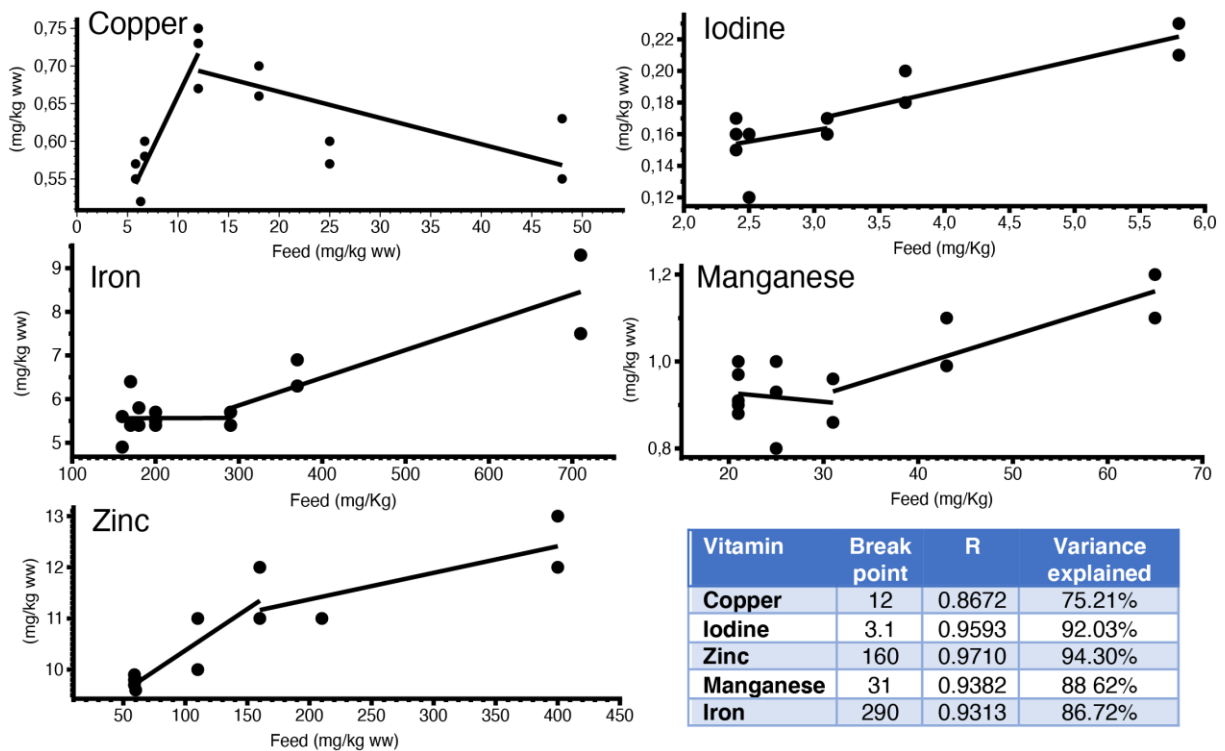
Tabell 10 Behov for vitaminer i andre arter generelt (NRC 2011) og estimater i laks fra EU-prosjektet ARRAINA (Hamre et al., 2016; Hemre et al., 2016), sammenlignet med resultatene fra rognkjeks.

	Generelt (NRC 2011)	Laks i sjø (ARRAINA)	Rognkjeks behov
Pyridoksin, B6	2-16	10	6.6
Biotin	0.05-0.14	0.3	<0.33
Cobalamin	0.02	0.17	0.27
Folat	1-2	-	4.3
Riboflavin	4-7	6.8	11
Tiamin	1-10	6.2	7.5
Vitamin C	20	190	>360
Vitamin E	50	150	?

Mineraler ble analysert i homogenat av hel fisk (Figur 21). Her er tanken den samme som med vitaminene; ved fôr-konsentrasjoner under behovet øker innholdet i fisken til vevet er mettet. Ved fôrnivå langt over behovet vil fisken begynne å akkumulere næringsstoffet igjen. Vi har også her brukt kurvetilpasning med knekkpunkt når det er signifikant bedre kurvetilpassing med to linjer enn en. Estimert av mineralbehov kompliseres av samspillseffekter og store forskjeller i biotilgjengelighet av ulike mineralforbindelser, selv om de forbindelsene som er brukt her er vanlige i fiskefôr. Resultatene fra dette studiet må derfor sees på som en første tilnærming.

Ved å øke alle mineralene i serien med fôr møter vi et kjent problem ved at sink kan ha effekt på opptaket av kobber. Forsøk med andre arter viser at når sinkinnhold i fôr når et bestemt nivå, vil opptaket av kobber hemmes. I vårt forsøk fant vi at dette nivået er 110 mg/kg fôr. Samtidig ser vi at brekkpunktet for sink ikke nås før 160 mg/kg, noe som indikerer at behovet for sink kan ligge over nivået der sink hemmer kobberopptaket. Figur 22 viser dermed at behovet for kobber er 12 mg/kg eller høyere og det blir en avveining hvor mye av disse to mineralene som skal tilsettes fôret. Dette kan studeres nærmere ved å se på samspill, bare mellom disse to mineralene. For Jod, jern og mangan, ser det ut til at fôr-råvarene inneholdt høyere nivå enn behovet, henholdsvis 2.3, 150 og 21 mg/kg. Fisken begynte å akkumulere overskudd ved fôrnivå over henholdsvis 3.1, 290 og 30 mg/kg, for jod, jern og mangan og man bør prøve å tilsette mindre enn dette til rognkjeksfôr.





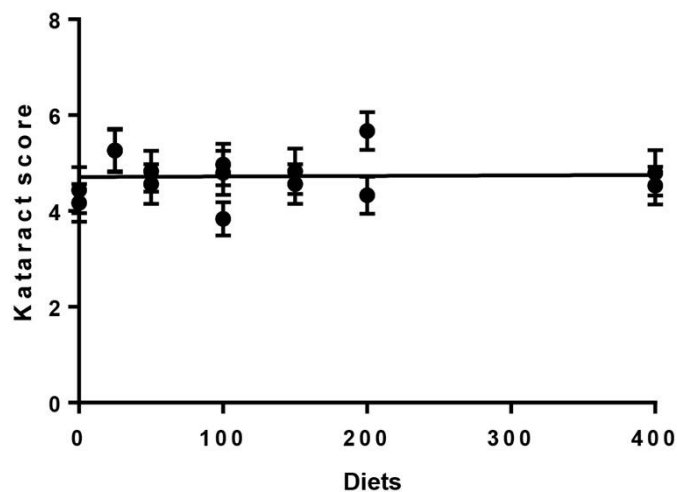
Figur 21 Mineralene ble analysert i homogenat av hel fisk. Der to linjerettilpasninger ga signifikant bedre statistisk tilpasning (R) enn en rett linje er dette gjort. Brekkpunktet viser at fisken metaboliserer overskudd av mineralet etter at behovet er dekket.

Tabell 11 Estimert behov for vitaminer i andre arter generelt (NRC 2011) og estimater i laks fra EU-prosjektet ARRANA (Prabhu et al., 2019), sammenlignet med resultatene fra rognkjeks.

	Generelt (NRC 2011)	Laks (ARRANA)	Rognkjeks Behov	Rognkjeks Maksnivå
Kobber	3-5	13-14	>12	?
Jern	150	150-166	<150	290
Sink	20-30	140-177	160	?
Jod	0.6-1.1	0.7-1.6	<2.3	3.1
Mangan	13	<37	<21	31

### Effekt av økende nivå av mikronæringsstoffer på katarakt

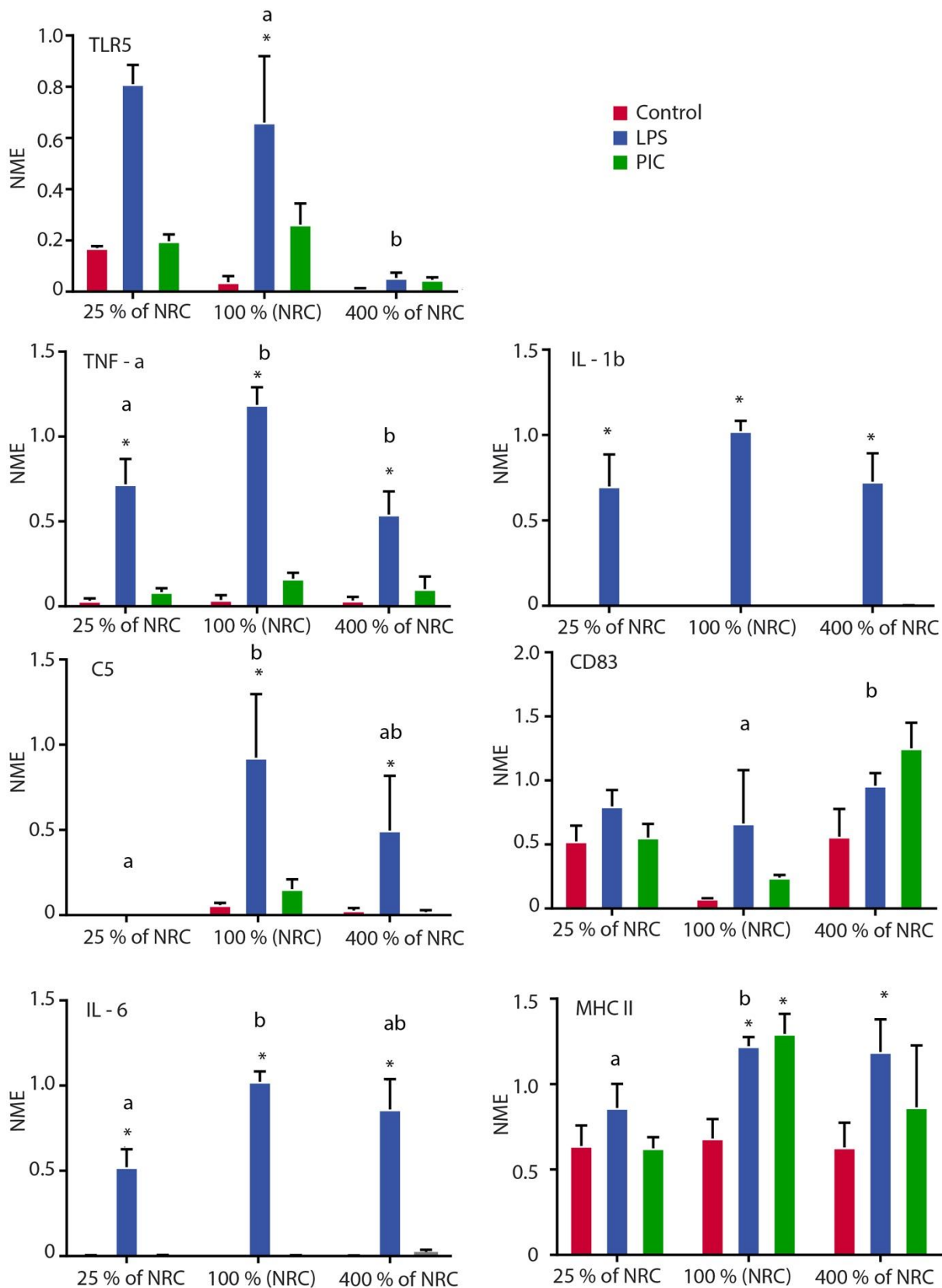
Katarakt er et utbredt problem i rognkjeks og det er enda ikke vist noen klar sammenheng mellom miljøparametere, inkludert ernæring, og katarakt. Vi analyserte derfor all fisken for katarakt ved forsøket slutt. Katarakt blir karakterisert med et skårsystem der 0 er normal linse og 4 er en fullstendig blakket linse, dvs. at fisken i praksis er blind. Maksimum skår for et individ er derfor 8 som er summen av toppskår 4 på begge øyne. Vi fant ingen sammenheng mellom katarakt og mengde vitamin og mineral i fôret (Figur 22). Gjennomsnittlig kataraktskår lå mellom 4 og 6 i alle kar.



Figur 22 Kataraktskår ved forsøkets slutt. Gjennomsnittlig skår per kar.

#### Effekt av økende nivå av mikronæringsstoffer på immunrespons i leukocytter isolert fra hodenyre

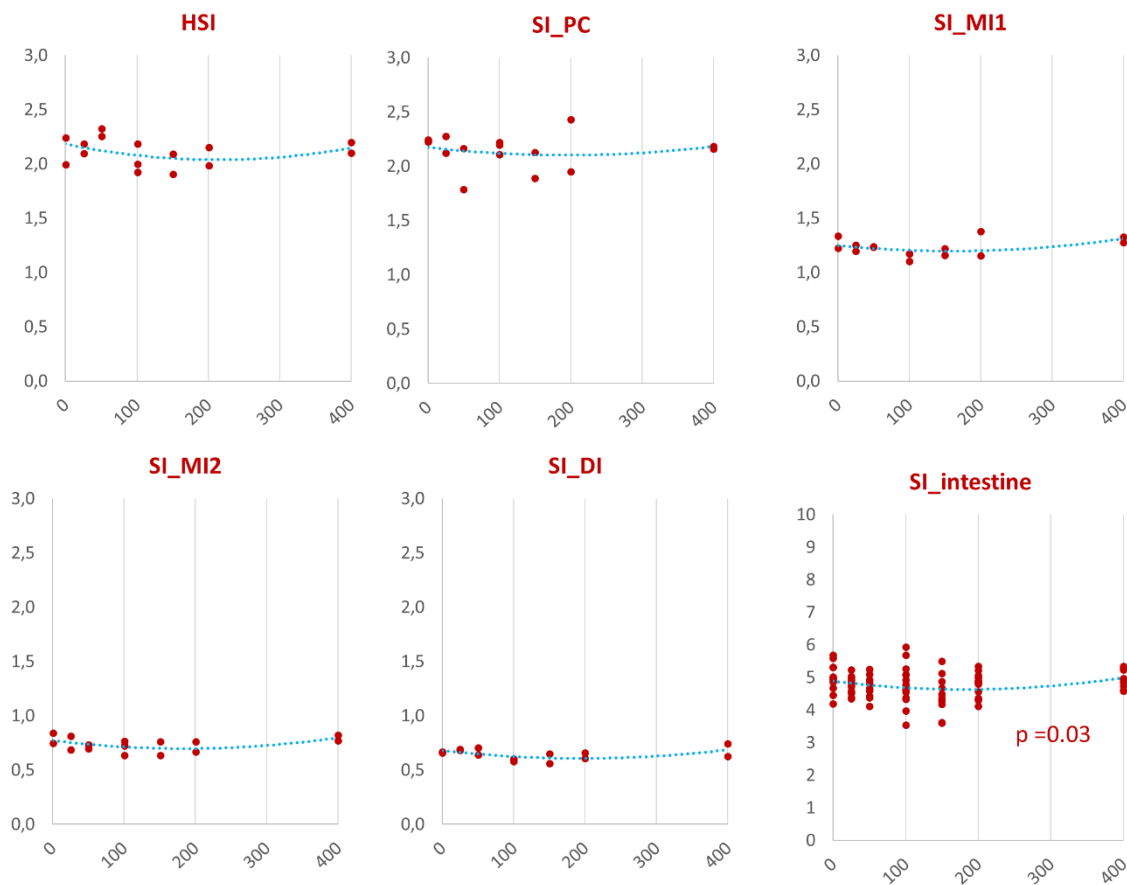
For å undersøke hvorvidt vitamin og mineral nivå i føret påvirker fiskens immunforsvar ble det hentet ut hodenyreceller fra fisk fra tre av behandlingene: lavt (25 %), middels (100 %) og høyt (400 %) nivå av mikronæringsstoffer. Hodenyrecellene ble eksponert for en proksi for virusmitte (PIC) eller bakteriesmitte (LPS). Deretter målte vi responsen hos sentrale immun-gener. TNF-alpha; IL-1b og IL-6 viste forventet respons under eksponering for alle fôrgruppene (Figur 23). LPS oppregulerte ikke TLR5 i hodenyreceller fra fisk som fikk 400 % næringspakken, altså svært høye nivåer av mineraler og vitaminer. C5 derimot, ble ikke oppregulert i dietten med 25 % næringspakken. CD83 og MHC II viste normal oppregulering i forhold til kontrollgruppen hos fisk gitt 100 % næringspakken. Dette tyder på at vitamin- og mineralnivåene i 100 % næringspakken er mest gunstig for fiskens immunsystem. Likevel er det sannsynlig at enkelt næringsstoffer kan gis i høyere eller lavere nivå enn 100 % i forhold til metningskurvene i figur 19-21 og da gi økt helse og velferd i rognkjeks.



Figur 23 Hodenyceller fra fisk gitt dietter med 25, 100 og 400 % tilsetning av vitamin- og mineralblandingen ble eksponert for PIC eller LPS i tillegg til en ueksponert kontroll. Deretter ble genuttrykket til sentrale gener i immunsystemet målt, og er vist i figuren.

### Effekt av mikronæringsstoffer på tarmstruktur, funksjon og helse

Relativ vekt (organindeks) av lever og de fire tarmseksjonene, samt total relativ vekt av hele tarmen, er vist i figur 25.

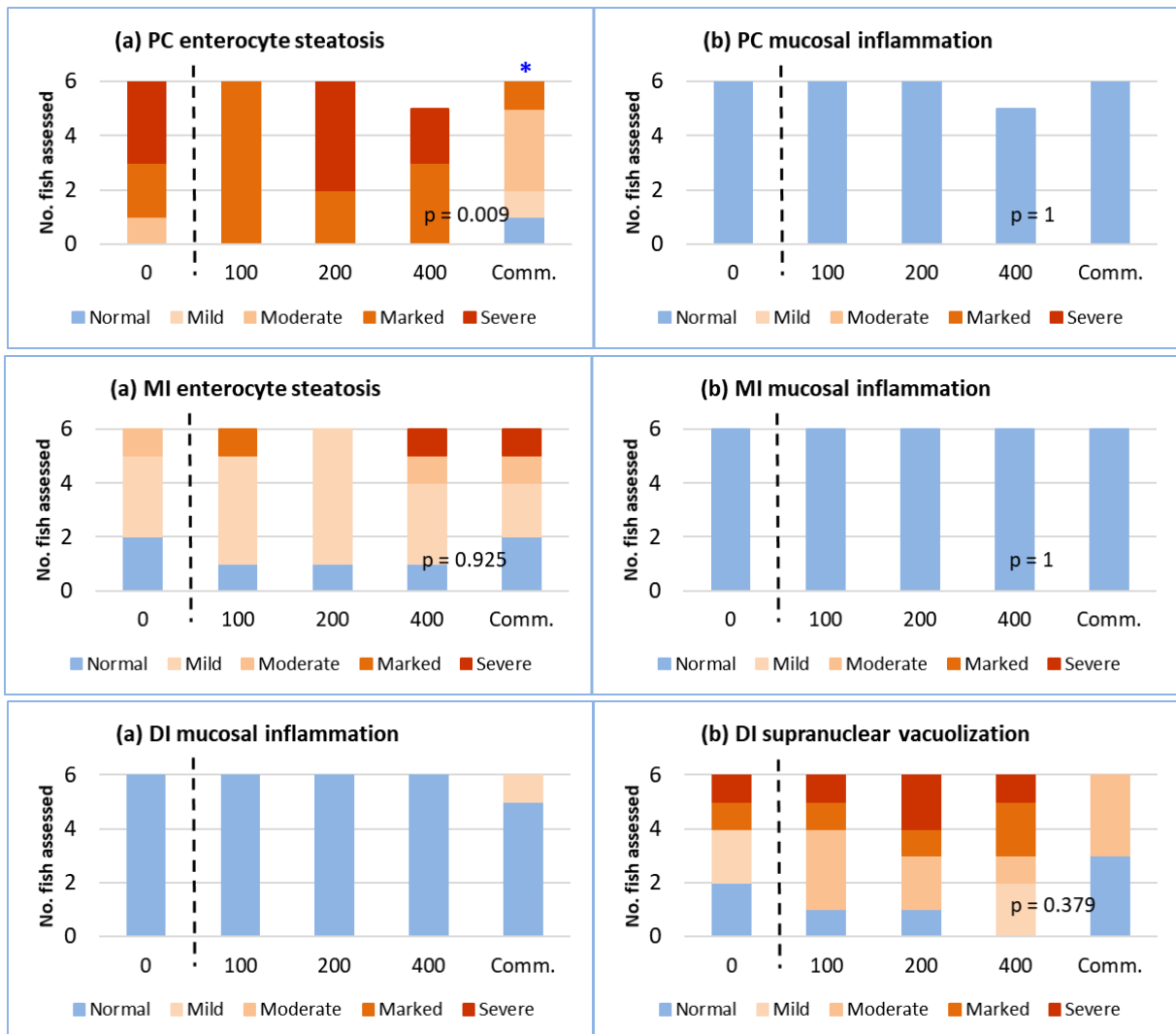


Figur 24 Relativ vekt (% av kroppsvekt) av lever (HSI), blindsekker (SI\_PC), proksimal del av midttarm (SI\_MI1), distal del av midttarm (SI\_MI2), baktarm (SI\_DI) og hele tarmen (SI\_intestine) i fisk fôret med mikronæringsstoffpakken i syv ulike nivåer: 0, 25, 50, 100, 125, 200 og 400 %. Dataene er vist som tankgjennomsnitt for de ulike behandlingene, tilpasset en kvadratisk kurvefunksjon. Signifikante effekter av diett er vist i enkeltfigurer der  $p < 0.05$ .

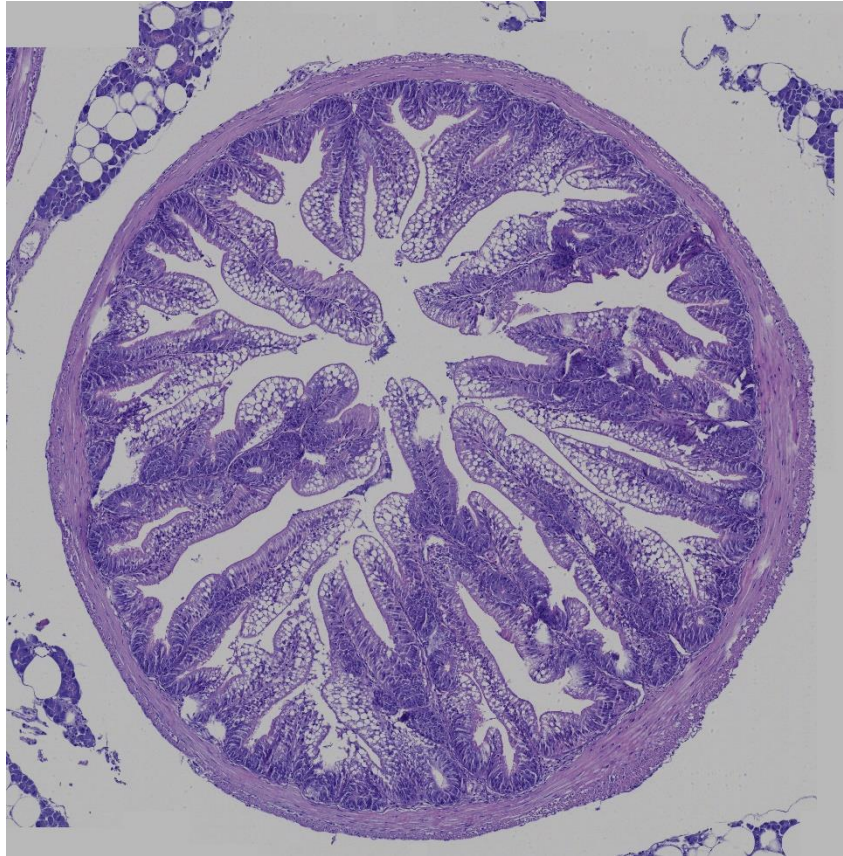
Det var ingen signifikante effekter av fôr på relativ vekt av lever eller de enkelte tarmseksjonene. En signifikant effekt av fôr ble observert for relativ vekt av hele tarmkanalen, der fisk fôret på de laveste (0, 25 %) og den høyeste (400 %) mikronæringsstoffpakken hadde de høyeste verdiene. Forskjellene mellom fôrgruppene var likevel marginale.

Resultater av de histologiske undersøkelsene av tarmen hos rognkjeksene er illustrert i figurene 25 og 26. Strukturen i tarmavsnittene viste ikke klare effekter av fôr, med unntak av forekomst og alvorlighetsgrad av lipidvakuoler i blindsekkene, der fisk fôret med det kommersielle fôret hadde signifikant mindre grad av fettvakuolisering. Mesteparten av fisken som ble evaluert hadde mild til alvorlig grad av fettopphopning i blindsekkene (figur 25 og 26), og til dels også i bakre del av midttarmen (DI2). Disse observasjonene kan tyde på at fôret ikke inneholdt tilstrekkelige mengder kolin for effektiv transport av lipid igjennom vevet til blodsirkulasjonen (Krogdahl et al., 2020a). Ingen andre strukturelle endringer i tarmen ble observert, og det var heller ingen klare tegn til

betennelsesreaksjoner. I motsetning til hva som observeres hos laks, har undersøkelsene som er gjort til nå for rognkjeks ikke vist tydelige supranukleære vakuoler i baktarmen. De antas å transportere næringsstoffer og endogene komponenter og forsvinner hos laks etter noe tids faste. Heller ikke i forsøket som beskrives her, ble det påvist slike vakuoler. Oppfølgingsstudier er nødvendig for å fastslå om supranukleær vakuolisering i enterocytter i baktarmen er til stede i en normalfungerende rognkjekstarm, og hva som eventuelt ligger til grunn for forskjellen mellom laks og rognkjeks.

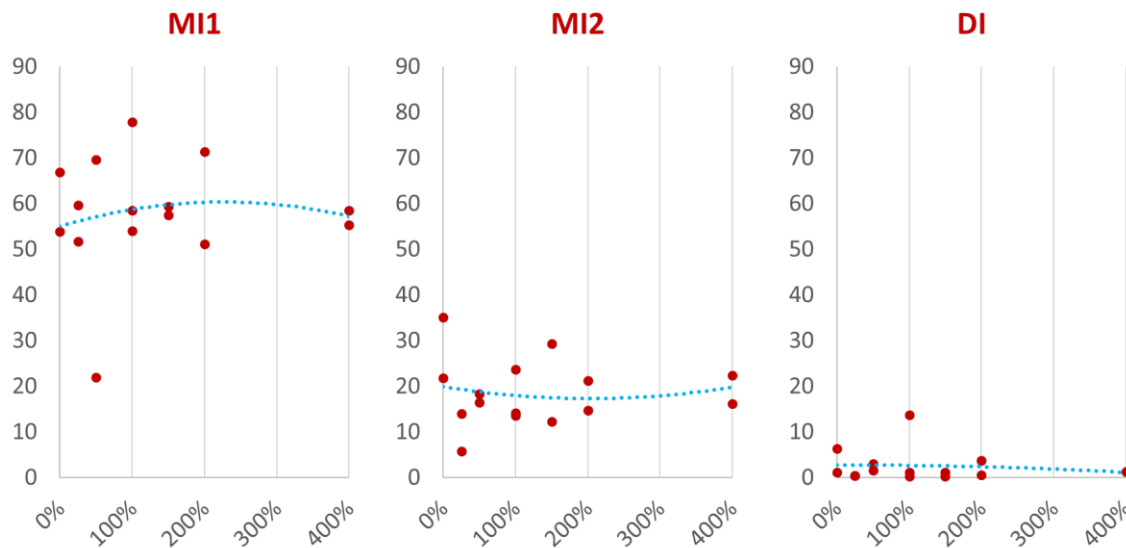


Figur 25 Resultater av histologisk scoring av grad av vakuolisering (steatose) i enterocytene og betennelsesreaksjoner i blindsekker (PC) og midttarm (MI), samt betennelsesreaksjoner og fravær av supranukleær vakuolisering i baktarm (DI). Tallene på x-aksen indikerer mikronæringsstoffpakken tilsatt i fire ulike nivåer: 0, 100, 200 og 400 %, samt fisk fôret på det kommersielle referansefôret (Comm.) p-verdier for den statistiske analysen er vist i hver enkelt figur.



*Figur 26 Tverrsnitt av blindsekk fra rognkjeks som viser alvorlig grad av intracellulær fettoppbygning i enterocytene (hvite vakuoler).*

Gallesaltnivå i tarminnhold er en veletablert biomarkør for tarmfunksjon og helse i laksefisk (Kortner et al., 2013; Romarheim et al., 2008). Totalnivå av gallsalter i tarminnhold ble målt separat i proksimal (MI1) og distal (MI2) del av midttarm, og baktarm (DI) (Figur 27). Det var ingen signifikante effekter av fôr på gallsaltnivå. Gallsaltnivået viste en klar gradient fra høy konsentrasjon i MI1, til veldig lave nivåer i baktarmen, tilsvarende profilen som er kjent fra laksefisk (Kortner et al., 2013; Romarheim et al., 2008).



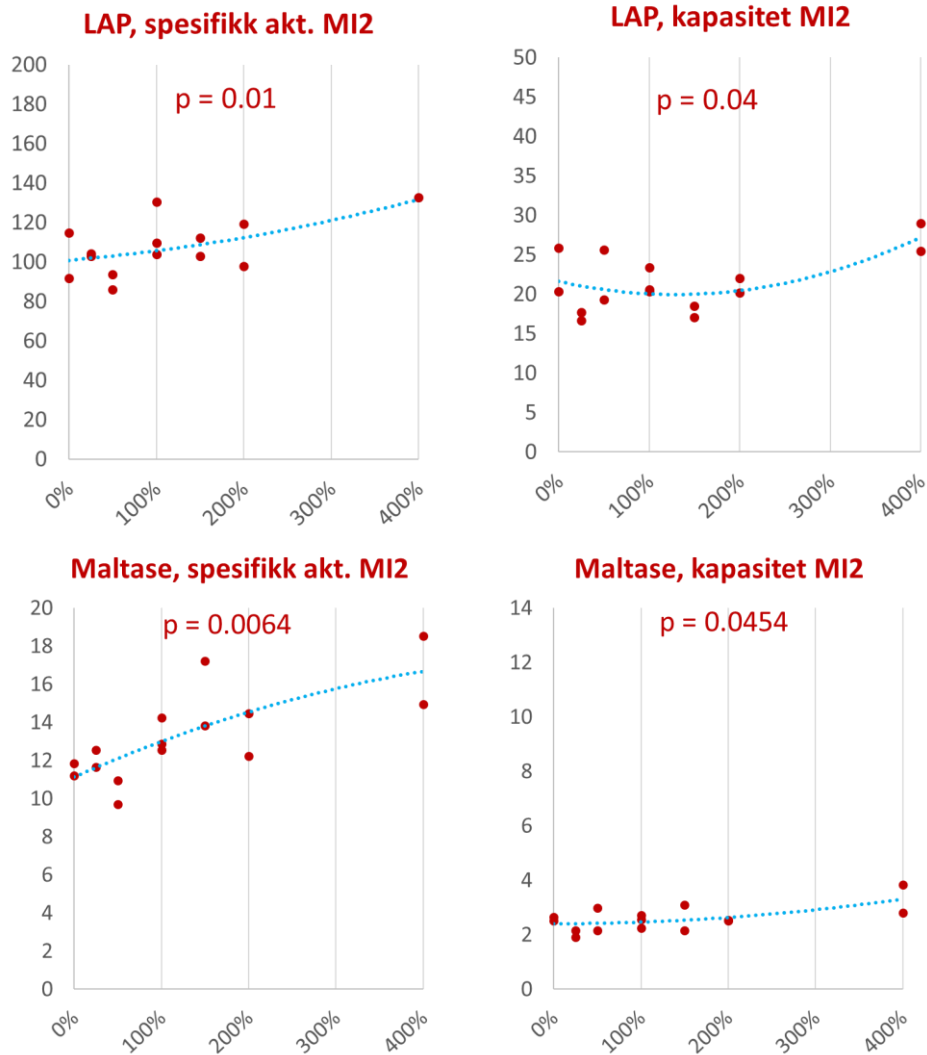
Figur 27 Total gallesaltkonsentrasjon (mg per g tørrstoff) i tarminnhold i midttarm 1 (MI1), midttarm 2 (MI2) og baktarm (DI) i fisk fôret med mikronæringsstoffpakken i syv ulike nivåer: 0, 25 50, 100, 125, 200 og 400 %. Dataene er vist som tankgjennomsnitt for de ulike behandlingene, tilpasset en kvadratisk kurvefunksjon.

Resultatene av analysene av kapasiteten til å fordøye og absorbere peptider og disakkarider langs tarmkanalen, uttrykt som spesifikk aktivitet og total kapasitet av henholdsvis leucine aminopeptidase (LAP) og maltase, er vist i tabell 12. Tabellen viser også aktivitet av trypsinaktivitet og gallesaltnivå i tarminnhold. Enzymaktiviteten til både LAP og maltase i MI2-avsnittet var signifikant påvirket av fôrsammensetning, og viste en generell økning med økende innhold av mikronæringsstoffer (Figur 28). Aktivitet av disse børstesømsenzymene var ikke påvirket av fôr i de andre tarmseksjonene. Heller ikke trypsinaktivitet eller gallesaltnivåer i tarminnhold var signifikant påvirket av fôr.

Tabell 12 Regresjonsparametre for estimert sammenheng mellom fôrets sammensetning og aktivitet av børstesømsenzymene LAP og maltase, trypsin og gallasaltnivå i blindsekker (PC), midttarm 1 og 2 (MI1 og 2) og baktarm (DI).

Respons	Kurvemodell	R <sup>2</sup>	p
<b>LAP spesifikk aktivitet</b>			
PC	kvadratisk	0.03	0.55
MI1	kvadratisk	0.04	0.42
MI2	kvadratisk	0.22	0.01
DI	kvadratisk	0.04	0.47
<b>LAP kapasitet (U/kg fisk)</b>			
PC	kvadratisk	0.01	0.75
MI1	kvadratisk	0.01	0.90
MI2	kvadratisk	0.11	0.04
DI	kvadratisk	0.03	0.52
<b>Maltase spesifikk aktivitet</b>			
PC	kvadratisk	0.003	0.94
MI1	kvadratisk	0.03	0.56
MI2	kvadratisk	0.24	0.004
DI	kvadratisk	0.05	0.32
<b>Maltase kapasitet (U/kg fisk)</b>			
PC	kvadratisk	0.01	0.78
MI1	kvadratisk	0.02	0.74
MI2	kvadratisk	0.11	0.08
DI	kvadratisk	0.04	0.45
<b>Trypsinaktivitet i tarminnhold</b>			
MI1	kvadratisk	0.27	0.16
MI2	kvadratisk	0.19	0.28
DI	kvadratisk	0.11	0.50
<b>Gallesaltnivå i taminhold</b>			
MI1	kvadratisk	0.02	0.88
MI2	kvadratisk	0.02	0.89
DI	kvadratisk	0.02	0.87



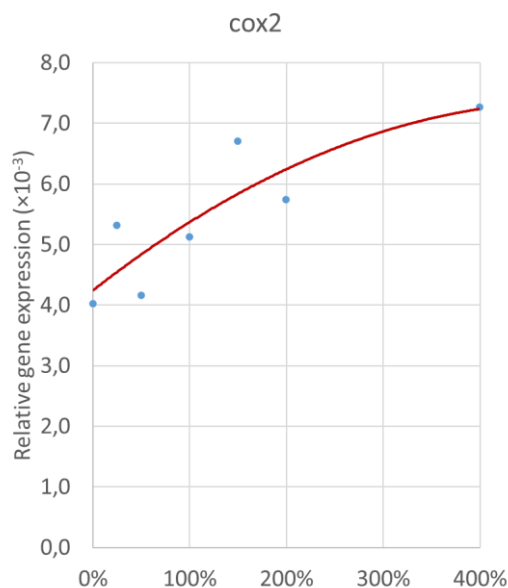


Figur 28 Spesifikk aktivitet og total kapasitet av leucine aminopeptidase (LAP) og maltase i MI2 i fisk fôret med mikronæringsstoffpakken i syv ulike nivåer: 0, 25, 50, 100, 125, 200 og 400 %. Dataene er vist som tankgjennomsnitt for de ulike behandlingene, tilpasset en kvadratisk kurvefunksjon. Signifikante effekter av fôr er vist i enkeltfigurer som  $p < 0.05$ .

Resultatene fra genekspressjonsanalysene i baktarmsvev er vist i Tabell 13. Ekspresjonsprofilering av totalt 20 gener som har sentrale roller i tarmens immun-, fordøyelses- og barrierefunksjon viste ingen signifikante effekter av fôr, med unntak av det immun-relaterte genet *cox2* (Figur 30). Cyklooksygenase-2 (*cox2*) er et induserbart enzym som produserer prostaglandiner som medierer smerte og betennelse, og uttryksnivået i baktarmen økte med økende mengde mikronæringsstoffer i fôret.

Tabell 13 Regresjonsparametre for estimert sammenheng mellom fôrets sammensetning og genekspressjon i baktarm.

Gen-symbol	Funksjon	R <sup>2</sup>	p
<i>pcna</i>	Celleproliferasjon	0,059	0,467
<i>rela</i>	Immunrespons	0,027	0,709
<i>ikkbk</i>	Immunrespons	0,013	0,850
<i>nfkb</i>	Immunrespons	0,003	0,964
<i>il8</i>	Akutfase immunrespons	0,045	0,562
<i>mhcii</i>	Immunfuksjon, antigenpresentasjon	0,083	0,337
<i>vdra</i>	Vitamin D reseptor	0,016	0,813
<i>igm</i>	B-celle markør	0,052	0,510
<i>cox2</i>	Immunrespons	0,364	0,004
<i>tnfa</i>	Akutfase immunrespons	0,114	0,219
<i>cd40</i>	Immuncelle markør	0,015	0,830
<i>tcr</i>	T-celle markør	0,030	0,684
<i>npc1l1</i>	Kolesterol transportør	0,060	0,462
<i>slc27a4</i>	Fettsyre transportør	0,071	0,401
<i>aqp1</i>	Vannkanal	0,047	0,545
<i>slc12a1</i>	Ionekanal, osmoregulering	0,035	0,644
<i>slc15a1</i>	Oligopeptid transportør	0,152	0,127
<i>si</i>	Sukrase-isomaltase, disakkarid fordøyelse	0,021	0,768
<i>occludin</i>	Tight junction protein	0,120	0,217
<i>mmp13</i>	Kollagenase, remodelering av ekstracellulær matrix	0,056	0,488



Figur 29 Genuttrykksnivå av cyklooksygenase-2 (*cox2*) i baktarm hos fisk fôret med ulike nivåer av mikronæringsstoffpakken (0, 25, 50, 100, 150, 200 og 400%). Data er vist som gjennomsnitt for hver fôrgruppe, og plottet mot en kvadratisk kurvefunksjon. For regresjonsparametre, se tabell 13.

#### 4.3.3 Diskusjon

I dette forsøket var det ingen forskjeller i vekst, overlevelse eller vanninnhold og sammensetning av hovednæringsstoffene, i fisk fôret med en mikronæringsstoffpakke som tilsvarte mellom 25 og 400 % av antatt behov, basert på NRC (2011). Fisken hadde tilsvarende nivå av katarakt her som i forsøket med hovednæringsstoffer (Kap. 4.1) og det var ingen forskjeller mellom fôrene. Immunrespons i hodenyreceller antyder at tilsetning av næringspakken tilsvarende 25 % av antatt behov er for lavt og 400 % er for høyt, sammenlignet med NRC anbefaling (100 %). På grunn av kapasiteten i analysen, var det bare fisk gitt disse tre fôrene som ble undersøkt for immunrespons.

Når det gjelder tarmfunksjon og tarmhelse, samsvarte de histomorfologiske undersøkelsene i stor grad med observasjonene fra forsøket med hovednæringsstoffer (del 4.2), og indikerte generelt god funksjon hos fisken som inngikk i dette forsøket. Fettakkumulering i blindsekkene, og til dels i midttarmen, hos mesteparten av fisken som ble evaluert, styrker observasjonene fra forsøket med hovednæringsstoffer, og indikerer at fôret ikke inneholdt tilstrekkelige mengder kolin for effektiv transport av lipid igjennom vevet til blodsirkulasjonen (Krogdahl et al., 2020a). Fravær av effekt av fôr på tarmstruktur og utseende gjenspeiler i stor grad de biokjemiske og molekylære resultatene fra tarmvev, samt vekstutviklingen, som også viste få forskjeller mellom fôrgruppene.

Det var dermed ingen av fôrene som ga negative effekter på et overordnet nivå, innenfor den tiden forsøket varte. Det kan imidlertid ikke utelukkes at man kunne fått problemer i grupper med lav og høy tilsetning av næringspakken på lengre sikt, dette på grunn av redusert immunrespons og for lave eller høye nivå av enkelte mikronæringsstoffer. Under «estimerte behov for mikronæringsstoffer», viser vi at vitamin C behovet hos rognkjeks antagelig er høyere enn hos laks, men at behovet for de fleste andre vitaminene og mineralene ligger på lignende nivå som hos andre arter. For mange av mikronæringsstoffene, var det høye nok nivå i fôrråstoffene. Mineralene er ofte også giftige over et visst nivå, der de begynner å akkumulere i fisken. Vi har estimert et maksimum for jod, jern og mangan

i dette forsøket. Biotin var også antagelig tilsatt over maksnivå, men vi ikke kjenner til giftigheten til dette vitaminet.

Hvert næringsstoff har sitt eget optimalnivå. Derfor må en næringspakke for rognkjeks formuleres basert på behovsestimatet for hvert av dem og det fôret som inneholdt 100 % næringspakken er derfor ikke optimalt. Av ulike grunner lyktes vi ikke med å estimere behov for alle mikronæringsstoffene, de som mangler er panthotene, niacin, vitamin A, D, K, og selen.

#### **4.3.4 Konklusjon**

1. Rognkjeks ser ut til å ha høyere behov for vitamin C enn laks, og høyere enn nivåene testet i forsøket, mens behov for de fleste andre vitaminer og mineraler ser ut til å ligge på samme nivå som hos laks.
2. Enkelte mikronæringsstoffer er giftig i høye konsentrasjoner, og vi har estimert maksimalnivå for jod, jern og mangan.
3. Immunrespons i hodenyreceller antyder at tilsetning av næringspakken tilsvarende 25 % av antatt næringsbehov er for lavt og 400 % er for høyt.

#### **4.4 Katarakt**

Katarakt (grå stær) er et utbredt velferdsproblem for oppdrettet rognkjeks. Katarakt er en multifaktoriell produksjonslidelse som kan bli forårsaket av både ernæringsmangler, ubalansert fôrsammensetning, rask vekst, miljøfaktorer og genetik (Bjerkås et al., 2006). I en epidemiologisk studie ble det funnet katarakt i alle undersøkte anlegg, og i alle størrelser av rognkjeks (Jonassen et al., 2017). Analyser av frie aminosyrer i vev indikerte at katarakt kunne være relatert til metabolske forstyrrelser eller feilernæring, som igjen kan føre til osmotisk ubalanse og øke risiko for grå stær. Resultatene tydet på at den oppdrettede rognkjeks hadde for lite taurin i fôret, basert på lavere konsentrasjoner i hjerte i forhold til vill rognkjeks, samt at NAH status i linsen i oppdrettet rognkjeks var lavere enn i villfisk, noe som kunne tyde på for lave histidinkonsentrasjoner i fôret. Det ble derfor valgt å undersøke om økte nivåer av disse kunne påvirke kataraktutvikling. Osmotisk ubalanse var også en hypotese basert på et studium der man undersøkte næringsinnhold i egg fra vill og oppdrettet rognkjeks. Eggene fra oppdrettsfisk hadde høyere innhold av nesten alle næringsstoffer enn eggene fra villfisk (Hamre, 2016), noe som kan tolkes som at egg fra oppdrettsfisk inneholdt for lite vann. Osmotisk ubalanse forårsaket av et for næringstett fôr kan også være en forklaring på den høye kataraktskåren funnet i alle grupper i forsøket med makronæringsstoffer (Kap 4.1).

I forsøket med mikronæringsstoff var det også funnet en høy prevalens av katarakt, men heller ingen forskjell i alvorlighet av grå stær mellom de ulike fôrgruppene. Forsøket viste at det ikke var vevsmetning av vitaminene C og E, en indikasjon på at de høyeste nivåene av disse antioksidantvitaminene kunne være for lave (hhv 260 og 125 mg/kg). Vitamin C og astaxanthin har tidligere blitt vist å redusere kataraktutvikling for laks (Waagbø et al., 2003), og denne arbeidspakken ble derfor utvidet til å også undersøke om økt tilsetning av antioksidantvitamin og astaxanthin kunne påvirke kataraktutvikling hos rognkjeks.

Katarakt er også relatert til både vekstrate og temperatur hos fisk, og det ble derfor undersøkt om omfanget av katarakt kunne være lavere ved lavere temperatur (8°C) enn det som var brukt i de tidligere forsøkene (12°C). Kontrollfôret i dette studiet er designet basert på resultatene fra makro- og mikronæringsstoffstudiene.

#### 4.4.1 Materiale og metoder

##### *Forsøksdesign og fôr*

Det ble brukt et faktorielt design med fire fôr som hadde høyt eller lavt nivå av en pakke med aminosyrer (histidin (His) og taurin (Tau)) eller antioksidanter (Vitamin C, vitamin E og astaxanthin), som vist i figur 31. Sammensetning av forsøksfôr er vist i Tabell 14. Ulike pelletstørrelser ble brukt etter hvert som fisken vokste: 0,6-1,0 mm fra oppstart, overgang til 1-1,25 mm når fisken var ca. 4 gram, og 1,25-1,60 mm fra 10 gram og til avslutning av forsøket.

<b>Kontroll</b> Lav His og Tau Lav vit C, vit E og astaxanthin	<b>Antiox</b> Lav His og Tau Høy vit C, vit E og astaxanthin
<b>HT</b> Høy His og Tau Lav vit C, vit E og astaxanthin	<b>HT+ Antiox</b> Høy His og Tau Høy vit C, vit E og astaxanthin

Figur 30 Prinsipp for faktorielt forsøksdesign med 4 dietter.

##### *Fiskeforsøk*

Forsøket ble gjennomført med rognkjeks som var klekket fra rogn fra villfanget stamfisk fra Averøy i desember 2019. Fisken ble startfôret med formulert fôr fra Othohime©, og gikk på fôr fra samme produsent fram til forsøksstart i mai når fisken etter sortering hadde en snittvekt på 2,17 gram. Snitttemperaturen fra startfôring til forsøksstart var 9 °C. Etter sortering ble 500 fisk satt ut i hvert av 24 kar. Forsøkskarene var sirkulære (diameter 50 cm) med konisk bunn, volum 150 liter, og grå vegger. Karene var dekket med transparent lokk med åpning for fôring. Hvert kar var utstyrt med belteautomat og eget lyspunkt plassert på lokket (konstant lys 24 timer). Innløpsvannet var filtrert til 10 µm og UV-behandlet. Forsøket ble gjort med to temperaturer, 12 kar fikk vann på 8 °C (7,3-8,0 °C) og de resterende 12 karene fikk vann på 12 °C (8,9-12,7 °C). Gruppen på 12°C fikk en gradvis oppgang fra 8,9 til 12°C Vanngjennomstrømming på 4 l/minutt og oksygenmetningen ble holdt mellom 80 og 100 %.

Fisken vokste forskjellig på de to temperaturene. Etter 1 måned ble biomasse redusert i alle kar på 12 °C. To uker senere ble biomassen redusert i de resterende 12 karene som ble kjørt på 8°C. Biomassereduksjonen ble gjort ved omtrent samme døgnggradsum for begge temperaturene. Senere ble biomassen ytterligere redusert slik at det var 250 fisk igjen i hvert kar ved avslutning av forsøk. Avslutning ble gjort på omtrent samme døgnggradsum for de to temperaturgruppene (840 og 868 døgnggrader).

Ved avslutning av hver temperaturgruppe ble det registrert velferdsskår på 50 fisk pr kar, og katarakt på 110 fisk per kar. Det ble tatt prøver av linser, plasma, lever, muskel og hjerte fra 10 fisk per kar.

### *Analyser og beregninger*

Data fra velferdsskåring ble analysert ved å beregne gjennomsnittlig poengsum for hver egenskap for alle fisk i hvert kar, og deretter summere gjennomsnittsverdiene til en sumindeks pr kar. Både gjennomsnittsverdier for alle egenskaper og sumindeks ble deretter analysert statistisk på samme måte som andre registreringer pr kar.

Katarakt ble evaluert med en Heine HSL 150 håndholdt spaltelampe (HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG, Herrsching, Germany). Hver linse ble gitt en score mellom 0-4, noe som gir en total score på 0-8 per fisk, etter metoden beskrevet av (Wall and Bjerkas, 1999).

Protein, fett, aske og tørrstoff og energi i fôr og vitamin C og vitamin E i fôr og vev ble analysert som beskrevet over. Aminosyresammensetning i fôr ble analysert i hydrolysat vha UPLC, basert på metoden beskrevet av (Cohen and Michaud, 1993). His og NAH konsentrasjon i linse og hjerte ble bestemt med revers-fase HPLC (Waters Corporation), basert på metoden av (O'Dowd et al., 1990), med endringer beskrevet av (Breck et al., 2005). Frie aminosyrer i linse, hjerte og muskel var bestemt med ninhydrin deteksjon med Biochrom 20 plus (Biochrom Limited), med aminoanalyse ninhydrin metoden (Amersham Pharmacia Biotech) (Breck et al., 2005). Astaxanthin ble bestemt med HPLC, basert på metoden beskrevet i (Torstensen et al., 2004).

To-veis ANOVA ble brukt til å undersøke effekten av tilsetning med enten HT eller Antiox, og eventuelle interaksjoner mellom disse.

Tabell 14 Fôrsammensetning kataraktforsøk. HT= Høy histidin og taurin, lav vit C, vit E og astaxanthin, Antiox=Lav his og taurin,høy vitC, vit E og astaxantin, HT+Antiox=høy histidine og taurine, høy vitC, Vit E og astaxanthin.

	Kontroll	HT	Antiox	HT+Antioxs
Fiskemel	55,15	55,15	55,15	55,15
Krill hydrolysat	3,00	3,00	3,00	3,00
Hvetegluten	22,40	20,70	22,30	20,60
Hvete	4,98	6,02	4,87	4,91
Fiskeolje	8,70	8,70	8,70	8,70
Krillolje	1,00	1,00	1,00	1,00
Biomos	0,40	0,40	0,40	0,40
MSP	2,00	2,00	2,00	2,00
Lysin	0,50	0,50	0,50	0,50
Yttrium oksyd	0,01	0,01	0,01	0,01
Vitamin mix	2,00	2,00	2,00	2,00
Mineral mix	0,50	0,50	0,50	0,50
Carophyll pink			0,0182	0,0182
Histidin		0,742		0,742
Taurin	0,121	0,94	0,12	0,94
Vitamin E			0,0354	0,0354
Vitamin C	0,0401	0,0401	0,1975	0,1975
<b>Analysert innhold:</b>				
Protein (g/100g ww)	63	61	62	62
Fett (g/100g ww)	15	15	15	15
Aske (g/100g ww)	10	10	10	10
Tørrstoff (g/100g ww)	95	92	93	92
Astaxanthin (mg/kg ww)	0,5	0,3	18,0	18,1
Histidin (mg/kg ww)	12,0	16,2	11,5	15,8
Taurin (mg/kg ww)	4,8	12,6	4,8	12,3
Vitamin E (mg/kg ww)	240	250	390	380
Vitamin C (mg/kg ww)	170	150	680	660

#### 4.4.2 Resultat og vurdering

Det var ingen tydelig effekt av forsøksfôr på tilvekst i forsøket, resultater er vist i Tabell 15.

Velferdsskåring viste ingen forskjeller mellom behandlinger. Det var i hovedsak finner som hadde bemerkninger for fisk fra begge temperaturer, i gruppen på 12 °C var det enkeltfisk (totalt 12 av 600 individer) med bemerkning på sugekopp, avmagring eller ryggdeformitet, mens ingen fisk fra 8 °C hadde bemerkning på annet enn finner.

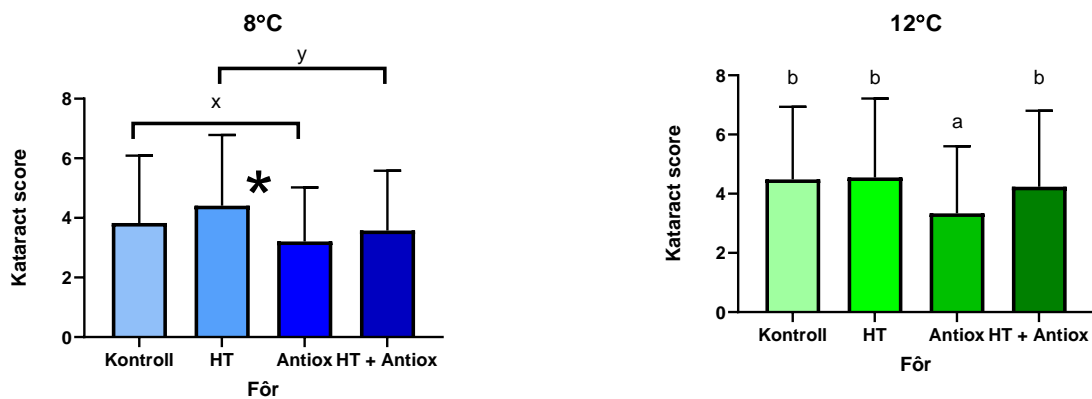
Tabell 15 Vekter, tilvekst ved 8 og 12 °C. HT= Høy histidin og taurin, lav vit C, vit E og astaxanthin, Antiox=Lav his og taurin, høy vitC, vit E og astaxantin, HT+Antiox=høy histidine og taurine, høy vitC, Vit E og astaxanthin.

	Kontroll	HT	Antiox	HT+Antioxs	ANOVA		% variasjon forklart av		
					p-verdi	r-square	HT	Antiox	HT*antiox
<b>8 °C - 106 dager</b>									
<b>848 d°</b>									
Startvekt	2.15 ± 0.03	2.13 ± 0.01	2.14 ± 0.04	2.18 ± 0.02	0.63	0.19	0.54	0.69	0.30
Vekt 14 dg	3.68 ± 0.08	3.65 ± 0.05	3.61 ± 0.07	3.66 ± 0.02	0.83	0.10	0.55	0.87	0.51
Vekt 106 dg	67.1 ± 1.5	72.7 ± 2.6	68.9 ± 3.3	66.8 ± 3.3	0.46	0.46	0.49	0.55	0.20
SGR 14 dg	1.92 ± 0.03	1.93 ± 0.07	1.84 ± 0.11	1.82 ± 0.03	0.64	0.18	0.23	0.91	0.80
SGR total 106	3.31 ± 0.04	3.40 ± 0.04	3.35 ± 0.08	3.30 ± 0.06	0.64	0.18	0.67	0.72	0.27
<b>8 °C - 77 dager</b>									
<b>616 d°</b>									
Vekt 77 dg	34.5 ± 1.3	33.7 ± 0.9	32.4 ± 1.1	34.4 ± 0.9	0.52	0.23	0.48	0.64	0.23
SGR 77 dg	3.67 ± 0.06	3.65 ± 0.03	3.59 ± 0.07	3.64 ± 0.04	0.75	0.13	0.44	0.76	0.51
<b>12 °C 70 dager</b>									
<b>840 d°</b>									
Startvekt	2.17 ± 0.03	2.20 ± 0.01	2.19 ± 0.03	2.19 ± 0.01	0.85	0.09	0.83	0.51	0.61
Vekt 14 dg	4.81 ± 0.18	4.88 ± 0.04	4.93 ± 0.12	4.71 ± 0.03	0.57	0.21	0.82	0.54	0.23
Vekt 70 dg	47.6 ± 1.0	48.2 ± 1.2	49.1 ± 0.7	48.5 ± 0.8	0.73	0.14	0.37	0.99	0.53
SGR 14 dg	5.68 ± 0.15	5.73 ± 0.19	5.69 ± 0.16	5.36 ± 0.12	0.36	0.32	0.28	0.40	0.25
SGR total 70	4.53 ± 0.04	4.53 ± 0.06	4.59 ± 0.05	4.56 ± 0.02	0.76	0.13	0.34	0.83	0.78

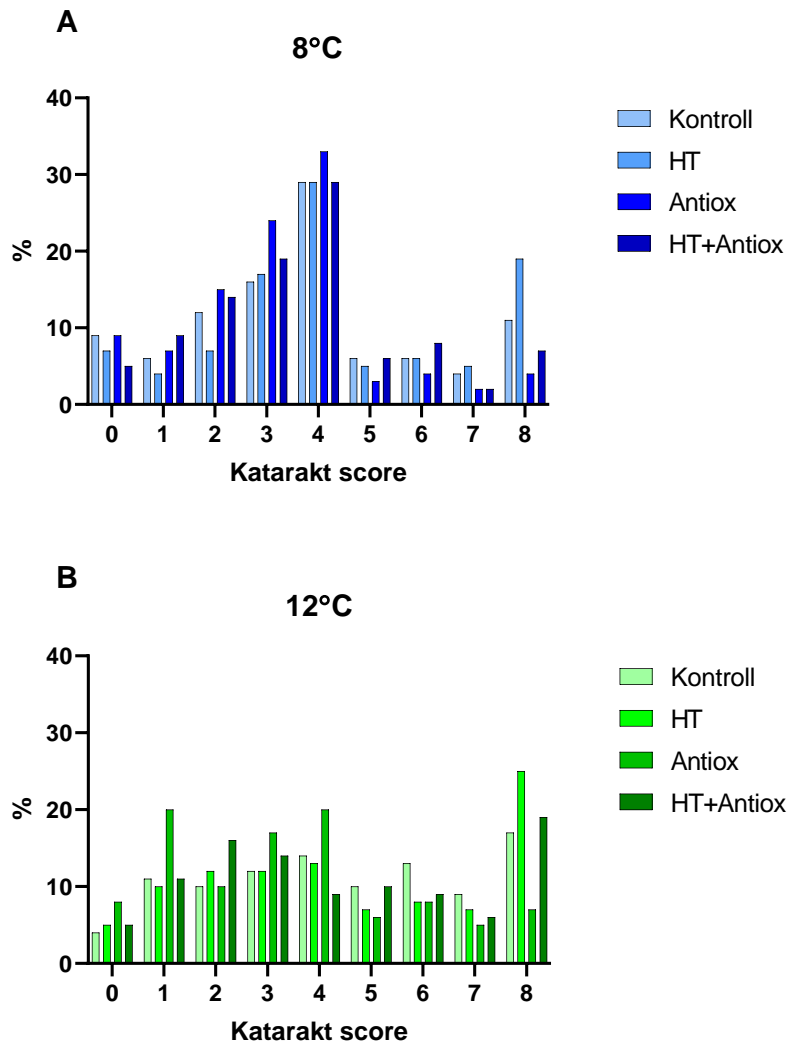


### Katarakt

Ved avslutning av forsøket var prevalens (antall fisk med katarakt) 91-95 % i fisken som gikk på 8°C, og 92-96 % for fisken som gikk på 12°C. Det ble funnet fisk uten katarakt (skår 0) og fisk med fullstendig blakket linse (skår 8) i alle gruppene (Figur 31). Alvorligheten av katarakt var signifikant lavere i fisken som fikk ekstra antioksidanter i fôret, mens tilsetning av His og Tau (HT) ga høyere kataraktskår i fisken som gikk på 8°C ( $p < 0.05$ ,  $n = 330$ , Figur 32). For fisken som gikk på 12°C hadde gruppen som fikk bare antioksidanter signifikant lavere kataraktskår enn alle de andre gruppene ( $p < 0.05$ , interaksjonseffekt,  $n = 330$ ). Gjennomsnittsskår varierte fra 3.2 til 4.4 i fisken som gikk på 8°C, og 3.3 til 4.5 i fisken som gikk på 12°C.



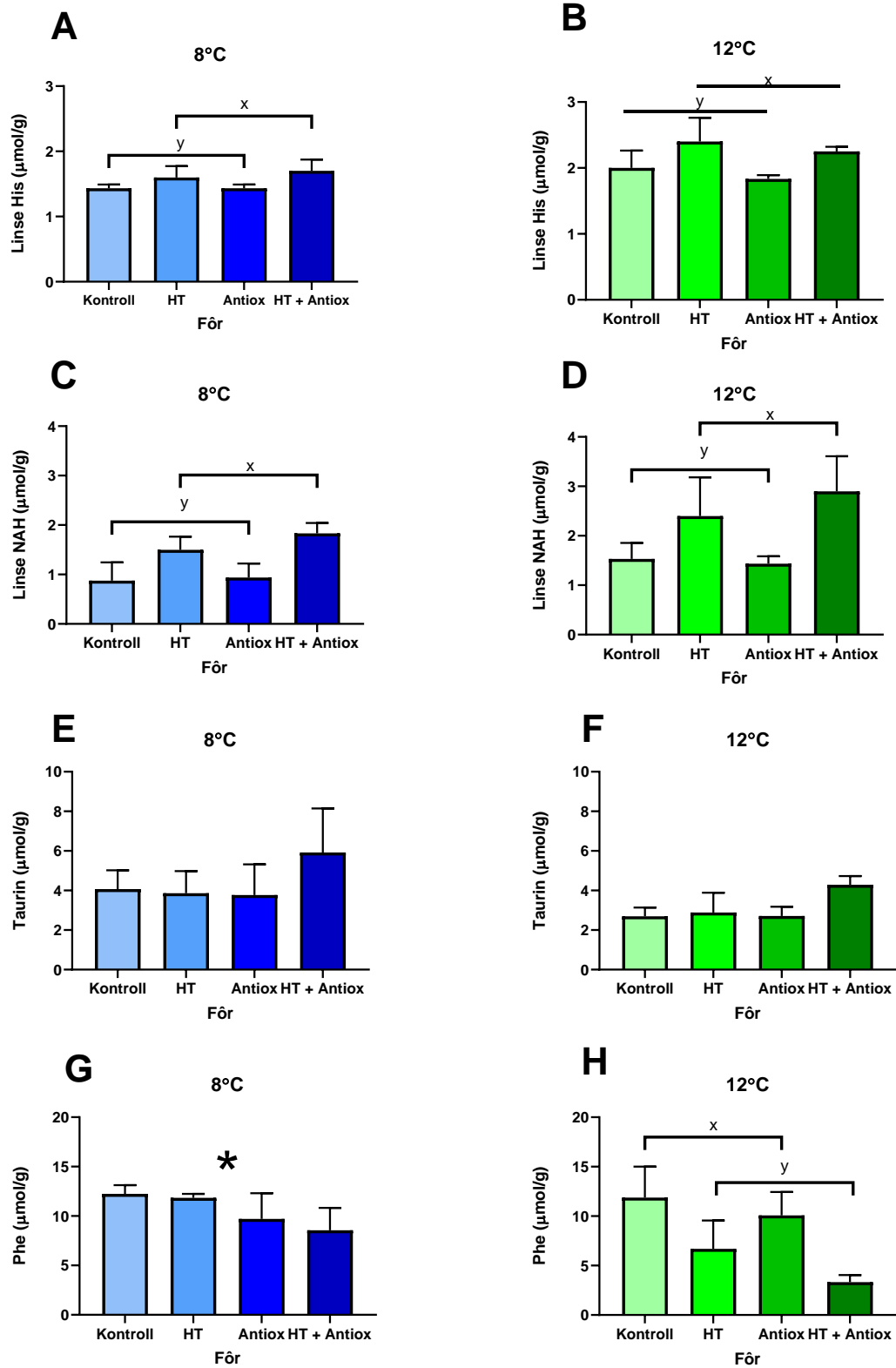
Figur 31 Kataraktskår ved 8 og 12°C ved avslutning av forsøkene (snitt±SD). Signifikante forskjeller forårsaket av tilsetning av antioksidanter er markert med en asterisk (\*), forskjeller på grunn av tilsetning av His og Tau er markert med små bokstaver (x,y), interaksjonseffekter er vist med små bokstaver (a,b). ( $p < 0.05$ ,  $n = 330$ ).



Figur 32 Fordeling av fisk med ulike alvorlighetsgrader av katarakt ved 8 og 12°C ved avslutning av forsøket.

#### Aminosyrer i linse

Både histidin og NAH i linse var signifikant høyere i fisk som fikk fôr med høyt nivå av histidin og taurin (HT) ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ), mens taurin var noe høyere, men ikke signifikant ( $p = 0.06$ ,  $n = 3$ ) for fisk på 12°C, men ikke på 8°C (Figur 33). Summen av frie aminosyrer i linsa var lavere i gruppene gitt HT i fisken som gikk på 12° ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) mens det ikke var forskjell på 8°C.



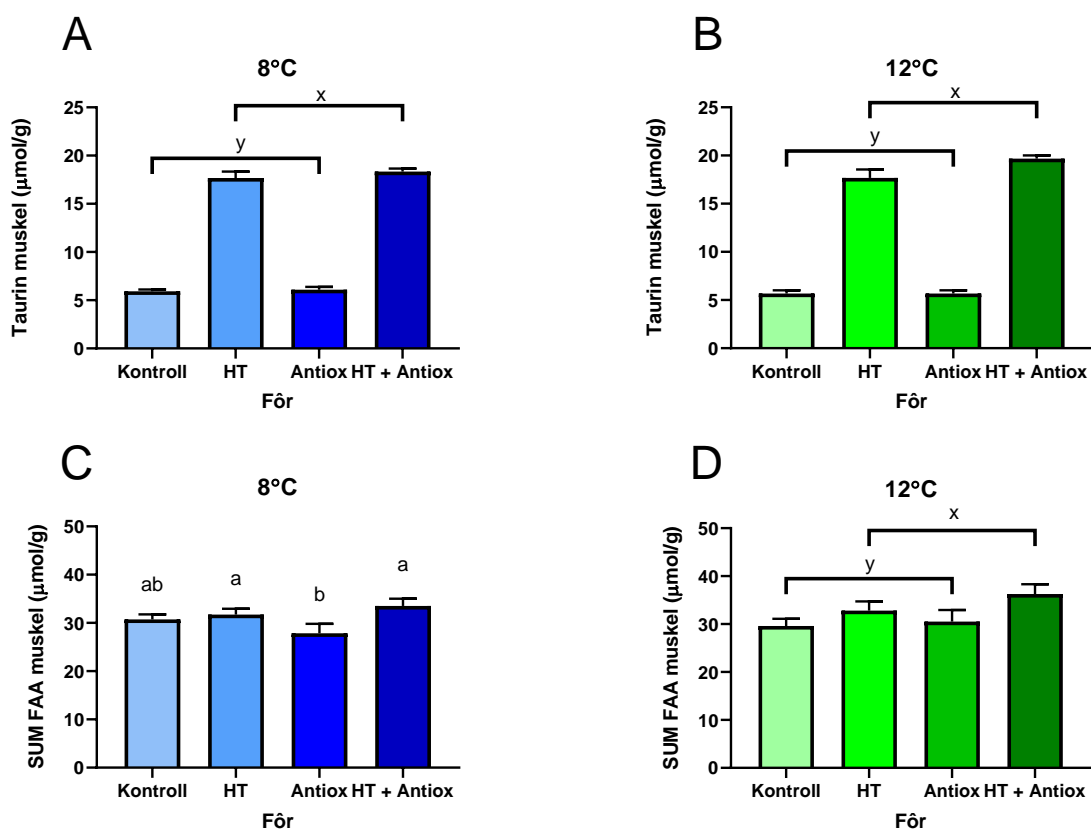
Figur 33 Konsentrasjon av His (A, B), NAH (C, D) Tau (E, F) og Phe (G, H) i linser fra rognkjeks på henholdsvis 8 og 12°C, gitt fôr med og uten tilsatt histidin og taurin (HT) og antioksidanter (Antiox) (n=3). Signifikante forskjeller forårsaket av antioksidanter er markert med en asterisk (\*), og med små bokstaver (x,y) for effekt av His og tau ( $p < 0.05$ ).

### Hjerte

NAH ble ikke detektert i hjerteprøver fra noen av fiskene ( $< 0.08 \mu\text{mol/g}$ ), mens histidin var funnet i høye og like konsentrasjoner i alle grupper, snitt  $4.1 \pm 0.3 \mu\text{mol/g}$ .

### Muskel

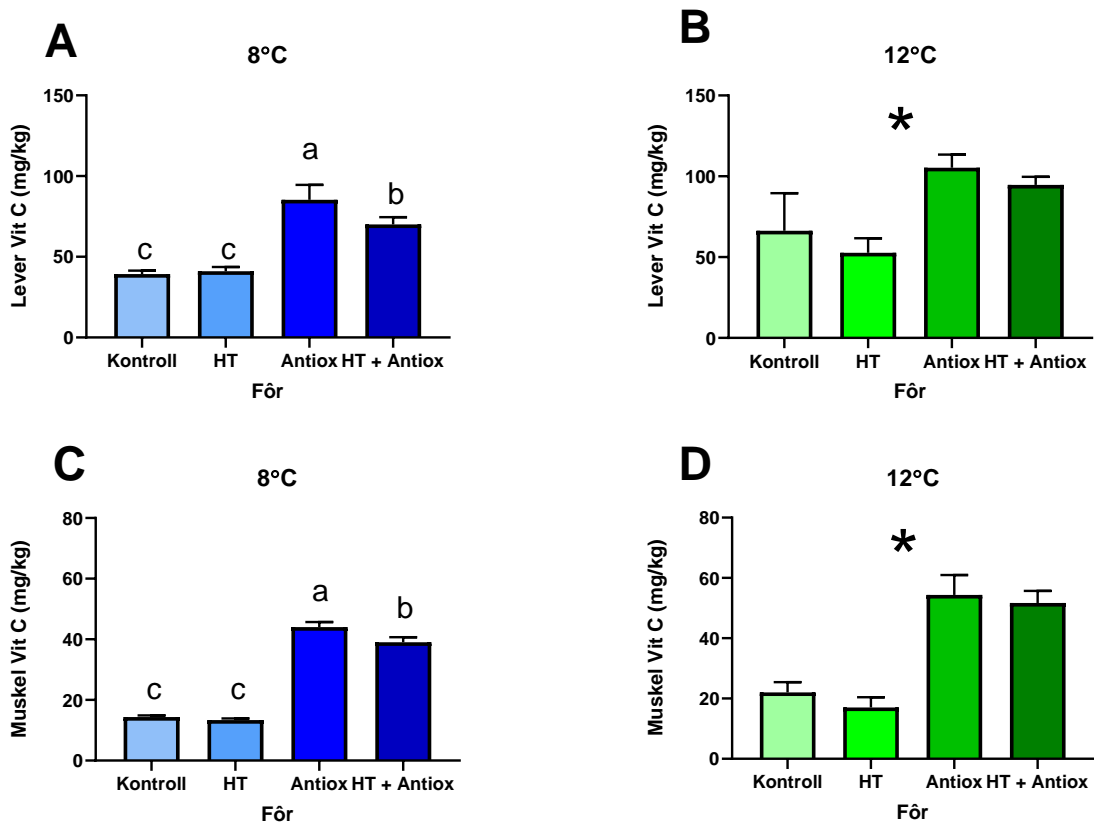
Konsentrasjonen av taurin i muskel var signifikant høyere i fisk gitt Tau i fôret (HT) for fisk på begge temperaturer, med rundt tre ganger høyere konsentrasjon ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ) enn uten ekstra taurin (Fig. 34). Summen av frie aminosyrer i muskel var signifikant høyere i fisk gitt fôr tilsatt His og Tau (HT) i fisk på  $12^\circ\text{C}$  ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ), mens det i fisk som gikk på  $8^\circ\text{C}$  ble funnet en interaksjonseffekt med lavere innhold av FAA i fisk som fikk bare antioksidanter, sammenlignet med fisken som fikk høyere innhold av His og Tau i fôret. Histidinkonsentrasjonen i muskel var ikke påvirket av His i fôret, og ble funnet i forholdsvis lave konsentrasjoner i alle grupper ( $0.4 \mu\text{mol/g}$ ).



Figur 34 Konsentrasjon av Tau (A, B) og summen av frie aminosyrer (C, D) i muskel ved avslutning av forsøkene (snitt  $\pm$ SD), i rognkjeks på henholdsvis  $8$  og  $12^\circ\text{C}$ , gitt fôr med og uten tilsatt histidin og taurin (HT) og antioksidanter (Antiox). Signifikante forskjeller forårsaket av tilsetning av His og Tau (HT) er markert med små bokstaver (x,y), interaksjonseffekter er markert med små bokstaver (a, b, c) ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

### Vitamin C

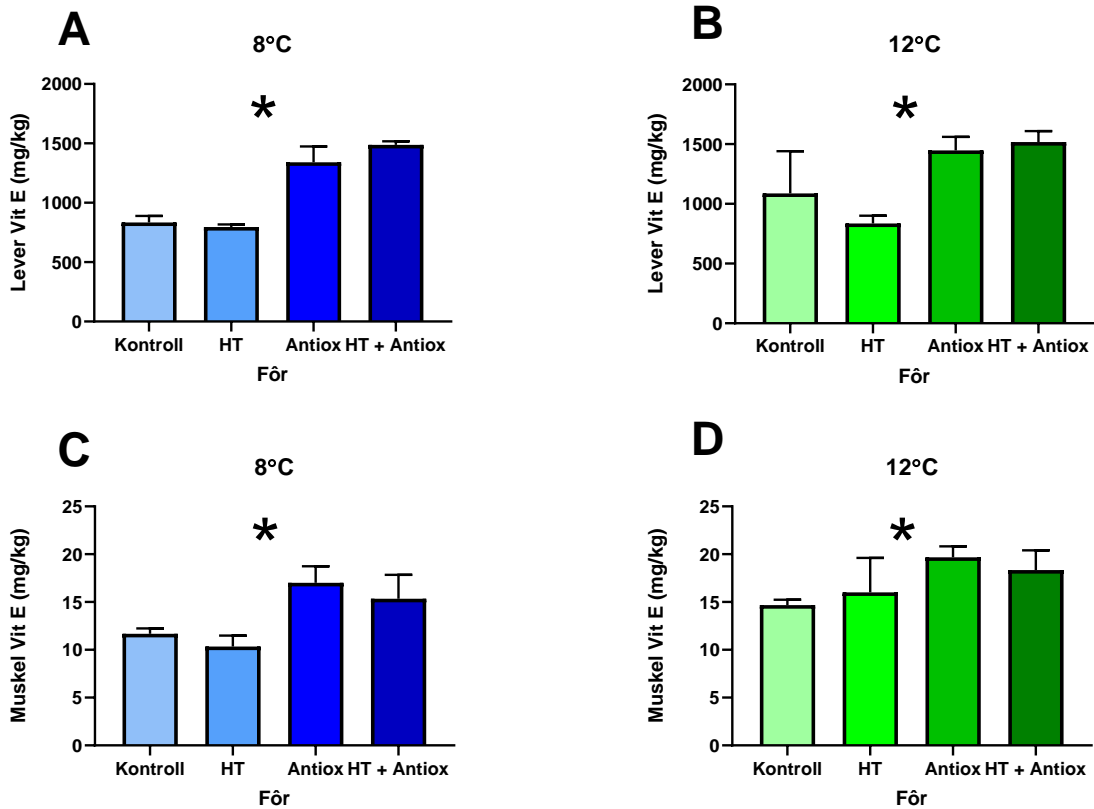
Vitamin C i både lever og muskel (Figur 35) var signifikant høyere i fisk gitt økt mengde vitamin C i fôret (Antiox), med rundt dobbelt så høye konsentrasjoner i lever og rundt tre ganger så høye konsentrasjoner i muskel ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). For fisken som gikk på 8°C var det en interaksjonseffekt med signifikant høyere konsentrasjon av vitamin C i både lever og muskel i fisken som bare fikk tilsatt antioksidanter sammenlignet med fisken som også fikk tilsatt His og Tau (HT) ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). Økt innhold av His og Tau alene påvirket ikke vitamin C konsentrasjonen i de analyserte vevene.



Figur 35 Konsentrasjon av vitamin C i lever (A,B) og muskel (C,D) ved avslutning av forsøkene (snitt  $\pm$  SD), i rognkjeks på henholdsvis 8 og 12°C. Signifikant effekt av antioksidanter er vist med asterisk (\*), interaksjonseffekter er vist med små bokstaver (a,b,c) ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

### Vitamin E

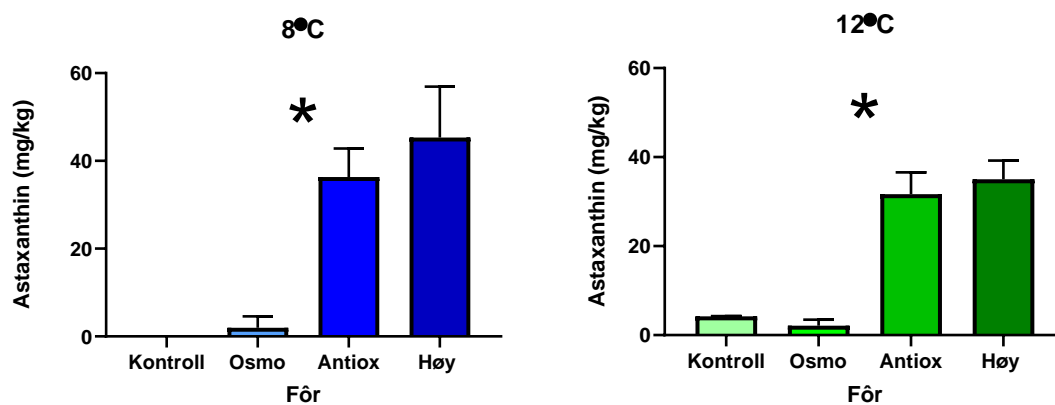
Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) konsentrasjonen i både lever og muskel (Figur 36) var signifikant høyere i fisk gitt antioksidantfôrene med tilsatt vitamin E ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) i fisk på begge temperaturer. Forskjellen var størst i lever, der det ble sett omtrent en dobling i konsentrasjonen, mens det i muskel var relativt sett mindre forskjeller (Figur 36). Konsentrasjonen av vitamin E var nesten 100 ganger høyere i lever enn i muskel.



Figur 36 Konsentrasjon av vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) i lever (A, B) og muskel (C, D) ved avslutning av forsøkene (snitt $\pm$ SD), i rognkjeks på henholdsvis 8 og 12°C. Signifikant effekt av antioksidanter er markert med asterisk (\*) ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

### Astaxanthin

Astaxanthin i lever var signifikant høyere i fisk gitt føret tilsatt antioksidanter, deriblant et høyt innhold av astaxanthin ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ , med konsentrasjoner rundt 36 ganger høyere for fisk på 8°C og 10 ganger høyere for fisk på 12°C). Fisken gitt kontrollføret på 8°C hadde marginale konsentrasjoner i lever (0.3 mg/kg), mens det hos fisken på 12°C var 4.2 mg/kg (Figur 37).



Figur 37 Astaxanthin i lever ved 8 og 12°C.

#### 4.4.3 Diskusjon

I dette studiet ble det undersøkt om tilsetning av utvalgte aminosyrer og antioksidanter kunne påvirke kataraktutvikling ved to ulike vanntemperaturer. Økt innhold av antioksidanter ga signifikant lavere alvorlighet av katarakt, noe som også er vist ved økt innhold av astaxanthin og vitamin C i fôr til laks (Waagbø et al., 2003) og indikert i en studie med rognkjeks der kommersielle rognkjeksdietter ble sammenlignet (Imsland et al., 2019). Derimot tyder den høye prevalensen av katarakt og den relativt sett lave forskjellen i alvorlighet i dette studiet på at det fremdeles er flere underliggende årsaker til at rognkjeks er så mottagelig for grå stær.

Katarakt ble ikke redusert av å øke innholdet av His og Tau i fôrene, derimot hadde fisken på 8°C noe høyere alvorlighet, mens det ved 12°C ikke var forskjellig fra kontroll, men høyere enn fisken gitt antioksidanter. Ved å øke histidininnholdet i fôret fikk linsen høyere konsentrasjon av histidin og NAH, selv om forskjellene er små sammenlignet med det man tidligere har sett på for eksempel laks med samme nivå i fôret (Remø et al., 2014). NAH konsentrasjonen var også mye lavere enn det som var sett i vill rognkjeks (Jonassen et al., 2017). Effekten av å ha høye konsentrasjoner av His i fôret ser dermed ut til å være små isolert sett, men sett i sammenheng med øvrige resultater kan dette også ha blitt påvirket av at linsen akkumulerer høye nivåer av andre aminosyrer. Summen av frie aminosyrer var også i dette studiet mye høyere enn det som tidligere er sett i vill rognkjeks (Jonassen et al., 2017). Som også observert tidligere var det spesielt høye konsentrasjoner av fenylalanin (Phe) i linsen, som også har vært relatert til alvorlighet på katarakt hos rognkjeks (Jonassen et al., 2017). I dette prosjektet hadde fisken gitt fôret tilsatt His og Tau lavere konsentrasjon av Phe i linsen ved 12°C, til tross for at kataraktskåren var høyere i disse gruppene. I villfisk ble det funnet svært lave nivåer av Phe i linsen i studiet av (Jonassen et al., 2017), slik at det er grunn til å tro at høye nivåer av Phe indikerer en ubalanse. Det lavere totale innholdet av frie aminosyrer i fisk gitt His og Tau ved 12°C kan likevel tyde på at denne tilsetningen bidrar til å påvirke vannbalansen i linsen, men at det likevel er omtrent dobbelt så høyt innhold av frie aminosyrer sammenlignet med villfisk.

Summen av frie aminosyrer i muskel var påvirket av tilsetning av His og Tau, men med høyere konsentrasjoner i disse gruppene, altså det motsatte av det som ble sett i linsen. Konsentrasjonene var også høyere enn det som er rapportert tidligere i både vill og oppdrettet rognkjeks, med henholdsvis 8.5 og 24 µmol/g i muskel (Jonassen et al., 2017), noe som støtter hypotesen om at det også i denne fisken blir akkumulert høye konsentrasjoner av frie aminosyrer i muskel i oppdrettet rognkjeks. Taurin utgjorde omtrent halvparten av summen av frie aminosyrer i muskel i de gruppene som fikk høyere Tau i fôret, og denne forskjellen kan forklare at det totale innholdet av aminosyrer var høyere i disse fiskene. Villfisken undersøkt i (Jonassen et al., 2017) hadde 5 µmol/g Tau i muskel, noe som også der var rundt halvparten av den totale konsentrasjonen av frie aminosyrer, men likevel langt lavere enn det som er sett i dette studiet.

Vitamin C og E ble tilsatt i fôrene basert på resultater fra mikronæringsstofforsøket (Kap 4.3) og forsøk med laks (Hamre, 2016). Vevsmetning av vitamin C i laks ble oppnådd ved 190 mg/kg vitamin C i fôret, mens i rognkjeks var vevsmetning ennå ikke oppnådd ved 320 mg/kg. Vitamin C konsentrasjonen i fôr med lavt nivå av antioksidanter var 150-170 mg/kg, ved høyt nivå var den 660-680 mg/kg i dette forsøket. Vitamin E ble ikke tilsatt i fôrene med lavt nivå av antioksidanter, fordi råvarene inneholdt mer vitamin E enn det som ble ansett som behovet hos laks (150 mg/kg, (Hamre, 2016). Lav antioksidant-fôrene hadde 240-250 mg/kg vitamin E, mens fôr med høyt antioksidantnivå inneholdt 380-390 mg/kg vitamin E. Siden vitamin C beskytter vitamin E mot oksidasjon, slik at vitamin C

forbrukes først (Hamre et al., 1997), kan man gjerne tilsette mer vitamin C enn E i fôr. Dette er bakgrunnen for at diettene med høyt antioksidantnivå inneholder mer vitamin C enn vitamin E. Konsentrasjonen av astaxantin i fôrene var 0,3-0,5 og 18 mg/kg. I fôr til laks tilsettes vanligvis minst 50 mg/kg astaxantin.

Oppsummert inneholdt fôrene med lavt og høyt antioksidant-nivå hhv lavt og høyt nivå av vitamin C, vitamin E og astaxanthin noe som ble reflektert i fiskens lever og muskel. Ved 8°C, men ikke ved 12°C, ble i tillegg vitamin C i disse vevene lavere når fôret tilsatt høye nivå av His og Tau. Fôrene med høyt innhold av vitamin C hadde rundt fire ganger så høy konsentrasjon som de uten tilsatt vitamin C, mens forskjellene i lever og muskel var relativt mindre. Dette tyder på at vevsmetning med vitamin C oppstår ved fôrkonsentrasjoner mellom 360 (Kap 4.2) og 670 mg/kg. Sammenhengen mellom vitamin E i fôret og vitamin E i muskel var også lineær i mikronæringsstoffstudiet. Vevsmetning i muskel og hel kropp oppnås heller ikke i laks gitt fôr med samme vitamin E konsentrasjoner som her, men er blitt oppnådd i andre arter (Peng and Gatlin lii, 2009), (Hamre, 2011). I dette forsøket lå begge fôrkonsentrasjonene av vitamin E innenfor det lineære området funnet i mikronæringsstoff-forsøket og konsentrasjonene i muskel samsvarte også. I lever var konsentrasjonene av vitamin E mye høyere enn i muskel, noe som også samsvarer med resultater fra laks (Hamre, 2011). Astaxanthin i lever reflekterte astaxanthin i fôret, i omtrent samme størrelsesorden som forskjellene i fôrene på 8°C, men med mindre forskjell på 12°C. Rødfarge i lever blir brukt som velferdsindikator hos rognkjeks der optimal leverscore korresponderte med astaxanthinkonsentrasjon mellom 26 og 85 mg/kg (Eliassen et al., 2020). Alle gruppene som fikk tilsatt astaxanthin i fôret hadde konsentrasjoner i lever innenfor dette området.

I dette forsøket førte fôr med høyt innhold av antioksidanter til lavere alvorlighetsgrad, uten å påvirke prevalens av katarakt, som var >90% i alle grupper. Dette tyder på at oksidasjon er en medvirkende årsak, antagelig sammen med andre faktorer, til katarakt i rognkjeks. Dette forholdet er kjent, både fra laks og human litteratur (Waagbø et al., 2003; Williams, 2006). Forsøket er satt opp som en screening av de tre antioksidantene, med høye eller lave nivåer, uten finjustering av absolutte konsentrasjoner eller forhold mellom dem. Videre arbeid bør fokusere på dette. Det var også en interaksjon mellom His og Tau og antioksidanter, der høyt nivå av antioksidanter ga lavere vevskonsentrasjoner av vitamin C ved 8°C, med en lignende tendens ved 12°C. Interaksjoner mellom taurin og vitamin C+E har blitt beskrevet i gilthead seabream av (Izquierdo et al., 2019). I denne studien beskyttet taurin mot høye og prooksidative nivå av vitamin C+E og ga en positiv effekt på beindeforiteter ved medium nivå av disse vitaminene. Effekt av astaxantin på katarakt i laks er vist av Waagbø et al. (2003), og er antagelig også viktig i rognkjeks, men nivåer og samspill med andre antioksidanter og pro-oksidanter bør undersøkes nærmere.

#### 4.4.4 Konklusjon

1. Tilsetting av antioksidanter i fôret ser ut til å gi en positiv effekt på alvorlighetsgrad av katarakt i rognkjeks. Videre arbeid for å justere konsentrasjoner og forhold mellom vitamin C, E og astaxantin, samt andre antioksidanter og utvalgte mineraler er nødvendig.
2. His og Tau har en effekt på metabolismen, men den faktiske effekten på utvikling av katarakt er uklart.
3. Behovet for His og Tau hos rognkjeks er ikke kjent, og nivåene som er testet her er som for antioksidantene enten høye eller lave.



## 5 Oppnådde resultater

Dette har vært et pionerprosjekt når det gjelder næringsbehov hos rensefisk, og bidrar med åpent tilgjengelig, grunnleggende kunnskap om ernæring av rognkjeks som kan brukes i formulering av fôr til rognkjeks. Ved å styrke kunnskapsgrunnlaget innen ernæring av rensefisk kan arbeidet bidra til å utvikle fôr som sikrer produksjon av rensefisk med god overlevelse, helse og velferd. Dette er en forutsetning både for samfunnsmessig aksept for bruk av rensefisk i lakseoppdrett, og for at rensefisken skal fungere effektivt som lusespisere.

Rognkjeks kan vokse veldig raskt når forholdene ligger til rette for det. Dersom man ønsker høy vekst hos rognkjeks fra 15 til 50 g, er fôret som inneholdt 55 % protein, 17 % fett og 6 % karbohydrat det mest optimale. I produksjon av settefisk kan dette være en fordel, da man raskt kan produsere fisk for utsett. På den andre siden ønsker man ofte å holde tilbake veksten for at ikke fisken skal bli for stor når den settes ut i laksemerden. En mulighet er da å bruke fôr med ca. 55 % protein, øke karbohydratinnhold til 11 % og senke fettinnhold til 12 %, et fôr som trolig kan brukes for alle størrelser av rognkjeks. Både for høyt og for lavt proteinnivå så ut til å gi suboptimal immunrespons, derfor anbefales et middels nivå av protein (ca. 55 %).

Balanse mellom hovednæringsstoffer påvirker fisken på flere områder. Innhold av fett i fôr påvirket i sterk grad både tilvekst og fettinnhold i lever og muskel, og vi kjenner ikke fullt ut konsekvensene av endringer i kroppssammensetning. Morfologi og funksjon av tarm var også påvirket. Blindsekkene viste klare tegn på steatose som økte med økende fettinnhold i fôret, en indikasjon på liten tilførsel av kolin eller andre essensielle næringsstoffer som er nødvendige for utnyttelsen av kolin. Midttarmen hadde den største kapasiteten for fordøyelse og absorpsjon av næringsstoffer. Innholdet av fordøyelsesenzymer i tarmen viste tilpasninger til fôrets sammensetning. Ekspresjon av immungener i tarm og gener involvert i barriere- og strukturefunksjoner var også påvirket.

Et fordøyelighetsforsøk viste at rognkjeks har høy kapasitet til å fordøye fett, middels kapasitet til å fordøye protein, og lav kapasitet til å fordøye karbohydrater (stivelse). Dette underbygger resultatene fra vekstforsøket der vi så at fettinnhold i fôr i stor grad påvirket vekst, mens å øke karbohydratnivået på bekostning av fett ga redusert vekst. Dette kan man til en viss grad bruke til å regulere veksthastigheten når det er ønskelig. Det kan også være andre måter å regulere næringstetthet i fôr, for å redusere veksthastighet. Det trengs mer arbeid på dette området for å forstå sammenhenger mellom fôr, vekst og kroppssammensetning, og konsekvenser av ulike strategier.

I forsøket med mikronæringsstoffer var det ingen forskjeller i vekst, overlevelse eller kroppssammensetning av hovednæringsstoffer i fisk fôret med en mikronæringsstoffpakke som tilsvarte mellom 25 og 400 % av antatt behov, basert på NRC (2011). Vitamin C behovet hos rognkjeks ser ut til å være høyere enn hos laks, mens behovet for de fleste andre vitaminene og mineralene ser ut til å ligge på lignende nivå som hos andre arter. Vi har estimert et maksimum for jod, jern og mangan i dette prosjektet. Biotin var også antagelig tilsatt over maksimum. Mineralene, og enkelte vitaminer, er ofte giftige over et visst nivå, der de begynner å akkumulere i fisken. Hvert næringsstoff har sitt eget optimalnivå. Derfor må en næringspakke for rognkjeks formuleres basert på behovsestimatet for hvert av dem og det fôret som inneholdt 100 % næringspakken er derfor ikke optimalt. Av ulike grunner lyktes vi ikke med å estimere behov for alle mikronæringsstoffene, de som mangler er panthotene, niacin, vitamin A, D, K, og selen. Undersøkelser av tarmfunksjon og tarmhelse bekreftet resultater fra forsøk med hovednæringsstoffer, at generell tarmfunksjon er god, uten tydelige forskjeller mellom

fôrgrupper, men at fôret ikke inneholdt tilstrekkelige mengder kolin for effektiv transport av lipid fra tarmen. Det var altså ingen av fôrene som ga negative effekter på et overordnet nivå, innenfor den tiden forsøket varte. Vi vet likevel ikke noe om eventuelle langtidseffekter av de ulike nivåene som ble testet.

Vitaminer og mineraler går også inn i problemstillinger knyttet til forekomst av katarakt. Tilsetning av antioksidanter i fôret ser ut til å redusere alvorlighetsgraden av katarakt hos rognkjeks, men det vil være nødvendig å finjustere konsentrasjoner og forholdsmessig tilsetning av vitamin C, E og astaxantin, sammen med andre antioksidanter, utvalgte mineraler og aminosyrer. Forsøkene med makro- og mikro-næringsstoffer viser at alle fôrsammensetningene vi har testet i dette prosjektet gir høye nivå av katarakt i rognkjeks. Dette tyder på at man bør tenke nytt i forhold til fôrsammensetning for rognkjeks og blant annet undersøke om mindre næringstette fôr gir bedre osmoregulering og dermed lavere innslag av katarakt.

Det er et klart behov for videre arbeid for å få mer utfyllende kunnskap om næringsbehovene hos rognkjeks. Viktige momenter vil være bruk av råvarer som gir mindre næringstette fôr, effekt av fôrsammensetning på katarakt, langtidseffekter av ulik fôrsammensetning, og mulige konsekvenser av endringer i kroppssammensetning.

## 6 Hovedfunn

- Fôr med 55 % protein, 17 % fett og 6 % ga raskest vekst mens høyere (68 %) og lavere (43 %) proteininnhold ga suboptimal immunrespons.
- Høyt nivå av fett i fôr ga høyere nivå av fett i lever og muskel.
- Tarmsystemet hos rognkjeks er velutviklet, men pH i mage hos rognkjeks faller ikke før fisken er ca. 1,0-1,5 gram. Dette gjør at den må ha agglomerert eller kaldekstrudert fôr til den når denne størrelsen.
- Rognkjeksens kapasitet til å fordøye næringsstoffer er høy for fett, middels for protein og lav for karbohydrater (stivelse). Ved å bytte ut fett mot karbohydrater kan man til en viss grad styre veksthastigheten, men konsekvenser av ulik kroppssammensetning bør undersøkes.
- Det kan være nødvendig å tilsette mer kolin i fôrene enn det som ble brukt i forsøksfôrene for å bedre transporten av fett fra tarm lever og kropp.
- Vitamin C behovet hos rognkjeks er antagelig er høyere enn hos laks (>360 mg/kg), mens behovet for de fleste andre vitaminene og mineralene ligger på lignende nivå som hos andre arter. Vi fant en positiv effekt av antioksidanter på alvorlighetsgrad av katarakt. Videre arbeid bør inkludere finjustering av fôrnivå av vitamin C, E og astaxantin sammen med andre antioksidanter og utvalgte mineraler for å motvirke katarakt.
- Den høye forekomsten av katarakt med alle diettene i dette prosjektet kan tyde på at man bør tenke nytt i forhold til fôrsammensetning for rognkjeks, deriblant undersøke om mindre næringstette fôr gir bedre osmoregulering og dermed lavere innslag av katarakt.

## 7 Leveranser

Tabell 16 Viser leveranser i løpet av prosjektperioden.

Tid	Leveranse
Juni 2017	Oppslag nofima.no Info om prosjektet
2017-2021	Statusrapporter til FHF som avtalt
Mars 2018	FHF Dialogmøte rensesk, Bergen
Mars 2018	Rensesknytt
Juni 2019	Faktaark AP1, prosessmetode for fôr til berggylt
May 2019	Wrasse workshop University of Stirling, Skottland, presentasjon av prosjektet
Oktober 2019	Abstract AP2 innsendt og godkjent, EAS ikke gjennomført pga. korona 2020
Februar 2021	Nyhets sak Nofima
Mars 2021	FHF Digitalt dialogmøte berggylt
April 2021	Vitenskapelig artikkel AP2 sendt Aquaculture Nutrition, akseptert med endringer
Mars 2021	Vitenskapelig artikkel AP1 akseptert i Animal Feed Science and Technology
Mars 2021	Faktaark AP2, hovednæringsstoff til rognkjeks
Mars 2021	Faktaark AP3, mikronæringsstoff rognkjeks
Mai 2021	International Ballan Wrasse Conference, presentasjon AP1 Fôrteknologi
Juni 2021	FHF Sluttrapporter

### Foredrag

Lein, I., Berge, G.M., Hamre, K., Remø, S., Kortner, T., Krogdahl, Å., Kousoulaki, K., Bogevig, A.S., Sæle, Ø., 2018. Presentasjon av CleanFeed med foreløpige resultater. FHF Dialogmøte, Bergen, 13. mars 2018.

Lein, I., 2019. Production of ballan wrasse – the most efficient cleanerfish. Cleaner Fish Workshop, University of Stirling, Skottland. 22-23. Mai 2019.

Berge, G.M., 2019. Hovednæringsstoff i fôr til rognkjeks. Det norske fiskeernæringsseminaret 2019, Bergen, 13.-14. november 2019.

Lein, I., Berge, G.M., Kousoulaki, K., Sæle, Ø., Hamre, K., Remø, S., 2019. Presentasjon på Kielferga? Ernæringskrav hos rensesk. Foredrag på Skretting-seminar på Kielferga, 6. november 2019.

Lein, I., Berge, G.M., Hamre, K., Kortner, T., Krogdahl, Å., Sæle, Ø., 2021. Produksjon av fôr og fôrråstoff til berggylt. FHF Produksjon av berggylt. 11. mars 2021. Webinar.

Kousoulaki, K., 2021. The importance of feed technical quality in Ballan wrasse weaning performance. International Ballan Wrasse Conference, 27. Mai 2021. Arrangert av SAIC og Univ. Stirling, Skottland. Digital konferanse.

Hamre, K., Berge, G.M., Sæle, Ø., Holen, E., Kousoulaki, K., Remø, S.C., Krogdahl, Å., Lein, I., 2021. Balansert sammensetning av makronæringsstoffer i fôr til rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*). Det norske fiskeernæringsseminaret 2021. Kløfta, 9.-10. november 2021.

Kousoulaki, Grøtan, E., Kortner, T.M., Berge, G.M., Haustveit, G., Krogdahl, Å., Nygaard, H., Sæle, Ø., Chikwati, E.M., Lein, I. Betydning av fôrets tekniske kvalitet for oppdrettsberggylt. Det norske fiskeernæringsseminaret 2021. Kløfta, 9.-10. november 2021.

Zhou, W., Krogdahl, Å. Chikwati, E., Lein, I., Berge, G.M., Kousoulaki, K., Kortner, T.M., 2021. Nutrient digestibility in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). Det norske fiskeernæringsseminaret 2021. Kløfta, 9.-10. november 2021.

### **Faktaark**

Faktaark AP1: Beskriver hvordan en reduksjon av temperaturen under ekstrudering av fôr til berggylt påvirker overlevelse, opptak av mineraler og utvikling av skjelettdeformiteter.

Faktaark AP2: Beskriver behov for ulike hovednæringsstoffer og tarmfunksjoner hos rognkjeks, og effekt av fôr på immunsystemet

Faktaark AP3: Beskriver forsøk med ulik tilsetning av vitaminer og mineraler i fôr til rognkjeks, og hvordan dette påvirker prestasjon.

### **Publisering**

Kousoulaki, K., Grotan, E., Kortner, T.M., Berge, G.M., Haustveit, G., Krogdahl, Å., Nygaard, H., Sæle, Ø., Chikwati, E.M., Lein, I., 2021. Technical feed quality influences health, digestion patterns, body mineralization and bone development in farming of the stomachless cleanerfish ballan wrasse (*Labrus berggylta*). *Animal Feed Science and Technology* 274 (2021) 114830. Open access.

Hamre, Kristin, Berge, G.M., Sæle, Ø., Holen, E., Kousoulaki, K., Remø, S.C., Krogdahl, Å., Lein, I. (Submitted March 2021). Macronutrient balance in diets for lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Aquaculture nutrition*.

Zhou, W., Kortner, T.M., Chikwati, E., Hamre, K., Kousoulaki, K., Lein, I., Berge, G.M., Sæle, Ø., Krogdahl, Å. Gut functions in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) respond to variation in diet macronutrient composition. Manuscript.

### **Oppslag i media**

Norsk:

<https://nofima.no/nyhet/2021/02/en-type-for-ma-unngas-i-berggyltoppdrett-for-a-unngamisdannelser/>

Engelsk:

<https://nofima.no/en/nyhet/2021/02/farmed-ballan-wrasse-must-not-be-given-this-type-of-feed/>

## 8 Referanser

- Bjerkås, E., Breck, O., Waagbo, R., 2006. The role of nutrition in cataract formation in farmed fish. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 1.
- Breck, O., Bjerkås, E., Campbell, P., Rhodes, J., Sanderson, J., Waagbø, R., 2005. Histidine nutrition and genotype affect cataract development in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of fish diseases 28, 357-371.
- CEN, 1999. Foodstuffs – Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography - Measurement of cholecalciferol (D3) and ergocalciferol (D2). . (CEN, Comité Européen de Normalisation)
- CEN, 2003a. Foodstuffs -Determination of Vitamin B1 by HPLC, EN 14122. (CEN, Comité Européen de Normalisation), 17.
- CEN, 2003b. Foodstuffs -Determination of Vitamin B2 by HPLC, EN 14152 (CEN, Comité Européen de Normalisation) 14.
- CEN, 2003c. Foodstuffs – Determination of vitamin K1 by HPLC. , EN 14148 ( CEN, Comité Européen de Normalisation ).
- CEN, 2005. Foodstuffs - Determination of vitamin B6 (including its glycosylated forms) by HPLC, EN 14663. (CEN, Comité Européen de Normalisation)
- Chikwati, E.M., Gu, J., Penn, M.H., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., 2013. Intestinal epithelial cell proliferation and migration in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: effects of temperature and inflammation. Cell and tissue research 353, 123-137.
- Cohen, S., Michaud, D., 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysate amino acids via high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem 211, 279-287.
- Davenport, J., Kjørsvik, E., 1986. Buoyancy in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 66, 159-174.
- Eliassen, K., Patursson, E.J., McAdam, B.J., Pino, E., Morro, B., Betancor, M., Baily, J., Rey, S., 2020. Liver colour scoring index, carotenoids and lipid content assessment as a proxy for lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) health and welfare condition. Scientific Reports 10, 1-12.
- Gajardo, K., Jaramillo-Torres, A., Kortner, T.M., Merrifield, D.L., Tinsley, J., Bakke, A.M., Krogdahl, Å., 2017. Alternative protein sources in the diet modulate microbiota and functionality in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Applied and environmental microbiology 83, e02615-02616.
- Hamre, K., 2011. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. Aquaculture nutrition 17, 98-115.
- Hamre, K., 2016. Får stamfisk av rognkjeks riktig fôr?, in: T. Jonassen, Imsland, A (Ed.), «Stamfiskhold og eggproduksjon av rognkjeks», Akvaplan-niva AS Rapport 6838 - 1.
- Hamre, K., Kolås, K., Sandnes, K., 2010. Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants. Food Chemistry 119, 270-278.
- Hamre, K., Nordgreen, A., Grøtan, E., Breck, O., 2013. A holistic approach to development of diets for Ballan wrasse (*Labrus berggylta*)—a new species in aquaculture. PeerJ 1, e99.
- Hamre, K., Sissener, N.H., Lock, E.-J., Olsvik, P.A., Espe, M., Torstensen, B.E., Silva, J., Johansen, J., Waagbø, R., Hemre, G.-I., 2016. Antioxidant nutrition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt, fed diets with high inclusion of plant ingredients and graded levels of micronutrients and selected amino acids. PeerJ 4, e2688.

- Haugland, M., 2001. Rognkjeksens (*Cycloptera lumpus* L) næringsøkologi i oppvekstområdene i Norskehavet - med spesiell vekt på geleplankton. Universitetet i Bergen.
- Hemre, G.-I., Lock, E.-J., Olsvik, P.A., Hamre, K., Espe, M., Torstensen, B.E., Silva, J., Hansen, A.-C., Waagbø, R., Johansen, J.S., 2016. Atlantic salmon (*Salmo salar*) require increased dietary levels of B-vitamins when fed diets with high inclusion of plant based ingredients. *PeerJ* 4, e2493.
- Hillestad, M., Johnsen, F., 1994. High-energy/low-protein diets for Atlantic salmon: effects on growth, nutrient retention and slaughter quality. *Aquaculture* 124, 109-116.
- Imsland, A.K.D., Reynolds, P., Jonassen, T.M., Hangstad, T.A., Adron, J., Elvegård, T.A., Urskog, T.C., Hanssen, A., Mikalsen, B., 2019. Comparison of diet composition, feeding, growth and health of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) fed either feed blocks or pelleted commercial feed. *Aquaculture Research* 50, 1952-1963.
- Izquierdo, M., Domínguez, D., Jiménez, J.I., Saleh, R., Hernández-Cruz, C.M., Zamorano, M.J., Hamre, K., 2019. Interaction between taurine, vitamin E and vitamin C in microdiets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 498, 246-253.
- Jonassen, T., Hamadi, M., Remø, S., Waagbø, R., 2017. An epidemiological study of cataracts in wild and farmed lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) and the relation to nutrition. *Journal of fish diseases* 40, 1903-1914.
- Julshamn, K., Lundebye, A.-K., Heggstad, K., Berntssen, M., Boe, B., 2004. Norwegian monitoring programme on the inorganic and organic contaminants in fish caught in the Barents Sea, Norwegian Sea and North Sea, 1994–2001. *Food additives and contaminants* 21, 365-376.
- Kortner, T.M., Gu, J., Krogdahl, Å., Bakke, A.M., 2013. Transcriptional regulation of cholesterol and bile acid metabolism after dietary soyabean meal treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *British Journal of Nutrition* 109, 593-604.
- Kortner, T.M., Penn, M.H., Björkhem, I., Måsøval, K., Krogdahl, Å., 2016. Bile components and lecithin supplemented to plant based diets do not diminish diet related intestinal inflammation in Atlantic salmon. *BMC veterinary research* 12, 1-12.
- Kousoulaki, K., Bøgevik, A., Skiftesvik, A., Jensen, P., Opstad, I., 2015. Marine raw material choice, quality and weaning performance of Ballan wrasse (*L. abrus bergylta*) larvae. *Aquaculture Nutrition* 21, 644-654.
- Kousoulaki, K., Grøtan, E., Kortner, T., Berge, G., Haustveit, G., Krogdahl, Å., Nygaard, H., Sæle, Ø., Chikwati, E., Lein, I., 2021. Technical feed quality influences health, digestion patterns, body mineralization and bone development in farming of the stomachless cleaner fish ballan wrasse (*Labrus bergylta*). *Animal Feed Science and Technology* 274, 114830.
- Krogdahl, Å., Bakke-McKellep, A.M., 2005. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 141, 450-460.
- Krogdahl, Å., Hansen, A.K.G., Kortner, T.M., Björkhem, I., Krasnov, A., Berge, G.M., Denstadli, V., 2020a. Choline and phosphatidylcholine, but not methionine, cysteine, taurine and taurocholate, eliminate excessive gut mucosal lipid accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 528, 735552.
- Krogdahl, Å., Kortner, T.M., Jaramillo-Torres, A., Gamil, A.A.A., Chikwati, E., Li, Y., Schmidt, M., Herman, E., Hymowitz, T., Teimouri, S., 2020b. Removal of three proteinaceous antinutrients from soybean does not mitigate soybean-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquaculture* 514, 734495.

- Li, Y., Kortner, T.M., Chikwati, E.M., Belghit, I., Lock, E.-J., Krogdahl, Å., 2020. Total replacement of fish meal with black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal does not compromise the gut health of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 520, 734967.
- Li, Y., Kortner, T.M., Chikwati, E.M., Munang'andu, H.M., Lock, E.-J., Krogdahl, Å., 2019. Gut health and vaccination response in pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Fish & shellfish immunology* 86, 1106-1113.
- Mahmoud, A.M., Ali, M.M., 2019. Methyl donor micronutrients that modify DNA methylation and cancer outcome. *Nutrients* 11, 608.
- Moren, M., Opstad, I., Berntssen, M., Infante, J.-L.Z., Hamre, K., 2004. An optimum level of vitamin A supplements for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) juveniles. *Aquaculture* 235, 587-599.
- Mæland, A., Rønnestad, I., Fyhn, H., Berg, L., Waagbø, R., 2000. Water-soluble vitamins in natural plankton (copepods) during two consecutive spring blooms compared to vitamins in *Artemia franciscana* nauplii and metanauplii. *Marine Biology* 136, 765-772.
- Mæland, A., Waagbø, R., 1998. Examination of the qualitative ability of some cold water marine teleosts to synthesise ascorbic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 121, 249-255.
- NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National academies press.
- O'Dowd, J.J., Cairns, M.T., Trainor, M., Robins, D.J., Miller, D.J., 1990. Analysis of carnosine, homocarnosine, and other histidyl derivatives in rat brain. *Journal of neurochemistry* 55, 446-452.
- Peng, L., Gatlin Iii, D., 2009. Dietary vitamin E requirement of the red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture Nutrition* 15, 313-319.
- Prabhu, P.A.J., Lock, E.-J., Hemre, G.-I., Hamre, K., Espe, M., Olsvik, P.A., Silva, J., Hansen, A.-C., Johansen, J., Sissener, N.H., 2019. Recommendations for dietary level of micro-minerals and vitamin D3 to Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt when fed low fish meal diets. *PeerJ* 7, e6996.
- Remø, S., Hevrøy, E., Olsvik, P., Fontanillas, R., Breck, O., Waagbø, R., 2014. Dietary histidine requirement to reduce the risk and severity of cataracts is higher than the requirement for growth in Atlantic salmon smolts, independently of the dietary lipid source. *British Journal of Nutrition* 111, 1759-1772.
- Romarheim, O.H., Aslaksen, M.A., Storebakken, T., Krogdahl, Å., Skrede, A., 2005. Effect of extrusion on trypsin inhibitor activity and nutrient digestibility of diets based on fish meal, soybean meal and white flakes. *Archives of animal nutrition* 59, 365-375.
- Romarheim, O.H., Skrede, A., Penn, M., Mydland, L.T., Krogdahl, Å., Storebakken, T., 2008. Lipid digestibility, bile drainage and development of morphological intestinal changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing defatted soybean meal. *Aquaculture* 274, 329-338.
- Stern, R.A., Mozdziak, P.E., 2019. Differential ammonia metabolism and toxicity between avian and mammalian species, and effect of ammonia on skeletal muscle: A comparative review. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 103, 774-785.
- Torstensen, B.E., Frøyland, L., Ørnsrud, R., Lie, Ø., 2004. Tailoring of a cardioprotective muscle fatty acid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed vegetable oils. *Food chemistry* 87, 567-580.



- Waagbø, R., Hamre, K., Bjerkås, E., Berge, R., Wathne, E., Lie, Ø., Torstensen, B., 2003. Cataract formation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., smolt relative to dietary pro-and antioxidants and lipid level. *Journal of fish diseases* 26, 213-229.
- Wall, T., Bjerkas, E., 1999. A simplified method of scoring cataracts in fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19, 162-165.
- Williams, D.L., 2006. Oxidation, antioxidants and cataract formation: a literature review. *Veterinary Ophthalmology* 9, 292-298.

