

Nordatlantiske fiskeoljer og betydning for utnyttelse av omega-3 fettsyrer

Faglig sluttrapport

Tone-Kari K Østbye, Gerd Marit Berge, Aleksei Krasnov, Odd Helge Romarheim, Astrid Nilsson, Målfrid Bjerke, Marianne Selander Hansen, Graham Burdge, Nicola A. Irvine og Bente Ruyter





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
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA



Creative commons gjelder når ikke annet er oppgitt

Rapport

<i>Tittel:</i> Nordatlantiske fiskeoljer og betydning for utnyttelse av omega-3 fettsyrer	ISBN 978-82-8296-571-2 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Title:</i> North Atlantic fish oils and importance for utilization of omega-3 fatty acids	<i>Rapportnr.:</i> 26/2020
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Tone-Kari K. Østbye ¹ , Gerd Marit Berge ¹ , Aleksei Krasnov ¹ , Odd Helge Romarheim ¹ , Astrid Nilsson ¹ , Målfrid Bjerke ¹ , Marianne Selander Hansen ¹ , Graham Burdge ² , Nicola A. Irvine ² og Bente Ruyter ¹ ¹ Nofima ² Universitet i Southampton	<i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Avdeling:</i> Ernæring og forteknologi	<i>Dato:</i> 6. februar 2020
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 36
<i>Stikkord:</i> Omega-3-syntese, EPA, DHA, laks, retensjon, ketolinsyre, nordatlantiske fiskeoljer, sild, sardin	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 901353
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i> Se kapittel 1.	<i>Prosjektnr.:</i> 11975

Innhold

1	Sammendrag	1
2	Innledning	2
2.1	Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt	2
2.2	Prosjektets omfang	3
2.3	Prosjektorganisering	3
3	Problemstilling og formål	5
3.1	Prosjektets effektmål	5
3.2	Prosjektets resultatmål	5
4	Prosjektgjennomføring	6
4.1	Gjennomføring av prosjekt	6
4.2	Metodikk	6
4.2.1	Fôrproduksjon og formulering til lakseforsøket	6
4.2.2	Fôringsforsøk med laks	7
4.2.3	Beregninger og analyser fra fiskeforsøk	7
4.2.4	Analyse av fett og fettsyresammensetning i helfisk, lever og fôr	8
4.2.5	Analyse av pigment i laksefilet	8
4.2.6	Analyse av kjemisk sammensetning i laksefilet	9
4.2.7	Analyse av genuttrykk (microarray) i lakselever	9
4.2.8	Fôringsforsøk med rotte (DodreMarin)	9
4.2.9	Fôringsforsøk med mus	10
5	Oppnådde resultater og diskusjon	11
5.1	Fôringsforsøk med laks	11
5.1.1	Fettsyresammensetning av forsøksfôr	11
5.1.2	Vekst	13
5.1.3	Organindeks og kondisjonsfaktor	14
5.1.4	Dødelighet	14
5.1.5	Fett og fettsyresammensetning i lever	15
5.1.6	Fett og fettsyresammensetning i fillet	18
5.1.7	Retensjon	21
5.1.8	Pigment	23
5.1.9	Genuttrykksanalyse	24
5.2	Fôringsforsøk med rotte	27
5.2.1	Fettsyresammensetning i dietten	27
5.2.2	Fettsyresammensetning i røde blodceller	27
5.3	Fôringsforsøk med mus	29
5.3.1	Vekst	29
5.3.2	Fettsyresammensetning i lever	29
6	Konklusjon	32
7	Videre anbefalinger	33
8	Leveranser	34
9	Referanser	35

1 Sammendrag

Norsk sammendrag

Det overordnede formålet med prosjektet var å finne ut om inntak av en nordatlantisk fiskeolje rik på ketolinsyre eller inntak av ketolinsyre i ren form stimulerer kapasiteten til henholdsvis laks og humanmodelldyrene rotte og mus til å omdanne α -linolensyre (ALA, 18:3n-3) fra planteolje, til de lengre flerumettede omega-3 fettsyrene EPA og DHA.

I fôringsforsøk ble Atlantisk laks, med startvekt på 170 gram, gitt tre ulike doser av hhv. sildeolje og sardinolje i fôret fram til en sluttvekt på 480g. Diettene ble balansert for ALA og summen av EPA+DHA på de ulike innblandingsnivåene, mens innhold av hhv. EPA og DHA varierte slik at sildediettene hadde høyere innhold av ketolinsyre og DHA i forhold til sardindieltene, mens sardindieltene hadde høyere EPA innhold. Ved avslutning av forsøket viste laks fôret med sildeolje 13 % poeng økning i retensjon av summen EPA+DHA i helkropp sammenlignet med fisk fôret sardinoljedielt. Dette til tross for et høyere innhold av DHA i sildeoljedieltene, som kan være med og hemme sin egen syntese. Microarray-analyse av lever indikerte at sildeolje i dietten medførte mindre grad av hemming sentrale gener i omega-3-syntesen sammenliknet med inntak av sardinolje i dietten.

Fôringsforsøk med rotter ble gjennomført i samarbeid med prosjektet DodreMarin (NRF256448). Rotter ble fôret med en blanding av tobisolje (nordatlantiske fiskeoljen rik på ketolinsyre) og camelinaolje (planteoljen rik på ALA forløperen til EPA og DHA). Fôringsforsøket viste at rotter kan utnytte ALA fra camelinaolje til syntese av EPA og DHA og at økende innhold av ketolinsyre fra tobisolje korrelerte med økt EPA og DHA innhold i rottenes røde blodceller.

Effekten av ren ketolinsyre på omdanning av ALA til EPA og DHA og potensielle kjønnsforskjeller ble studert i musemodell. De eksperimentelle gruppene av mus ble gitt tre ulike doser av ren ketolinsyre, blandet i soyaolje, som sondefôring i tillegg ble en kontrollgruppe kun sondefôret med soyaolje. På grunn av metodiske utfordringer med løselighet av ren ketolinsyre i musetarmen er det vanskelig å trekke sikre konklusjoner fra dette forsøket.

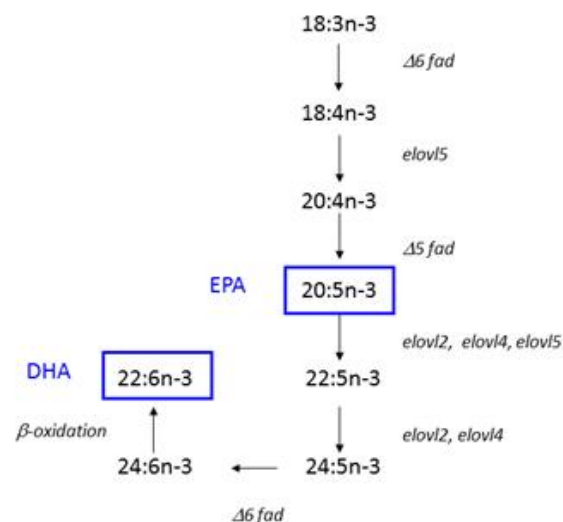
Resultater fra dette prosjektet har gitt mer kunnskap om potensielle fortrinn ved det høye innholdet av monoumettede fettsyrer i nordatlantiske fiskeoljer. Kunnskapen kan føre til merverdi på nordatlantiske fiskeoljer. Prosjektresultatene vil også gjøre næringsaktørene innenfor havbruk bedre rustet til å vurdere hvordan ulike typer fiskeoljer i kombinasjon med planteoljer best kan utnyttes for å gi best mulig retensjon av EPA og DHA i fisken. Prosjektet gir innledende resultater som indikerer mulige humane helseeffekter av nordatlantiske fiskeoljer med høyt innhold av ketolinsyre, noe som kan få betydningen for utnyttelsen av disse oljene inn mot helsekostmarkedet i fremtiden.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

Marine oljer representerer en begrenset ressurs på verdensmarkedet, noe som gjør det viktig å fokusere på best mulig bærekraftig utnyttelse av denne verdifulle ressursen. Nordatlantiske fiskeoljer fra sild, tobis og lodde er karakterisert av høye nivåer av den langkjedede, monoumettede fettsyren ketolinsyre (22:1n-11) og et moderat innhold av omega-3-fettsyrene eikosapentaensyre (EPA, 20:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA, 22:6n-3). Dette skiller disse fiskeoljene fra de søramerikanske fiskeoljene som til sammenligning inneholder lite ketolinsyre, men mer av omega-3-fettsyrene. Vi har relativt begrenset kunnskap om de potensielle biologiske funksjonene/ bioaktiviteten til ketolinsyre. I det forrige FHF-prosjektet 901017 ble det imidlertid vist at ketolinsyre i ren form økte omdanningen av α -linolensyre (ALA, 18:3n-3), til EPA og DHA i både humane leverceller og lakseleverceller (Figur 1). Disse funnene var også i samsvar med en 10 % høyere retensjon av DHA i laks gitt et fôr med sildeolje rik på ketolinsyre sammenliknet med laks gitt et fôr med sardinolje.

Med begrenset tilgang på fiskeolje er det viktig å stimulere både menneskers og laksens medfødte evne til å produsere EPA og DHA fra omega-3-fettsyren ALA. Laks og menneske har begge kapasitet til å omdanne ALA til de såkalte marine fettsyrene EPA og DHA, men kapasiteten er relativt lav. Tidligere studier har vist at det er potensial for å øke kapasiteten noe i begge arter. En av partnerne i dette prosjektet, professor Graham Burdge, har tidligere vist at kvinner har en høyere kapasitet til å omdanne ALA til EPA og DHA, spesielt under graviditet. Menn omdanner noe ALA til dokosapentaensyre (DPA, 22:5n-3), men har svært begrenset kapasitet til DHA syntese (3).



Figur 1 Biosyntesen av EPA og DHA (16; 17).

Det er viktig å øke kunnskapen om norske fiskeoljers kvalitetsfortrinn ved deres høye innhold monoumettede fettsyrer (MUFA), inkludert den lange monoumettede fettsyren ketolinsyre. I dette prosjektet ønsket vi derfor å undersøke om inntak av nordatlantisk fiskeolje som er rik på ketolinsyre medfører økt omdanning av planteomega 3-fettsyrer (ALA) til marine omega-3-fettsyrer (EPA og DHA) i laks og rotte og musemodeller.

Til lakseforsøket ønsket vi imidlertid å justere fettsyresammensetningen litt i forhold til forrige forsøk (FHF901017) slik at diettene med hhv. lav, medium eller høy innblanding av fiskeolje i fôret hadde tilstrekkelig nivå av ALA som er forløperen til EPA og DHA. Summen av EPA+DHA skulle være balansert, men variere på hhv. EPA og DHA slik at de reflekterte innholdet i sildeolje og sardinolje. På denne måten hadde sildefôret høyt nivå av DHA men lavt innhold av EPA, mens det var motsatt i sardindiettene. Dermed kunne vi undersøke i hvor stor grad kapasiteten til EPA- og DHA-syntese begrenses av høyere DHA/EPA ratio i nordatlantisk fiskeolje sammenlignet med søramerikansk fiskeolje. Dette er viktig fordi ulike omega-3 kilder har ulik sammensetning av EPA og DHA, og disse fettsyrene er vist å ha litt ulike egenskaper. DHA er i flere studier vist å ha en hemmende effekt på egen syntese i både mennesker og laks (6; 12; 18). I tillegg ville vi kunne si noe om hvordan ketolinsyre som del av en nordatlantisk fiskeolje påvirker fettdeponering og pigmentering.

I FHF prosjektet 901017 fant vi at ren ketolinsyre øker omdanningen av ALA til EPA og DHA i humane leverceller. Vi ville derfor undersøke om dette også skjer *in vivo*, og valgte å bruke mus og rotte som modell for menneske. I et samarbeid med Bionær prosjektet «Det beste fra to verdener» (NRF256448, DodreMarin) finansiert av Norges Forskningsråd, fôret vi rotter med en blanding av den nordatlantiske fiskeoljen tobisolje, som også er rik på ketolinsyre, og planteoljen camelinaolje som er rik på ALA, forløperen til EPA og DHA. Effekt på *in vivo* kapasitet til å produsere EPA og DHA fra ALA ble undersøkt. I museforsøket benyttet vi ren ketolinsyre, ikke en nordatlantisk fiskeolje, slik at vi kunne studere kun ketolinsyreeffekten i musene. Siden det i studier av mennesker er vist at kvinner, spesielt under graviditet, har bedre evne til å lage EPA og DHA enn menn, ville vi i tillegg undersøke om det var ulik respons på ketolinsyre mellom kjønn.

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektets totale økonomiske ramme har vært på NOK 3 000 000.- fordelt på årene 2017 og 2018. Prosjektet har bestått av tre hoveddeler: 1. fôringsforsøk med laks, 2. fôringsforsøk med mus og 3. analyse av prøvemateriale fra det tilstøtende forskningsrådsprosjektet NFR256446 (Det beste fra to verdener; Optimal blanding av Nordatlantisk Pelagisk olje og Norsk Dodreolje for nasjonalt og internasjonalt helsekostmarked, «DodreMarin»).

2.3 Prosjektorganisering

Nofima har administrativ ledelse av prosjektet.

Prosjektgruppe

Prosjektleder

Tone-Kari K. Østbye, ansvarlig for forsøksdesign, prosjektadministrasjon og koordinering av forskningsaktivitet og rapportering.

Prosjektdeltagere i Nofima

- Odd Helge Romarheim: ansvarlig for fôrproduksjon og rapportering.
- Gerd Berge: Ansvarlig for oppfølging av fôringsforsøk på laks, bearbeiding og resultatrapportering fra fôringsforsøk.
- Bente Ruyter: Ansvarlig for design av forsøk og bearbeiding og rapportering av resultater.
- Aleksei Krasnov: Ansvarlig for bearbeiding og rapportering av resultater.
- Astrid Nilsson: Prosjektleder for DodreMarin og ansvarlig for bearbeiding og rapportering av resultater.
- Målfrid Bjerke, Silje K. Bergum, Marianne H.S. Hansen, Dag E Bundgaard: ingeniører ansvarlig for analysearbeid i prosjektet.

Prosjektdeltagere ved Universitet i Southampton

- Graham Burdge: Ansvarlig for bearbeiding og rapportering av resultater fra museforsøk.
- Nicola A. Irvine: Ansvarlig for bearbeiding og rapportering av resultater fra museforsøk.

Styringsgruppe

Leder: Ola Flesland: TripleNine Group 999

Arne Schei: Lerøy

Aleksander K Rønnevik: Pelagia

3 Problemstilling og formål

3.1 Prosjektets effektmål

Resultater fra dette prosjektet supplerer og understøtter funn fra det nylig avsluttede FHF prosjektet 901017. Vi har fått økt kunnskap om hvordan norske fiskeoljer med høyt innhold av ketolinsyre bidrar til bedre utnyttelse av EPA og DHA.

Prosjektresultatene er viktig for den marine råvaresektoren i Norge og kan føre til merverdi på nordatlantiske fiskeoljer. Bedre dokumentasjon av helseeffekter av nordatlantiske fiskeoljer både i laks og menneske er viktig for å styrke næringens omdømme og for en videre verdiskapning.

Prosjektresultatene vil også gjøre næringsaktørene innenfor havbruk bedre rustet til å vurdere hvordan ulike typer fiskeoljer i kombinasjon med planteoljer best kan utnyttes for å gi best mulig retensjon av EPA og DHA i fisken. På denne måten kan prosjektresultatene bidra med kunnskap om bærekraftig utnyttelse av den begrensede råvaren som fiskeolje representerer.

Innledende resultater fra dyremodeller kan få betydning for en mulig utnyttelse av nordatlantiske fiskeoljer inn mot humant konsum og helse.

3.2 Prosjektets resultatmål

Formålet med prosjektet var å finne ut om inntaket av nordatlantisk fiskeolje/ketolinsyre medfører økt produksjon og retensjon av EPA og DHA i mus og laks.

Delmålene for prosjektet:

1. Undersøke om syntesekapasiteten av EPA og DHA i laks stimuleres av ketolinsyre fra sildeolje og om kapasiteten påvirkes av økende DHA/EPA ratio i dietten.
2. Undersøke hvordan ulike blandinger av planteoljen (camelinaolje) og den marine oljen (tobisolje) påvirker EPA og DHA syntesen ved bruk av rotte som modell for menneske.
3. Undersøke om inntak av ren ketolinsyre fremmer kapasiteten til omdanning av ALA til EPA og DHA i mus og om det er kjønnsforskjeller.
4. Øke kunnskapen om mekanismene involvert i effektene av ketolinsyre på fettmetabolismen.

4 Prosjektgjennomføring

4.1 Gjennomføring av prosjekt

Prosjektet har bestått av tre deler; lakseforsøk med nordatlantiske fiskeoljer, museforsøk med ren ketolinsyre og analyse av prøver fra rotter fôret med nordatlantiske fiskeoljer i kombinasjon med vegetabiliske oljer. Lakseforsøket og analyser av rotteprøvene har i det store og hele vært gjennomført i henhold til opprinnelige planer beskrevet i prosjektbeskrivelsen, ingen uforutsette problemer underveis. Analyse av prøver fra museforsøket ble noe forsinket fordi en prosjektdeltager ved Universitetet i Southampton under prosjektperioden har vært ute i fødselspermisjon.

4.2 Metodikk

4.2.1 Fôrproduksjon og formulering til lakseforsøket

De seks ulike fôrene (Lav Sardin, Lav Sild, Medium Sardin, Medium Sild, Høy Sardin, og Høy Sild) som ble benyttet i lakseforsøket ble produsert ved Nofima Fôrteknologisenter. Grunn dietten ble formulert med kjemisk sammensetning som vist i Tabell 1. Alle ingredienser, med unntak av en 19% oljeblanding (Tabell 2), ble mikset sammen til en grunnblanding. Denne grunnblandingen ble så ekstrudert i en Wenger TX-52 dobbeltskruet ekstruder (Wenger, USA) til pellet med ca. 3.5 mm diameter. Pelletene ble tørket og fordelt i seks like batcher. Hver pellet-batch ble coatet med ulike oljeblandinger av camelinaolje, sardinolje, sildeolje og rapsolje (som beskrevet i Tabell 2) ved hjelp av en vakuump-coater (Dinnissen, Nederland).

Fôret ble formulert slik at diettene med sildeolje og sardinolje hver hadde tre nivåer av ketolinsyre. Videre ble summen av EPA+DHA balansert slik at den var tilnærmet lik i hhv. Lav, Medium og Høy. Nivå av EPA og DHA ble imidlertid ikke justert, slik at silde-diettene har mer DHA og mindre EPA enn sardin-diettene.

Tabell 1 Estimert kjemisk sammensetning av diettene.

Ingredienser (%)	
Estimert kjemisk sammensetning (%)	
Protein	44,90
Lipid	25,10
Stivelse	7,40
Aske	8,10
Energi (MJ/kg)	22,00

Tabell 2 Oljeblandinger (% av tilsatt olje) som ble coatet på de seks ulike fôrene.

	Lav Sardin	Lav Sild	Middels Sardin	Middels Sild	Høy Sardin	Høy Sild
Camelinaolje ¹	1,1	0,0	10,0	8,2	19,1	16,3
Sardinolje ²	34,2	0,0	57,4	0,0	80,8	0,0
Sildeolje ³	0,0	35,0	0,0	58,9	0,0	82,9
Rapsolje ⁴	64,7	65,0	32,6	32,9	0,1	0,8

¹Lever av Biomar, Norge; ²Lota Protein, Chile; ³Vedde, Norge; ⁴Emmelev, Danmark.

4.2.2 Fôringsforsøk med laks

Fôringsforsøket med Atlantisk laks ble gjennomført på Nofimas Forskningsstasjon for bærekraftig akvakultur på Sunndalsøra. Laks med en gjennomsnittsvekt på 170 g ble fordelt i 18 kar (3 kar per diett, 32 fisk per kar). Alle kar hadde belteautomater for utfôring, og utstyr for oppsamling av fôrspill. Det ble tatt sikte på ca. 15-20 % overfôring. Forsøket ble kjørt på saltvann (12 liter/minutt) med en gjennomsnittstemperatur på 11 grader.

På grunn av lave oksygenverdier mot slutten av forsøket ble det foretatt uttak av fem fisk per kar for å redusere biomasse i karene. Dette medførte bedre oksygenverdiene i karene.

Forsøket varte i 61 dager. Ved avslutning av forsøket hadde laksen nådd en gjennomsnittsvekt på 490 g. Det ble tatt prøver av hel fisk ved oppstart og avslutning til kjemisk analyse; tre sampleprøver med fem fisk per samleprøve ved oppstart og fem fisk per kar ved avslutning. Ved avslutning av forsøket ble fem fisk per kar veid, lever ble dissekert ut og veid før innfrysing i flytende nitrogen og lagring ved -80 grader til senere analyse av fettprosent, fettsyresammensetning og genuttryksanalyse. Det ble gjennomført tilfeldig uttak av prøvefisk (taperfisk ble forkastet). Det ble ikke registrert kjønn på fisken.

4.2.3 Beregninger og analyser fra fiskeforsøk

Lever-indeks (hepatosomatisk indeks, HSI) ble beregnet etter følgende likning:

$$\text{HSI (\%)} = \text{Levervekt} / \text{Kroppsvekt} * 100$$

Hjerte-indeks (kardiosomatisk indeks, CSI) ble beregnet etter følgende likning:

$$\text{CSI (\%)} = \text{Hjertevekt} / \text{Kroppsvekt} * 100$$

Vekstrate ble beregnet både som SGR (spesifikk vekst rate) og TGC (termisk vekst koeffisient). Følgende formler ble brukt:

$$\text{SGR (\% d-1)} = (\ln W_2 - \ln W_1) / (t_2 - t_1) \cdot 100$$

$$\text{TGC} = (W_2^{1/3} - W_1^{1/3}) / ((t_2 - t_1) \cdot T) \cdot 1000$$

W1 og W2 er gjennomsnittsvikt (g) ved start (t1) og slutt (t2), og T er gjennomsnittstemperatur i perioden.

Fôrfaktor (feed conversion ratio, FCR) ble beregnet etter følgende likning:

$$\text{FCR} = \text{vekt (g) av fôr spist} / \text{tilvekst av biomasse (g)}$$

Samleprøver av fem fisk fra oppstart og fra hvert kar ved avslutning ble homogenisert før analyse av totalfett og fettsyresammensetning. Innhold av totalfett og fettsyrer i fisk og fôr, samt fôrinntak og tilvekst i hvert

kar, ble brukt for å beregne retensjon (R) av fett og fettsyrer i fisk fra de forskjellige gruppene.

Retensjon ble beregnet etter følgende likning:

$$\text{R (\%)} = (F_{a2} - F_{a1}) / F_{as} \cdot 100$$

Fa2 er mengde fett eller fettsyre i helfisk ved avslutning av forsøksperioden, Fa1 er mengde fett eller fettsyre i hel fisk ved oppstart, og Fas er mengde fett eller fettsyre spist i løpet av perioden.

Alle data fra fiskeforsøket ble statistisk behandlet med enveis variansanalyse, for å bestemme effekt av forskjellige fôrløser. Ved signifikante forskjeller ($p < 0,05$) ble behandlingene rangert ved bruk av Duncan's multiple range test. Det ble også utført en faktoriell analyse (toveis ANOVA) for å se på effektene av oljetype og nivå, og eventuelt samspill.

4.2.4 Analyse av fett og fettsyresammensetning i helfisk, lever og fôr

Totalt fett ble ekstrahert i henhold til en metode beskrevet av Folch et al. (7). Kloroformfasen ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass og lipid løst igjen i kloroform. Methylestere av fettsyrene ble laget etter en metode beskrevet av Mason et al. (11) og av Hoshi et al. (10). De ulike fettsyrene ble separert i en gasskromatograf (GC, Hewlett Packard 6890) med en splitt injektor, SGE BPX70 kapillær kolonne (lengde 60 m, indre diameter 0.25 mm og en tykkelse på film på 0.25 μm), flammeionisasjonsdetektor og HP ChemStation programvare. Helium ble brukt som bæregass, og injektor- og detektortemperatur var begge 280°C. Temperaturen ble hevet fra 50 til 180°C med en hastighet på 10°C min⁻¹, og deretter hevet til 240°C med en hastighet på 0.7°C min⁻¹. Den relative mengden av hver fettsyre ble bestemt ut ifra arealet under toppene i fettsyrekromatogrammet.

4.2.5 Analyse av pigment i laksefilet

Pigment-innhold i filet ble analysert i hht. Bjerkgeng et al. (1).

4.2.6 Analyse av kjemisk sammensetning i laksefilet

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

4.2.7 Analyse av genuttrykk (microarray) i lakselever

To fisk per kar, totalt seks fisk per fôringsgruppe ble selektert til transkriptomanalyse. RNA ble isolert fra lever ved bruk av Biomek 4000 robot. Nofimas 44k mikroarray Salgeno ble benyttet til microarray analysen, og Nofimas bioinformatikk pipeline STARS ble brukt til databehandling. Differensiell forskjell i uttrykk av gener (DEG) ble valgt med lave strengheitskriterier som vanligvis brukes på fôringsforsøk: \log_2 -ekspressjonsforhold > | 0,6 | (1.5 ganger) og $p < 0.05$.

4.2.8 Fôringsforsøk med rotte (DodreMarin)

I DodreMarin-prosjektet (NFR256446) ble det i regi av Universitetet i Bergen gjennomført et fôringsforsøk på overvektige rotter (Zucker rotter). Seks grupper rotter (seks rotter i hver gruppe) ble gitt forsøksfôr i en periode på fire uker. Intervensjonsperioden startet da rottene var 11-13 uker gamle og veide 426 ± 16 g. Rottene ble gitt en diett basert på AIN-93G-anbefaling for voksende rotter med unntak av lipidmengde og type. Kontroll-dietten inneholdt 12 % soyaolje, mens forsøksdiettene inneholdt 7 % soyaolje + 5 % forsøksolje (tobis og/eller camelinaolje) som indikert i Tabell 3. Ved fôringsperiodens slutt ble tatt prøver av blod og ulike organer. De ulike prøvene ble analysert som en del av både hovedprosjektet NFR256446 (DodreMarin) og dette prosjektet (FHF 901353, ketofisk2). Fettsyresammensetningen i fôr og røde blodlegemer ble bestemt av Eurofins som en del av DodreMarin prosjektet mens genuttrykk i milt og lever (se 3.2.7) ble undersøkt i dette prosjektet. Resultater fra fettsyreanalyse av røde blodceller blir beskrevet i denne rapporten, mens fullstendig presentasjon av resultater vil foreligge i rapport fra DodreMarin.

Tabell 3 Sammensetning av forsøksolje som utgjorde 5 % av dietten.

Nr	Diett	Soyaolje	Tobisolje ¹	Camelinaolje ²
1	Kontroll	100 %		
2	100To		100 %	
3	Mix 1			
4	Mix 2	Mix 1-3 inneholdt tobisolje og camelinaolje i ulike blandingsforhold		
5	Mix 3			
6	100Do			100 %

¹Vedde (Langevåg, Norge)

²Norsk Matrap (Askim Frukt og Bærpresseri, Norge)

4.2.9 Fôringsforsøk med mus

Fire grupper av mus ble sondefôret med enten kontrollolje (100 uL ren soyaolje) eller et av tre ulike nivåer av ren ketolinsyre i soyaolje (0.25 mg/100 uL, 0.5 mg/100uL eller 1 mg/100 uL) i 76 dager. Hver gruppe besto av 10 hann-mus og 10 hunn-mus. Etter avsluttet forsøk ble vekt registrert og prøver tatt av lever og blod. Grunnet hemolyse i blodprøvene ble det ikke analysert for fettsyresammensetning i røde blodceller.

Lever ble benyttet til analyse av fettsyresammensetning i fosfolipider. Først ble lever homogenisert i flytende nitrogen. Ekstraksjon av lipid ble utført i hht. Folch et al. (7) etterfulgt av fastfase-ekstraksjon av fosfatidyletanolamin (PE) og fosfatidylkolin (PC) fraksjoner (4). Prøvene ble transmetylert og analysert ved gasskromatografi (5).

5 Oppnådde resultater og diskusjon

5.1 Fôringsforsøk med laks

5.1.1 Fettsyresammensetning av forsøksfôr

En oversikt over fettsyresammensetningen i de seks ulike diettene er vist i Tabell 4. Diettene ble balansert for ALA og summen av EPA+DHA innad på de tre ulike innblandingsnivåene, mens ratioen av DHA/EPA var høyere i sildeoljediettene enn i sardindieltene.

Fettsyresammensetningen i fôret viste at det var en liten forskjell i nivå av ALA i de sammenliknbare innblandingsnivåene, med 5.5-5.8 % i Lav, 3.6-4.0 % i Medium og 1.5-2.2 % i Høy gruppene. Størst variasjon var det i Høy gruppene med en forskjell på 0.7 %.

Andelen ketolinsyre i fôret økte med økende innblanding av fiskeolje i diettene, og fôrene med sildeolje hadde høyere innhold enn sardinfôrene. I sardinfôret varierte ketolinsyrenivået fra 0.9, 1.9 til 2.7 %, mens det i sildefôret lå på hhv. 6.3, 11.6 og 17.1 %. Innhold av ketolinsyre i fôret bidro til at summen av umettede fettsyrer var høyere i sildediettene, selv om sardinfôret hadde høyere nivå av både 16:1 og 18:1.

Sardinfôrene hadde høyere innhold av EPA enn tilsvarende sildefôr, mens innholdet av DHA var lavere i sardinfôret. Dette førte til at ratioen av DHA/EPA varierte fra ca. 0.5 i sardinoljediettene til mellom 1.2-1.6 i sildeoljediettene. Summen av EPA+DHA var imidlertid relativt like i de sammenliknbare fôrene, og varierte fra 5.6-5.7 % i Lav, 9.2-10.0 % i Medium og 12.0-13.3 % i Høy. Nivå av summen EPA+DHA i fôret lå på 1.3-3.0 % og er i hht. behov (2; 15).

Summen av mettede fettsyrer var noe høyere i sardinfôret enn sildefôret, og skyldes i stor grad nivå av 16:0. De sammenliknbare diettene Lav, Medium og Høy har derimot relativt likt nivå av både summen av omega-3 og omega-6 fettsyrer.

Tabell 4 Fettsyresammensetningen (% av totale fettsyrer) av de seks fôrene.

	Lav Sardin	Lav Sild	Medium Sardin	Medium Sild	Høy Sardin	Høy Sild
22:1n-11	0,9	6,3	1,9	11,6	2,7	17,1
18:3n-3	5,5	5,8	3,6	4,0	1,5	2,2
∑ SAT	16,3	13,0	22,2	16,7	27,7	20,3
∑ MUFA	51,1	54,7	43,6	51,2	37,1	47,8
∑ n-6	16,5	16,6	12,6	12,5	8,3	8,7
∑ n-3	12,0	12,3	15,8	14,0	18,1	18,4
∑ EPA+DHA	5,6	5,7	10,0	9,2	13,3	12,0
DHA/EPA	0,47	1,19	0,47	1,30	0,51	1,59

5.1.2 Vekst

Laksen vokste godt i forsøksperioden og hadde nesten tre-doblet vekten fra 170 g ved start for alle grupper, til nesten 500 g ved forsøkslutt. Det var ingen forskjell i verken vekstrate eller fôrfaktor mellom gruppene (Tabell 5). Både SGR (1.69-1.73) og TGC (3.38-3.49) er innenfor normale verdier, og fôrfaktoren lå på 0.70-0.74. I forrige studie med nordatlantiske fiskeoljer (FHF 901017) fant vi heller ingen forskjell i tilvekst, noe som heller ikke er forventet når eneste forskjell mellom fôrene er oljekilde.

Tabell 5 Vekstparameter (gjennomsnitt med standardfeil, n=3). Startvekt for alle grupper var 170 g.

	Lav Sardin	Lav Sild	Medium Sardin	Medium Sild	Høy Sardin	Høy Sild	To-veis ANOVA			En-veis ANOVA
							Oljetype, p-verdi	Nivå, p-verdi	Samspill p-verdi	p-verdi
Sluttvekt (g)	497,1 9 ± 18,9 5	493,9 4 ± 21,6 7	481,4 6 ± 10,1 1	505,5 0 ± 3,1 2	487,4 7 ± 28,9 5	497,4 7 ± 2,7 1	0,95	0,80	0,37	0,75
SGR ¹	1,72 ± 0,01	1,73 ± 0,03	1,69 ± 0,01	1,73 ± 0,01	1,70 ± 0,02	1,69 ± 0,01	0,47	0,39	0,40	0,50
TGC ²	3,45 ± 0,03	3,47 ± 0,08	3,38 ± 0,02	3,49 ± 0,03	3,42 ± 0,06	3,39 ± 0,02	0,40	0,48	0,33	0,48
FCR ³	0,74 ± 0,01	0,73 ± 0,02	0,72 ± 0,01	0,74 ± 0,00	0,73 ± 0,01	0,70 ± 0,02	0,39	0,18	0,28	0,26

¹Spesifikk vekstrate, ²Termisk vekstfaktor, ³Fôrfaktor

5.1.3 Organindeks og kondisjonsfaktor

Det var ingen signifikante forskjeller i heptosomatisk indeks, kardiosomatisk indeks eller kondisjonsfaktor (Tabell 6).

Tabell 6 Organdindeks (HSI, CSI) og kondisjonsfaktor (gjennomsnitt med standardfeil, n=3).

	Lav Sardin		Lav Sild		Medium Sardin		Medium Sild		Høy Sardin		Høy Sild		En-veis ANOVA p-verdi
HSI ¹	1,32	± 0,14	1,30	± 0,16	1,38	± 0,21	1,37	± 0,14	1,45	± 0,11	1,37	± 0,14	0,10
CSI ²	0,08	± 0,01	0,08	± 0,01	0,08	± 0,01	0,08	± 0,005	0,08	± 0,01	0,08	± 0,01	0,32
CF ³	1,39	± 0,02	1,35	± 0,02	1,34	± 0,02	1,35	± 0,02	1,27	± 0,09	1,35	± 0,01	0,51

¹Hepato-somatisk indeks, ²Kardio-somatisk indeks, ³Kondisjonsfaktor,

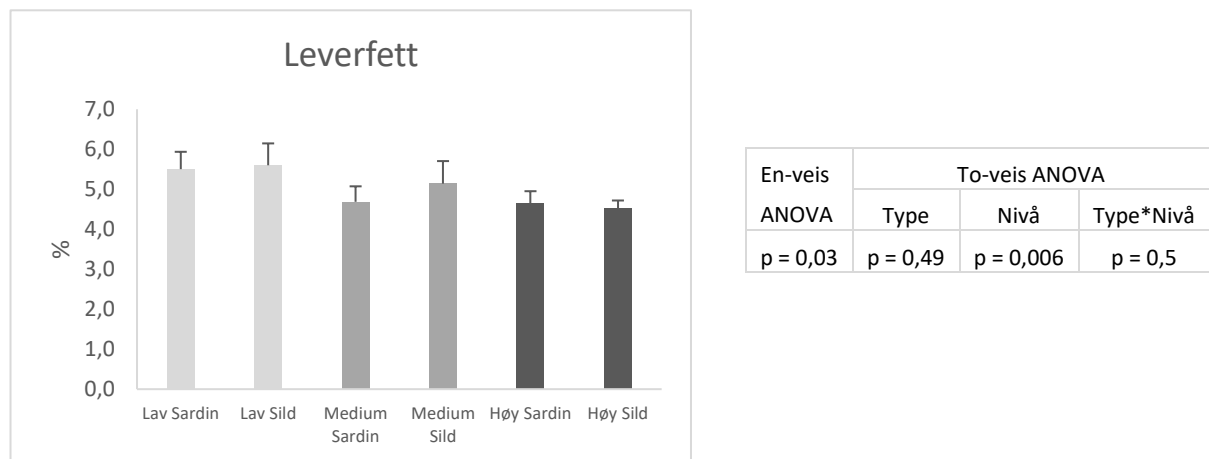
5.1.4 Dødelighet

Det var <4 % dødelighet i løpet av forsøksperioden, og ingen signifikante forskjeller mellom gruppene,

5.1.5 Fett og fetttsyresammensetning i lever

Det var normalt innhold av fett i lever med mellom 4,5-5,6 % for de ulike fôringsgruppene (Figur 2), Type fiskeolje hadde ingen signifikant effekt på nivå av leverfett, mens innblandingsnivå av fiskeoljene har en betydning, Gruppene med høyest innblanding av fiskeolje hadde noe lavere nivå av leverfett enn gruppen med lav innblanding, Dette kan skyldes at Høy gruppene fikk et fôr med høyere nivå av omega-3 fettsyrer (12,0-13,3 %) sammenliknet med Lav gruppene (5,6-5,7 %), Tidligere studier har vist lavere fettinnhold i lever fra laks fôret med høye nivåer av omega-3-fettsyrer fra fiskeolje (13; 14),

Langkjedede monoumettede fettsyrer er fra litteraturen indikert å kunne øke fettsyreforbrenning (8; 9), og i forrige lakseforsøk (FHF 901017) hadde vi antydning til lavere fettinnhold i lever fra laks fôret med sildolje i dietten (6,6-8,4 %) sammenliknet med lever fra laks fôret med sardinolje (9,5-11,6 %), Det lave fettinnholdet i lever i dette forsøket gjør at det antageligvis er vanskelig å se en potensiell effekt av oljetype på leverfett,



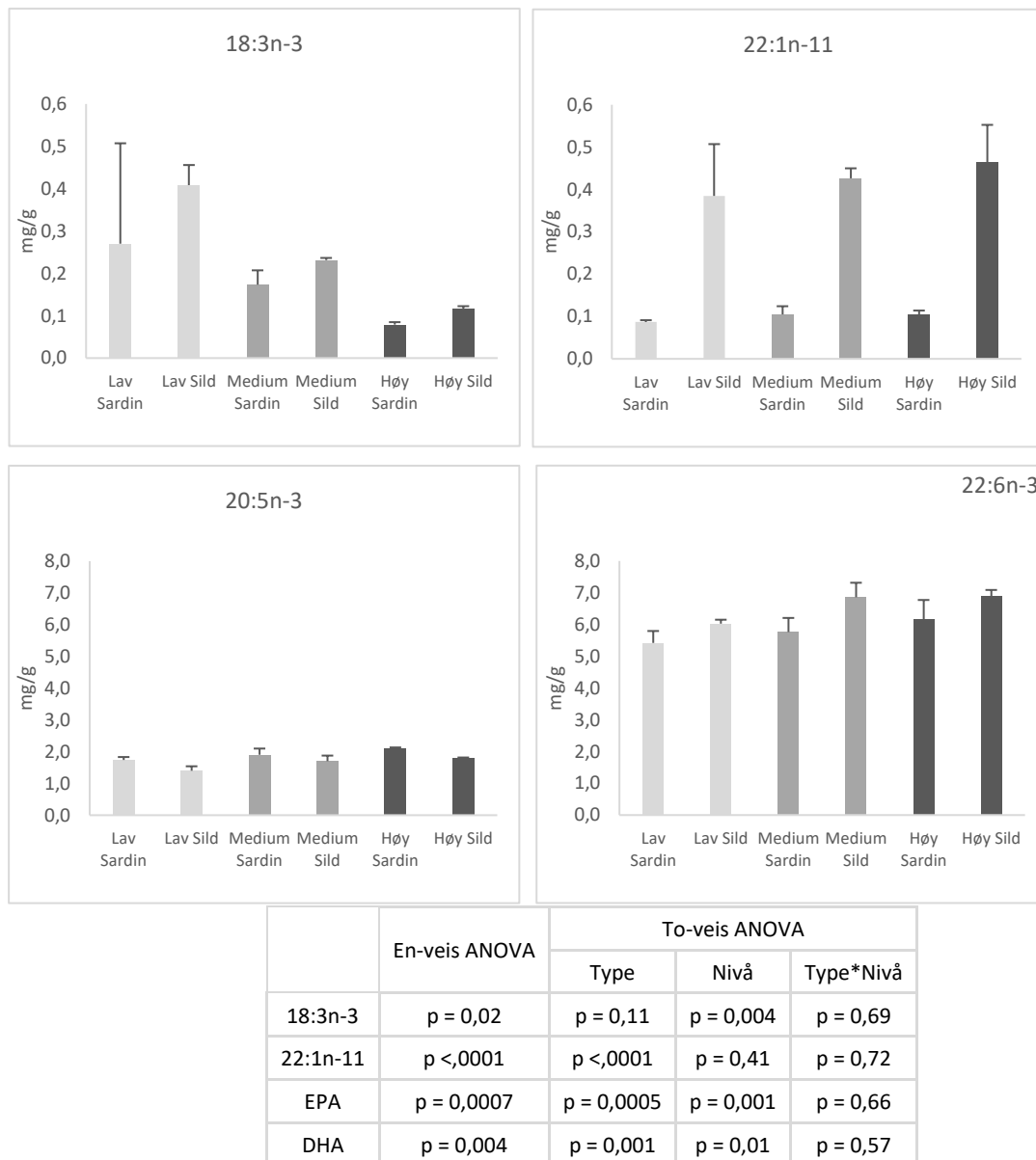
Figur 2 Fettinnhold i lakselever (gjennomsnitt med standardfeil, n=3), Statistiske forskjeller ble evaluert med en-veis ANOVA og to-veis ANOVA og er vist i tabellen med p-verdier,

Alle sildegruppene hadde mer ketolinsyre (22:1n-11) i lever enn sardingruppene, og viste tydelig dose respons (vist som % av totale fettsyrer) i forhold til innhold av 22:1n-11 i fôret (Figur 3, Figur 4),

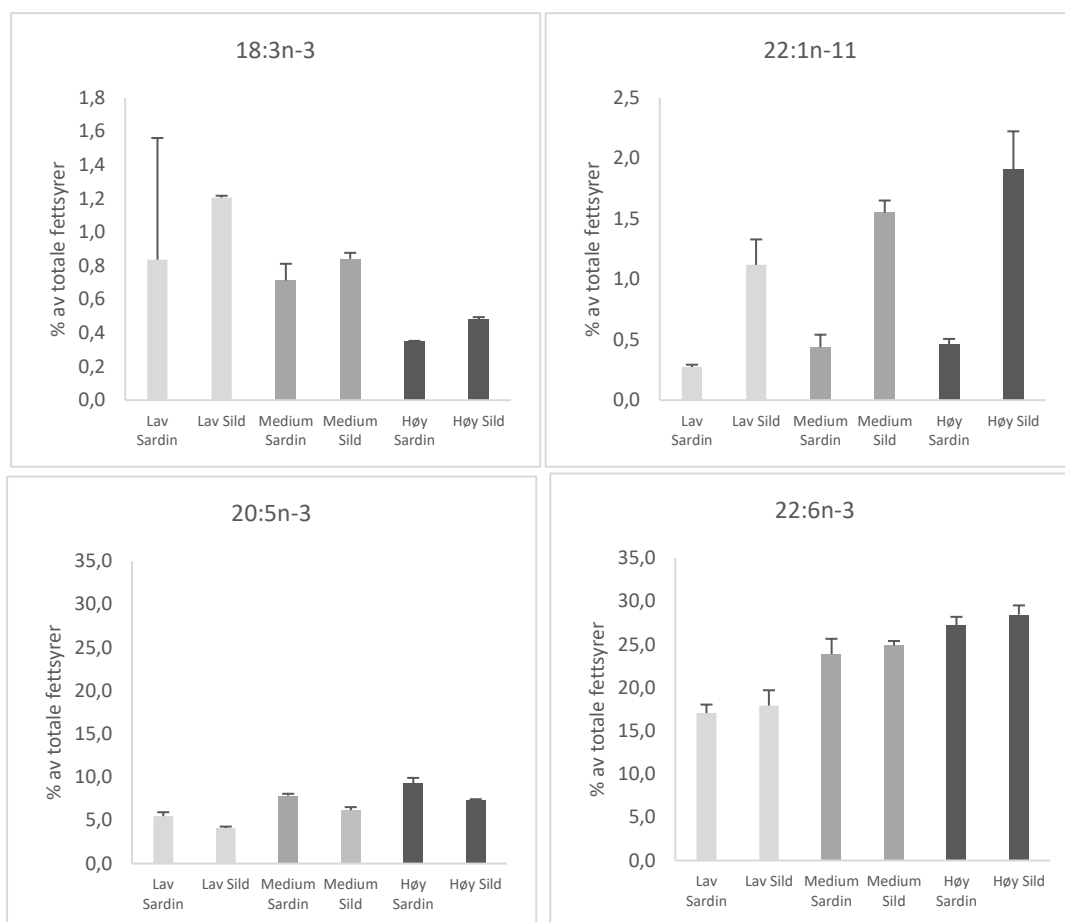
Både fiskeoljetype og innblandingsnivå i fôret viste signifikant effekt på leverinnhold av EPA, Det var imidlertid relativt små forskjellene i leverinnhold av EPA mellom sild- og sardingruppene i forhold til innholdet av EPA i fôret, Sardin Høy fikk 8,8 % EPA i fôret sammenliknet med 4,6 % i Sild Høy, mens leverinnholdet av EPA var på hhv, 2,1 mg/g (Sardin Høy, 6,4 % av totale fettsyrer) og 1,8 mg/g (Sild Høy, 4,3 % av totale fettsyrer), Dette viser at en i sildegruppen finner igjen relativt mer i lever enn det som finnes i fôret sammenliknet med sardin gruppen,

Innhold av DHA var høyere i sildefôret (3,1-7,3 %) enn i sardinfôret (1,8-4,5 %), og både fiskeoljetype og innblandingsnivå ga signifikant effekt på mg/g DHA i lever (men ingen effekt av fiskeoljetype på % DHA), Ratioen mellom DHA og EPA i sardinfôrene lå på ca, 0,5, mens den for sildefôrene lå på 1,2-1,6, I lever var denne ratioen derimot ca, 3 for sardingruppene og ca, 4 for sildegruppene, og kan tyde på enten økt omdanning fra EPA til DHA, økt deponering av DHA eller økt forbrenning av EPA relativt til DHA,

Det var ingen signifikant effekt av type olje på ALA (både mg/g og %), men innblandingsnivå påvirket ALA i lever,



Figur 3 Fettsyrer (mg/g) i lakselever (gjennomsnitt med standardfeil, n=3), Statistiske forskjeller ble evaluert med en-veis ANOVA og to-veis ANOVA og er vist i tabellen med p-verdier,

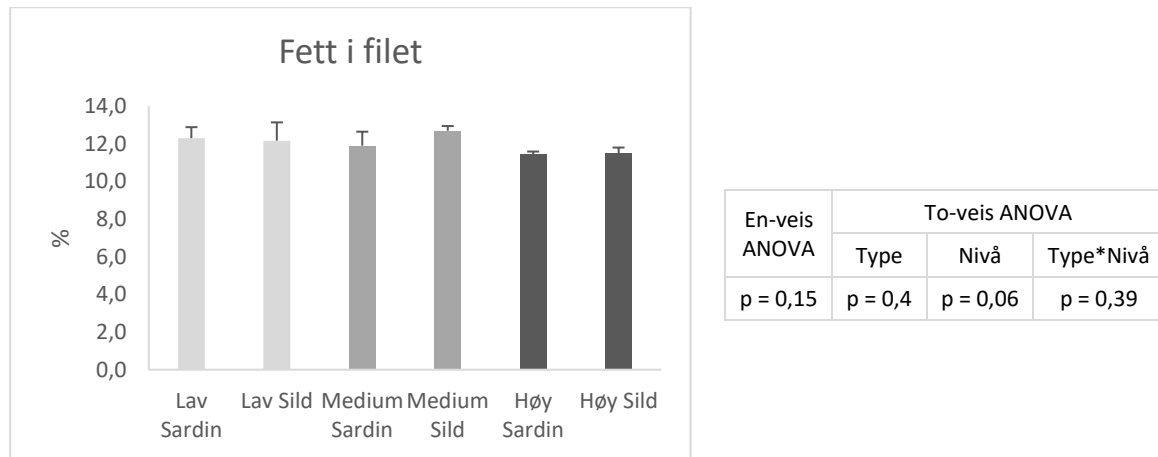


	En-veis ANOVA	To-veis ANOVA		
		Type	Nivå	Type*Nivå
18:3n-3	p = 0,05	p = 0,12	p = 0,01	p = 0,8
22:1n-11	p <,0001	p <,0001	p = 0,003	p = 0,05
EPA	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p = 0,39
DHA	p <,0001	p = 0,12	p <,0001	p = 0,97

Figur 4 Fettsyrer (% av totale fettsyrer) i lakselever (gjennomsnitt med standardfeil, n=3), Statistiske forskjeller ble evaluert med en-veis ANOVA og to-veis ANOVA og er vist i tabellen med p-verdier,

5.1.6 Fett og fetttsyresammensetning i fillet

Det var ingen forskjell i fettinnhold i fillet mellom fiskeoljegruppene med hhv, lavt, medium og høyt innblandingsnivå (Figur 5), Innblandingsnivå viste heller ingen effekt på fett i fillet, men det var en trend til samme mønster som i lever ($p=0,06$),

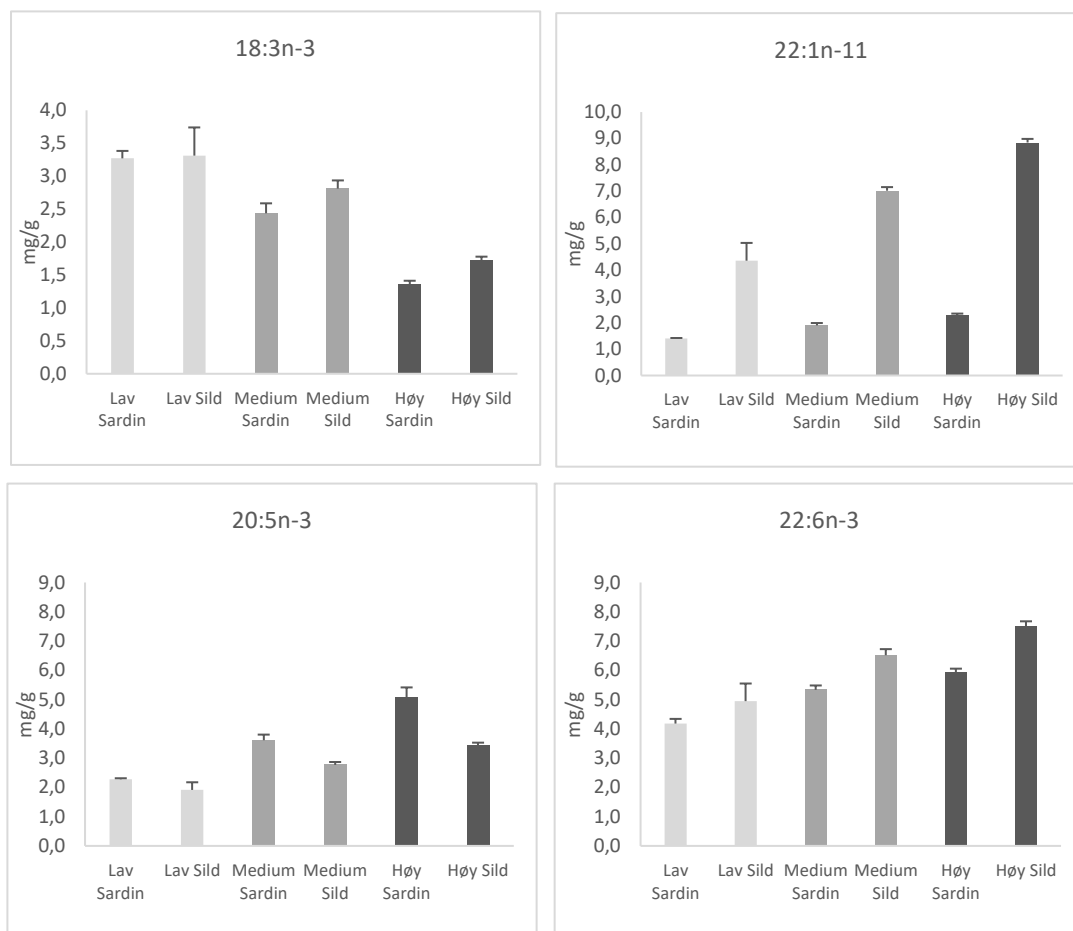


Figur 5 Fett i laksefilet (%) (gjennomsnitt med standardfeil, $n=3$), Statistiske forskjeller ble evaluert med en-veis ANOVA og to-veis ANOVA og er vist i tabellen med p -verdier,

Fetttsyresammensetningen i fillet viste i stor grad samme mønster som for lever (Figur 6, Figur 7), Det var signifikant effekt av både fiskeoljetype og innblandingsnivå på ALA, ketolinsyre, EPA og DHA (mg/g og %) i fillet i tillegg til en samspillseffekt av fôr og innblandingsnivå på % ALA, ketolinsyre, EPA og DHA i fillet,

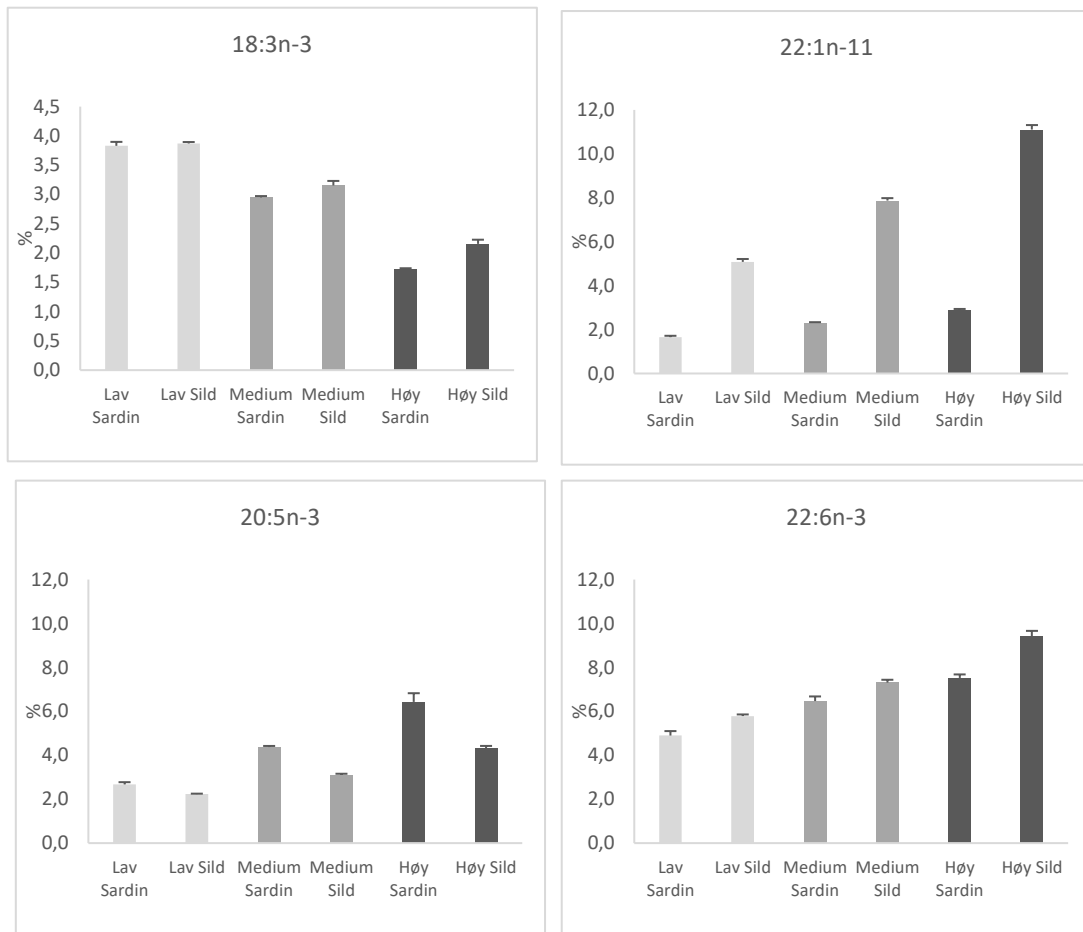
Sardingrubbene hadde fått et høyere innhold av EPA i fôret og viste også noe høyere innhold i fillet, Sildegrubbene derimot hadde fått et fôr med høyere innhold av ketolinsyre og DHA enn sardingrubbene, hadde høyere innhold av disse fetttsyrene i fillet, Dette resulterte i en DHA/EPA ratio i fillet på 2,2-2,6 for sildegruppen og 1,2-1,8 for sardingruppen, Sammenliknet med DHA/EPA ratioen i fôret og også retensjonsverdiene av fetttsyrene i helkropp, så kan dette mest sannsynlig forklares med økt syntese og deponering av DHA og eller EPA forbruk relativ til DHA (omdanning og forbrenning),

Innholdet av ALA i fôret var forsøkt balansert i de ulike innblandingsnivåene, men ble noe høyere i sildegrubbene og resulterte i høyere nivå av ALA i fillet i disse grubbene,



	En-veis ANOVA	To-veis ANOVA		
		Type	Nivå	Type*Nivå
18:3n-3	p <,0001	p = 0,02	p <,0001	p = 0,29
22:1n-11	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p <,0001
EPA	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p = 0,0004
DHA	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p = 0,1

Figur 6 Fettsyrer (mg/g) i laksefilet (gjennomsnitt med standardfeil, n=3), Statistiske forskjeller ble evaluert med en-veis ANOVA og to-veis ANOVA og er vist i tabellen med p-verdier,



	En-veis ANOVA	To-veis ANOVA		
		Type	Nivå	Type*Nivå
18:3n-3	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p <,0001
22:1n-11	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p <,0001
EPA	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p <,0001
DHA	p <,0001	p <,0001	p <,0001	p <,0001

Figur 7 Fettsyrer (% av alle fettsyrer) i laksefilet (gjennomsnitt med standardfeil, n=3), Statistiske forskjeller ble evaluert med en-veis ANOVA og to-veis ANOVA og er vist i tabellen med p-verdier,

5.1.7 Retensjon

Retensjon i helkropp er den andelen av en mengde næringsstoff spist, og som blir deponert fisken, for en gitt periode (i % av mengde spist), For fettsyrer er dette tilsynelatende retensjon siden det er et netto resultat inkludert resultat av metabolisme,

Både oljetype og innblandingsnivå har en signifikant effekt på retensjon av summen EPA+DHA i helkropp (Tabell 7), Siden sildeolje- og sardinoljediettene ikke hadde likt nivå av hhv, EPA og DHA, men var balansert for summen av EPA+DHA, vil retensjon av summen EPA+DHA være det beste målet på metabolisme og deponering av disse fettsyrene, Gruppen gitt den høyeste innblandingen av sildeolje (Sild Høy) viste høyere retensjon av summen EPA+DHA (13 %) enn Sardin Høy, og indikerer en bedre kapasitet til å omdanne ALA til EPA og DHA, Dette samsvarer med funnene fra FHF 901017 som viste ca, 10 % høyere retensjon av summen EPA+DHA i laksen som ble gitt den høyeste innblandingen av sildeolje sammenliknet med sardinolje, Høyere retensjon av DHA i sardingruppene kan forklares med et lavere innhold av DHA i sardindiettene enn i sildediettene, Høyere retensjon av EPA i sildegruppene enn i sardingruppene, spesielt for Høy gruppene som viste 86 % retensjon av EPA i Sild Høy og 63 % i Sardin Høy, tyder på høyere grad av syntese av EPA fra ALA i sildegruppene enn i sardingruppene, Høyere retensjonen av 22:5n-3 i alle sildegruppene sammenliknet med sardingruppene, styrker også hypotesen om kapasitet til omega-3 syntesen en høyere kapasitet til videre elongering av EPA i disse gruppene, Dette stemmer godt overens med *in vitro* resultater fra FHF901017 som viste at ketolinsyre stimulerer flere trinn i omega-3-synteseveien,

Høyt nivå av ketolinsyre i sildediettene kan forklare en bedret retensjon av summen EPA+DHA, Sildediettene hadde imidlertid også høyere innhold av DHA, som potensielt kan hemme sin egen syntese (6; 12; 18), Til tross for høyere DHA innhold i sildedietten enn i sardindiettene viste Sild Høy bedre retensjon av summen EPA+DHA enn Sardin Høy, Dette tyder på at ketolinsyre kan motvirke en inhiberende effekt av DHA,

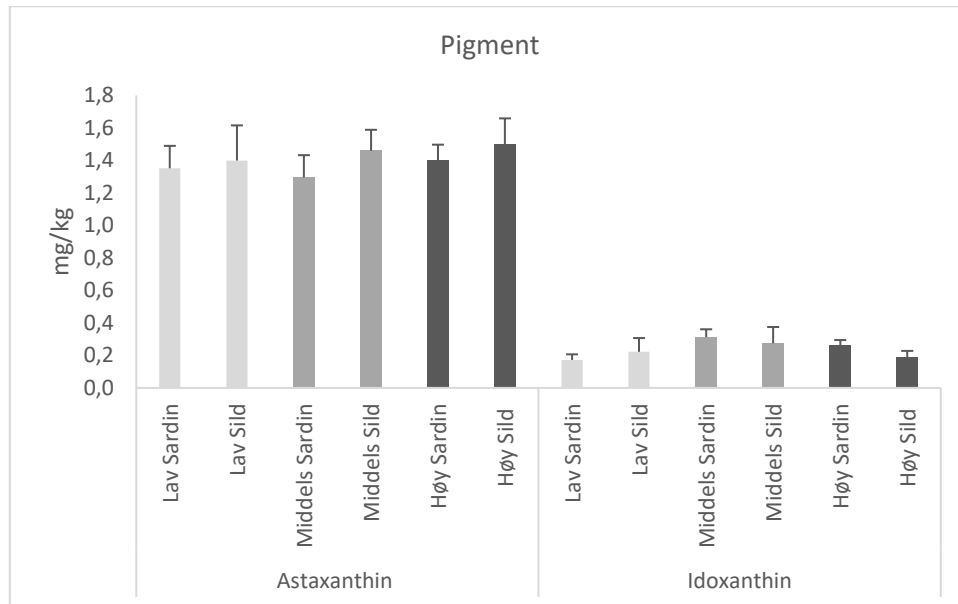
Retensjonen av ketolinsyre var relativt lik mellom de ulike sardingruppene (60-69 %) sammenliknet med sildegruppene (62-63 %), og viste ingen signifikant effekt av verken fiskeoljetype eller nivå, En forklaring kan være at ketolinsyre er en god energikilde for laks og har gått inn i β -oksidasjon for energiproduksjon,

Tabell 7 Retensjon av utvalgte fettsyrer (%) i laks (gjennomsnitt ± standardfeil, n=3),

	Lav Sardin		Lav Sild		Medium Sardin		Medium Sild		Høy Sardin		Høy Sild		En-veis ANOVA (p-verdi)	To-veis ANOVA		
	Type (p-verdi)	Nivå (p-verdi)	Type (p-verdi)	Nivå (p-verdi)	Type (p-verdi)	Nivå (p-verdi)	Type (p-verdi)	Nivå (p-verdi)	Type (p-verdi)	Nivå (p-verdi)	Type (p-verdi)	Nivå (p-verdi)		Type*Nivå (p-verdi)		
22:1n-11	60	± 16	63	± 6	60	± 7	62	± 2	69	± 2	62	± 3	0,7	0,79	0,55	0,45
20:5n-3	51	± 1	58	± 5	56	± 2	62	± 1	63	± 2	86	± 4	<,0001	<,0001	<,0001	0,0007
22:6n-3	137	± 15	100	± 8	126	± 8	95	± 5	110	± 3	96	± 4	0,0002	<,0001	0,03	0,09
ΣEPA+DHA	79	± 5	81	± 7	78	± 4	81	± 3	79	± 2	92	± 4	0,02	0,01	0,05	0,08

5.1.8 Pigment

Det er ingen signifikante forskjeller mellom de seks fôringsgruppene på innhold av astaxanthin i filet (Figur 8), men det er en tendens til høyere astaxanthin nivåer i sildegruppene enn sardinggruppene og kan forklares med høyere DHA innhold i fôret, Tidligere forsøk har vist en korrelasjon mellom DHA og astaxanthin-metabolismen, Det er effekt av innblandingsnivå på idoxanthin ($p = 0,02$), et omdanningsprodukt av astaxanthin,



	En-veis ANOVA	To-veis ANOVA		
		Type	Nivå	Type*Nivå
Astaxanthin	$p = 0,54$	$p = 0,15$	$p = 0,62$	$p = 0,65$
Idoxanthin	$p = 0,05$	$p = 0,49$	$p = 0,02$	$p = 0,14$

Figur 8 Pigment (mg/kg) i laksefilet (gjennomsnitt med standardfeil, $n=3$), Statistiske forskjeller ble evaluert med en-veis ANOVA og to-veis ANOVA og er vist i tabellen med p -verdier,

5.1.9 Genuttrykksanalyse

Totalt ble ca, 400 gener differensielt uttrykt som resultat av økende innblanding av hhv, sardin og sildeolje i fôret til laks, Av disse var ca, 10 % relatert til lipid metabolisme,

Microarray-analysen viste at økende innhold av sardinolje i fôret ga sterkere nedregulering av genet for delta5 desaturase (*d5fads*), som er et sentralt enzym i omega-3 syntesen, enn økende innhold av sildeolje i fôret, Dette til tross for at sildeolje inneholdt mer DHA enn sardinoljen, og DHA er tidligere vist å kunne hemme omega-3 syntesen og dermed også sin egen syntese (6; 12; 18), Økende innblanding av sildeolje i fôret ga økende nivå av ketolinsyre, som vi i tidligere studier har vist kan stimulere syntesen av EPA og DHA (FHF901017), Innholdet av ketolinsyre i sildeolje kan være en grunn til at vi ikke ser den forventede hemmingen av omega-3 syntesen som følge av høyt innhold av DHA i sildeolje,

Gruppen som fikk det høyeste innholdet av sardinolje hadde også nedregulert genuttrykk av elongase6 (*elovl6*), som er involvert i syntesen av lange fettsyrer, mens sildeolje ikke viste noen hemmende effekt, Videre viste økt innhold av sildeolje i fôret en oppregulering av enkelte andre gener involvert i fettsyreoksidasjon (*acsm3*) og lipid katabolisme (*plcd1*), Andre studier har vist at langkjedede enumettede fettsyrer kan øke fettforbrenning i rotter (9),

Økt innblanding av både sild og sardinolje i fôret ga nedregulering av mange lipidrelaterte gener, deriblant kolesterol relaterte gener som *sc5d*, *hmgcs1*, *fdps*, *cyp51a1* og *sqle*, Endringer i uttrykk av gener involvert i kolesterol syntese kan skyldes nivåforskjeller av kolesterol i fôret, Innhold av kolesterol i fôret ble imidlertid ikke analysert, og det er derfor vanskelig å forklare disse funnene,

Tabell 8 Lipidrelaterte gener, Tabellen viser differensielt uttrykte gener i hhv Sild og Sardin gruppene med økende innblanding av fiskeolje i dietten, Kolonnene Medium-Lav og Høy-Lav viser gener som er opp- eller nedregulert i hhv, Medium og Høy gruppene når de sammenliknes med Lav gruppene, Rødlige farger indikerer signifikant oppregulering mens grønne farger indikerer signifikant nedregulering,

Prosess	Navn	Gen	Sild		Sardin	
			Medium-Lav	Høy-Lav	Medium-Lav	Høy-Lav
Lipid/fettsyresyntese	Fatty acid hydroxylase domain-containing protein 2	faxdc2	0,84	0,42	-0,06	-0,23
	Stearoyl-CoA desaturase b	scd	0,32	0,09	-0,70	-0,73
	Diacylglycerol O-acyltransferase 2	dagt2	0,38	0,18	-1,32	-1,38
	acyl carrier protein, mitochondrial-like	ndufab1	0,34	0,59	-1,22	-2,11
	Alkylglycerol monooxygenase	agmo	0,25	-0,02	-0,75	-0,98
	Stearoyl-CoA desaturase b	scd	0,08	0,08	-0,77	-0,99
	phosphatidylserine decarboxylase	pisd	0,05	-0,55	-0,89	-0,95
	phosphatidylserine decarboxylase proenzyme-like, X1	pisd	0,05	-0,56	-0,86	-0,85
	Fatty acid desaturase 1	fads1, d5fads	-0,27	-0,57	-0,81	-1,16
	Fatty acid desaturase 1	fads1, d5fads	-0,28	-0,48	-0,77	-1,07
	MID1 interacting protein 1a	mid1ip1	-0,61	-1,32	-0,40	-0,77
	Acetyl-coenzyme A transporter 1	slc33a1	-0,19	-0,63	0,80	1,42
	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids	elovl6	0,11	0,09	-0,37	-0,94
Lipidmetabolisme	Sphingosine kinase 2	sphk2	1,77	0,61	-0,91	-0,02
	Adiponectin	adipoq	0,79	0,51	-0,15	-0,31
	Angiopoietin-related protein 4	angptl4	0,33	1,16	0,01	-0,16
	Lipid phosphate phosphatase-related protein type 1	plppr1	0,17	0,34	-0,79	-0,73
	phospholipase DDHD2-like, X1	ddhd2	0,03	-0,70	0,50	0,35
	Acetoacetyl-CoA synthetase	aacs	-0,16	-0,33	-0,68	-1,13
	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4a	acsl4	-0,54	-0,68	-0,60	-0,72
	Ceramide synthase 5	cers5	-0,19	-0,31	-1,02	-0,82
Lipid katabolisme	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	acat2	-0,28	-0,42	-0,61	-0,82
	Acyl-coenzyme A synthetase, mitochondrial	acsm3	0,80	0,44	-1,04	-0,51
	monoglyceride lipase	mgll	-0,01	0,07	0,18	0,93
	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta-1-like	plcd1	0,73	0,30	-0,85	-0,58
	Endothelial lipase	lipg	-0,49	-0,61	-1,66	-1,15
Sterolmetabolisme	Endothelial lipase	lipg	-1,94	-1,98	-0,79	0,15
	24-hydroxycholesterol 7-alpha-hydroxylase	cyp39a1	-0,04	1,04	0,55	0,42
	Lanosterol 14-alpha demethylase	cyp51a1	-0,30	-0,30	-0,93	-0,78
	Sterol-C5-desaturase	sc5d	-0,38	-0,33	-0,58	-0,96
	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase a	hmgcr	-0,47	-0,23	-0,50	-0,80
	Lanosterol synthase	lss	-0,51	-0,45	-0,36	-0,90
	Lanosterol 14-alpha demethylase	cyp51a1	-0,54	-0,29	-0,97	-0,82
Squalene monooxygenase	sqle	-0,63	-0,60	-0,74	-0,87	

Diphosphomevalonate decarboxylase	mvd	-0,60	-0,54	-0,15	-0,98
methylsterol monooxygenase 1	msmo1	-0,65	-0,46	-0,58	-1,08
Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	idi1	-0,68	-0,78	-0,58	-0,89
insulin-induced gene 1 protein-like	insig1	-0,72	-0,94	-0,10	-0,80
Squalene monooxygenase	sqle	-0,75	-0,70	-0,82	-1,08
Squalene synthase	fdft1	-0,76	-0,82	-0,53	-0,75
Insulin induced gene 1	insig1	-0,83	-1,30	-0,61	-1,22
Mevalonate kinase	mvk	-0,84	-0,89	-0,57	-0,68
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	hmgcs1	-0,89	-0,93	-0,77	-1,07
Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	nsdhl	-0,94	-0,70	-0,80	-0,69
Farnesyl diphosphate synthase	fdps	-0,95	-1,17	-0,35	-0,89
Farnesyl diphosphate synthase	fdps	-0,99	-1,18	-0,32	-0,88
Sterile alpha and TIR motif-containing protein 1	sarm1	-1,43	-1,11	-0,30	-0,98

5.2 Fôringsforsøk med rotte

Dette FHF prosjektet hadde et samarbeid med NFR prosjektet DodreMarin (NFR256446) hvor det ble undersøkt *in vivo* effekt av ketolinsyre som del av en tobisolje, Det ble studert om det finnes en optimal blanding av tobisolje og camelinaolje (med høyt innhold av ALA) for økt utnyttelse og omdanning av ALA til EPA og DHA,

5.2.1 Fettsyresammensetning i dietten

Fettsyresammensetningen av rottediettene reflekteres av andelen camelinaolje og tobisolje (Tabell 9), I motsetning til gruppen med 100 % camelinaolje i forsøksoljen (100Do), som ikke inneholdt marine fettsyrer, hadde fôret med 100 % tobisolje i forsøksoljen (100To) 8,7 % ketolinsyre, 6,0 % EPA og 5,3 % DHA (Tabell 9), Fôret med 100 % tobisolje i forsøksoljen hadde imidlertid lavere innhold av 18:2n-6 (24,8 % versus 34,2 %) og ALA (3,7 % versus 25,3 %) enn fôret med camelinaolje, Camelinaolje karakteriseres nettopp av høyt innhold av ALA, derfor det høye innholdet av ALA i 100Do-fôret, Fôrene som inneholdt en blanding av camelinaolje og tobisolje hadde en intermediær fettsyresammensetning, Kontrollfôret var soyaolje-basert og inneholdt høyt nivå av 18:2n-6 (55,0 %), I likhet med camelinaoljefôret (100Do) inneholdt kontrollfôret verken ketolinsyre, EPA eller DHA,

Tabell 9 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i rottefôrene,

	Kontroll	100To	Mix 1	Mix 2	Mix 3	100Do
22:1n-11	0	8,7	6,71	4,15	2,1	0
18:3n-3	6,9	3,7	9,29	15,03	20,29	25,27
∑ SAT	15,71	19,27	17,53	15,59	13,85	12,24
∑ MUFA	21,72	32,85	31,35	29,07	27,42	25,58
∑ n-6	54,99	24,81	26,41	29,5	31,55	34,18
∑ n-3	6,9	18,29	20,66	22,12	23,93	25,27
∑ EPA+DHA	0	11,25	8,78	5,43	2,77	0

5.2.2 Fettsyresammensetning i røde blodceller

Fettsyresammensetningen i røde blodceller reflekterte i stor grad fettsyresammensetningen i fôret til rottene, Kontrollgruppen som fikk soyaolje uten EPA og DHA i fôret hadde lavest innhold av EPA, DPA og DHA i blodet, mens økende innhold av tobisolje i dietten resulterte i økende nivå av disse omega-3 fettsyrene, Gruppen fôret med 100 % camelinaolje som forsøksolje (100Do) fikk ikke EPA og DHA i fôret, men viste likevel økt innhold av EPA, DPA og DHA i røde blodceller sammenliknet med kontrollen, og er rottens egenproduksjon av fettsyrene, Camelinaolje har et høyt innhold av forløperen til EPA og DHA, ALA, og korrelasjonsanalyse viste en negativ korrelasjon mellom ALA i fôret og EPA nivå i røde blodceller, og var nesten signifikant for DHA (Tabell 10), Dette kan tyde på at rottene har utnyttet ALA i fôret til syntese av EPA og DHA,

De to gruppene som fikk høyest innhold av tobisolje som forsøksolje i fôret (100 % tobisolje og Mix 1) viste ingen forskjell i innhold av EPA, DPA og DHA i røde blodceller, selv om gruppen som ble gitt Mix 1 hadde lavere innhold av disse fettsyrene i fôret, En optimal blanding av tobisolje, med ketolinsyre som kan simulere EPA og DHA syntese, og camelinaolje med ALA, som forløper til EPA og DHA, kan være en mulig forklaring på det høye nivået av EPA, DPA og DHA i Mix 1-gruppen, Korrelasjonsanalysen

viste også høyest korrelasjon mellom nivå av ketolinsyre i dietten og nivå av EPA i røde blodceller, men var signifikant for både DPA og DHA også,

Tabell 10 Korrelasjon mellom nivå av ALA og ketolinsyre i fôret og EPA, DPA og DHA i røde blodceller fra rotte,

	20:5n-3 i røde blodceller	22:5n-3 i røde blodceller	22:6n-3 i røde blodceller
18:3n-3 i fôret	-0,428 (0,010)	0,048 (0,788)	-0,315 (0,065)
22:1n-11 i fôret	0,931 (<,0001)	0,684 (<,0001)	0,882 (<,0001)

Oppsummert viser resultatene at rotter kan utnytte ALA til syntese av EPA og DHA, og korrelasjon mellom ketolinsyre i dietten og EPA i røde blodceller tyder på en ketolinsyreeffekt,

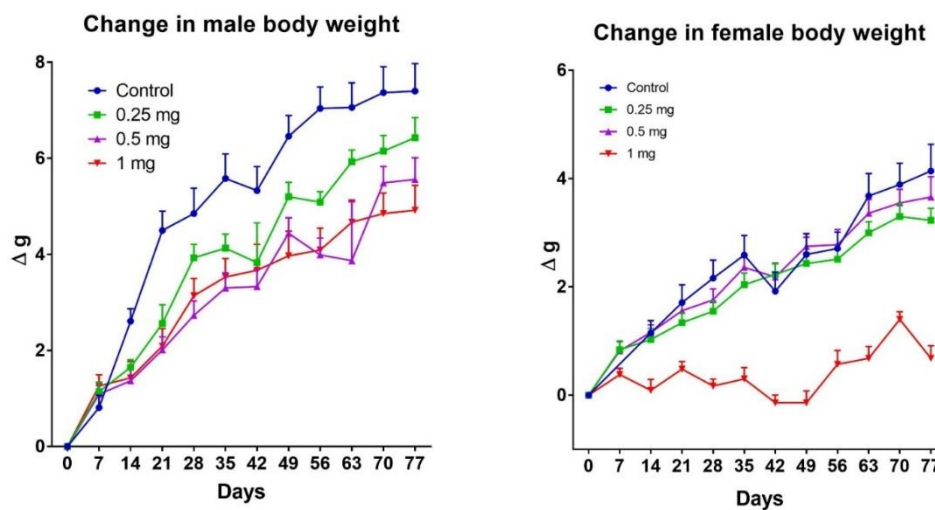
Genuttrykk i milt ble analysert i et forsøk på å studere mulig effekter av tobisolje og/eller camelinaolje på markører for immunrespons, Ingen forskjeller mellom gruppene ble funnet, Genuttrykk i lever ble analysert for å studere eventuelle effekter av tobisolje og/eller camelinaolje på gener relatert til fettsyremetabolisme, Resultatene viste at også i rotter blir sentrale gener i omega-3 syntesen (desaturaser/elongaser) nedregulert når rottene ble gitt en diett med høyt innhold av DHA (høy andel tobisolje i forsøksoljen), Det var ingen effekt på genuttrykk av disse genene som følge av høyt innhold av ALA (høy andel camelinaolje i forsøksoljen), En økt omdanning av ALA til EPA og DHA med økende mengde ALA i dietten kan med andre ord ikke forklares av økt genuttrykk av gener for sentrale enzymer i omdanning av ALA til EPA og DHA,

Resultatene blir i sin helhet presentert i rapporten fra DodreMarin (NFR256446),

5.3 Fôringsforsøk med mus

5.3.1 Vekst

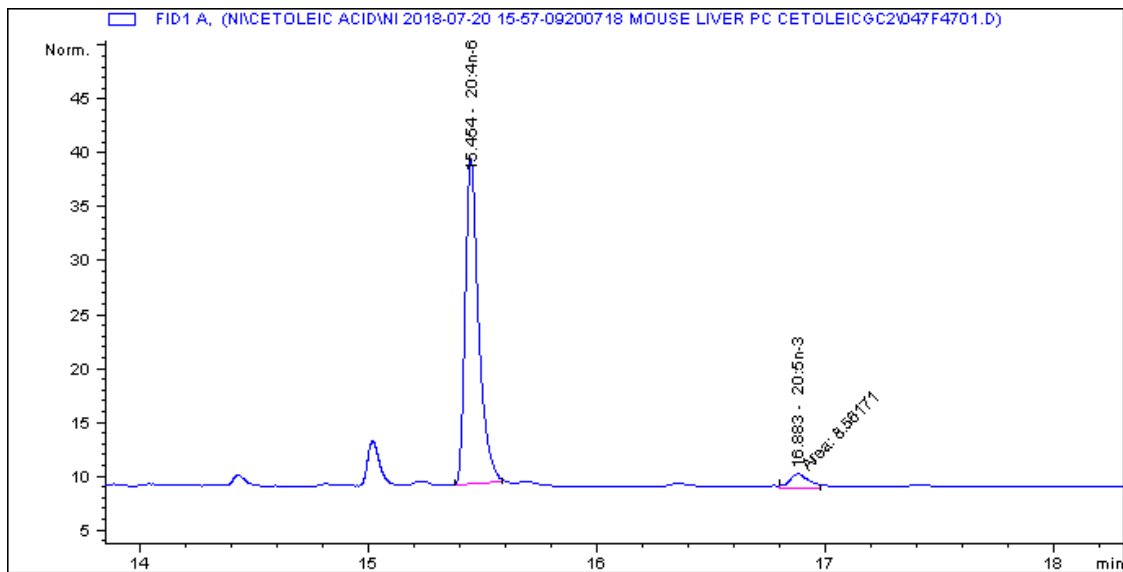
Musene viste generelt en god vekst i forsøket og det var ingen tegn til negative helseeffekter av de ulike dosene med ketolinsyre som ble benyttet med unntak av hunn-mus som ble gitt den høyeste dosen, Det var imidlertid relativt store forskjeller i vekst mellom de ulike diettgruppene av hann-mus hvor kontrollen viste høyere vekst enn musene som ble gitt ulike doser av ketolinsyre (Figur 9), Veksten av hunn-mus i de ulike gruppene var relativt lik med unntak av gruppen som ble gitt den høyeste dosen av ketolinsyre (1 mg/dag), som viste dårligere vekst, Det ble ikke tatt prøver av faeces for evaluering av fordøyelighet og opptak av ketolinsyren, Egenskaper til ketolinsyre kan ha påvirket opptak og fordøyelse, Ketolinsyre er en lang enumettet fettsyre med høyt smeltepunkt og som lett kan krystallisere ved lav temperatur når den finnes i ren form, noe som kan ha ført til ulik grad av krystallisering i mage/tarm etter tvangsfôring og dermed ført til individuelle forskjeller i fordøyelighet og opptak, Det var tegn til en kjønnseffekt av ketolinsyre med en signifikant tid*kjønn*ketolinsyre dose effekt på kroppsvektøkning ($P < 0,0001$), Hunn-mus som ble gitt 1 mg/dag viste liten økning i kroppsvekt, mens hann-mus gitt samme dose hadde en forventet vekstøkning (Figur 9),



Figur 9 Endring i vekt sammenliknet med startvekt av mus gitt 0,25 mg, 0,5 mg or 1 mg ketolinsyre (gjennomsnitt \pm standardfeil, $n=10$), Statistisk analyse ble gjennomført med ANOVA fulgt av post hoc med Bonferroni's korrigerings,

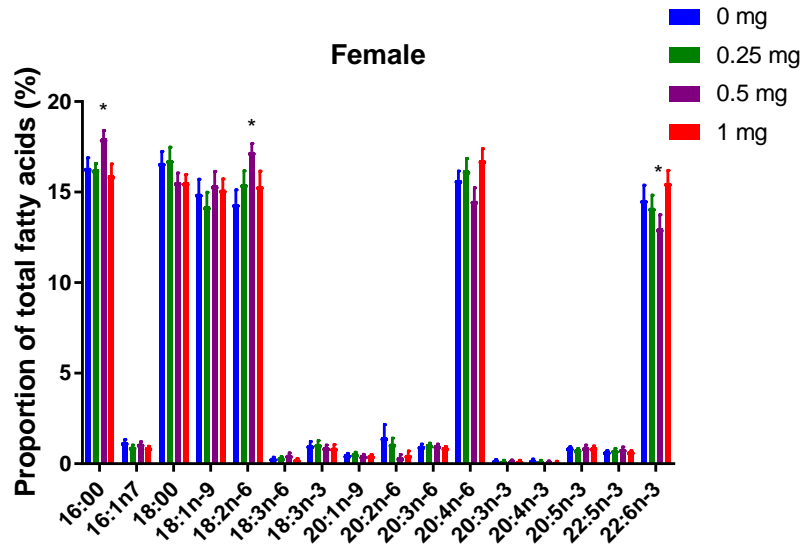
5.3.2 Fettsyresammensetning i lever

Leverprøver fra musene ble analysert for fettsyresammensetning i fosfolipider, som gir et mål på membransammensetning med blant annet EPA og DHA, Ketolinsyre ble detektert (Figur 10), men med veldig lave nivåer i fosfolipider, Dette kan skyldes at det er lite av denne fettsyren i fosfolipidene, Det kan også skyldes problemer knyttet til fordøyelse og opptak av ketolinsyre, Det ble dessverre ikke tatt prøver av faeces for vurdering av dette, Antageligvis var det også store individuelle forskjeller på opptak fra tarm, noe som også kan ha gitt individuelle forskjeller i fettsyresammensetning,

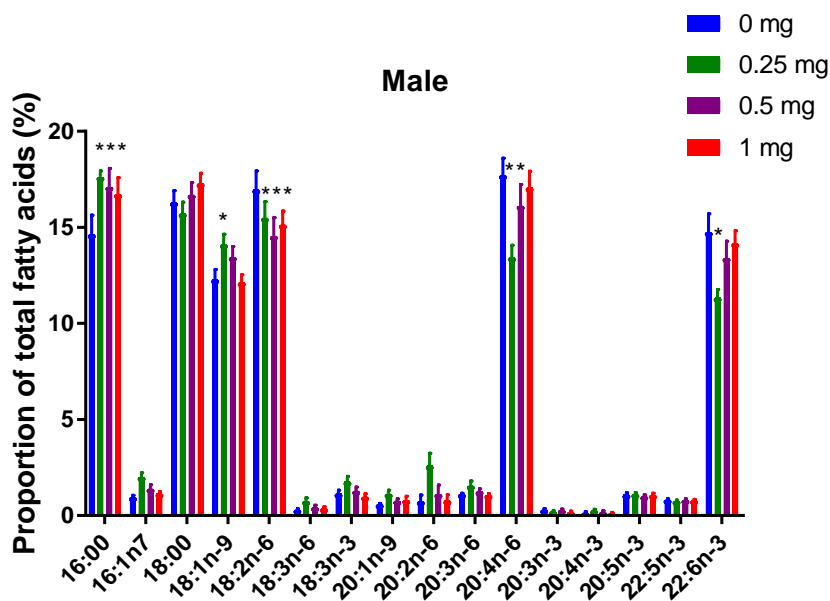


Figur 10 Utsnitt av kromatogram av PC i lever fra mus gitt 1 mg ketolinsyre per dag,

Det var liten effekt av ketolinsyre i hunn-mus på fettsyresammensetningen i fosfolipider (PE og PC), og det var ikke tegn til dose-respons relaterte endringer (Figur 11), Det var imidlertid interessante funn i hann-mus med en dose-respons av ketolinsyre på syntese av DHA (Figur 12), Kontrollgruppen viste imidlertid DHA på samme nivå som gruppen som fikk 1 mg ketolinsyre, og kan kanskje forklares med vekstforskjeller mellom gruppene, Kontrollgruppen var den gruppen som viste best vekst, Dose-respons av ketolinsyre på 20:4n-6 (aracidonsyre) slik som på DHA, kan tyde på en stimulering av synteseveiene for både omega-3 og omega-6 fettsyrer, Synteseveien av omega-3 og omega-6 fettsyrer deler de samme enzymene slik som desaturaser og elongaser, Få og små forskjeller i fettsyresammensetningen i lever, spesielt hos hunn-mus, kan også skyldes at dosen med ketolinsyre som ble benyttet i forsøket var for lav, eller at mus er mindre responsiv enn laks og rotter, Resultatene kan imidlertid tyde på forskjellig effekt av ketolinsyre på hann-mus og hunn-mus, med større potensial for endring i fettsyresammensetningen i hann-mus, Oppsummert ser det ut til at det er vanskelig å trekke sikre konklusjoner fra resultatene pga, metodiske utfordringer og store individuelle forskjeller,



Figur 11 Fettsyresammensetning i PE i lever fra hunn-mus gitt 0,25 mg, 0,5 mg eller 1 mg ketolinsyre (gjennomsnitt ± standardfeil, n=10), * signifikant forskjellig fra kontroll for hver fettsyre analysert med en-veis ANOVA fulgt av post hoc ved Dunnet's korrigerings,



Figur 12 Fettsyresammensetning i PE i lever fra hann-mus gitt 0,25 mg, 0,5 mg eller 1 mg ketolinsyre (gjennomsnitt ± standardfeil, n=10), * signifikant forskjellig fra kontroll for hver fettsyre analysert med en-veis ANOVA fulgt av post hoc ved Dunnet's korrigerings,

6 Konklusjon

- Laks fôret med sildeolje viste 13 % poeng høyere retensjon av EPA og DHA i hel kropp,
- Genuttrykksanalysen kan tyde på at sildeolje gir en dempet hemming av sentrale gener i omega3 synteseveien sammenliknet med sardinolje,
- Rotter fôret med ulike blandinger av camelinaolje og tobisolje viste økt utnyttelse og omdanning av ALA til EPA og DHA med økende mengde camelinaolje, og økende innhold av ketolinsyre fra tobisolje korrelerte med økt EPA og DHA innhold i rottenes røde blodceller,
- Det er vanskelig å trekke sikre konklusjoner fra museforsøk med ren ketolinsyre pga, store individuelle forskjeller,

7 Videre anbefalinger

- Det rapporterte forsøket på laks ble gjennomført i en relativt tidsbegrenset periode med fisk på ca 170-500 g, Det er manglede kunnskap hvordan ketolinsyre påvirker deponering av EPA og DHA i laks av kommersiell slaktestørrelse dersom det fôres med nordatlantiske fiskeoljer rike på ketolinsyre i hele sjøvannsfasen, Det er behov for et slikt oppfølgingsforsøk for økt kunnskap om effekten av ketolinsyre i større laks,
- Vi har undersøkt effekten av ketolinsyre på omega-3 syntesen i humane leverceller og ketolinsyre som del av en nordatlantisk fiskeolje i et rotteforsøk (som modellsystem for menneske), Det er behov for å følge opp disse forsøkene med humane intervensjonsstudier slik at vi kan undersøke ketolinsyre-effekten i menneske,

8 Leveranser

Leveranser i hht, prosjektplan:

01,03,2017: Artikkel til Nofima sin hjemmeside om prosjektstart:

<https://nofima.no/prosjekt/helsefortrinn-ved-nordatlantiske-fiskeolier/>

30,06,2017: Referat styringsgruppemøte

15,12,2017: Statusrapport fôringsforsøk

15,12,2017: Statusrapport museforsøk

31,12,2017: Referat styringsgruppemøte: Møtet ble utsatt,

30,06,2018: Referat styringsgruppemøte: Utsendt 07,08,18

Presentasjon av prosjektet:

Intervju russisk TV, <https://www.1tv.ru/-/waxoy>, 14,02,18 - Bente Ruyter

Presentasjon for TripleNine Group, 25,05,18 – Bente Ruyter

Pelagisk Arena, Bergen, 12,06,18 – Tone-Kari K, Østbye

Pelagic Fish Forum, Roma, 19,10,18 – Bente Ruyter

9 Referanser

- 1, Bjerkgeng B, Følling M, Lagocki S, Storebakken T, Olli JJ, Alsted N, 1997, Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-isomers of astaxanthin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture* 157:63-82,
- 2, Bou M, Berge GM, Baeverfjord G, Sigholt T, Østbye T-K, et al, 2017, Requirements of n-3 very long-chain PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity, *British Journal of Nutrition* 117:30-47,
- 3, Burdge G, 2004, Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:137-44,
- 4, Burdge GC, Hunt A, Postle AD, 1994, Mechanisms of hepatic phosphatidylcholine synthesis in adult rat: effects of pregnancy, *Biochem, J*, 303:941-7,
- 5, Burdge GC, Wright P, Jones AE, Wootton SA, 2000, A method for separation of phosphatidylcholine, triacylglycerol, non-esterified fatty acids and cholesterol esters from plasma by solid-phase extraction, *British Journal of Nutrition* 84:781-7,
- 6, Emken E, Adlof R, Duval S, Nelson G, 1999, Effect of dietary docosahexaenoic acid on desaturation and uptake in vivo of isotope-labeled oleic, linoleic, and linolenic acids by male subjects, *Lipids* 34:785-91,
- 7, Folch J, Lees M, Stanley GHS, 1957, A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues, *J, Biol, Chem*, 226:497-509,
- 8, Halvorsen B, Rustan AC, Christiansen EN, 1995, Effect of long-chain mono-unsaturated and n-3 polyunsaturated fatty acids on postprandial blood and liver lipids in rats, *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 55:469-75,
- 9, Halvorsen B, Rustan AC, Madsen L, Reseland J, Berge RK, et al, 2001, Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats, *Annals of nutrition & metabolism* 45:30-7,
- 10, Hoshi M, Kishimoto Y, Hignite C, 1973, 2,3-Erythro-dihydroxyhexacosanoic acid and homologs: isolation from yeast cerebrin phosphate and determination of their structures, *J, Lipid Res*, 14:406-14,
- 11, Mason ME, Eager ME, Waller GR, 1964, A Procedure for the Simultaneous Quantitative Determination of Glycerol and Fatty Acid Contents of Fats and Oils, *Analytical Chemistry* 36:587-90,
- 12, Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Lin Y, Goodson S, Riggs P, et al, 2003, Effects of beef-and fish-based diets on the kinetics of n-3 fatty acid metabolism in human subjects, *The American journal of clinical nutrition* 77:565-72,
- 13, Ruyter B, Moya-Falcón C, Rosenlund G, Vegusdal A, 2006, Fat content and morphology of liver and intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects of temperature and dietary soybean oil, *Aquaculture* 252:441-52,
- 14, Sissener N, Torstensen B, Owen M, Liland N, Stubhaug I, Rosenlund G, 2017, Temperature modulates liver lipid accumulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed low dietary levels of long-chain n-3 fatty acids, *Aquacult, Nutr*, 23:865-78,
- 15, Sissener NH, Ruyter B, 2016, Oppdatering av utredningen: Effekter av endret fettsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse, velferd og robusthet,
- 16, Sprecher H, 2000, Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1486:219-31,

- 17, Sprecher H, Luthria DL, Mohammed B, Baykousheva SP, 1995, Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids, *J, Lipid Res*, 36:2471-7,
- 18, Thomassen MS, Rein D, Berge GM, Østbye T-K, Ruyter B, 2012, High dietary EPA does not inhibit Δ 5 and Δ 6 desaturases in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed rapeseed oil diets, *Aquaculture* 360:78-85,

