

Vil ketolinsyre (22:1n-11) fra lodde-, sild- og tobisolje føre til bedret utnyttelse av omega-3 fettsyrer?

Bente Ruyter, Tone-Kari Østbye, Odd Helge Romarheim, Astrid Nilsson, Inger Øien Kristiansen, Målfrid Bjerke, Silje Kristine Bergum, Marta Bou og Gerd Berge





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

Nofima har om lag 350 ansatte.

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

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsen gate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunnalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

	ISBN: 978-82-8296-395-4 (trykt) ISBN: 978-82-8296-396-1 (pdf) ISSN 1890-579X
<i>Tittel:</i> Vil ketolinsyre (22:1n-11) fra lodde-, sild- og tobisolje føre til bedret utnyttelse av omega-3 fettsyrer?	<i>Rapportnr.:</i> 27/2016 <i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Bente Ruyter, Tone-Kari Østbye, Odd Helge Romarheim, Astrid Nilsson, Inger Øyen Kristiansen, Målfrid Bjerke, Silje Kristine Bergum og Gerd Berge	<i>Dato:</i> 14. oktober 2016
<i>Avdeling:</i> Ernæring og førteknologi	<i>Ant. sider:</i> 24
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> 901017
<i>Stikkord:</i> Nord Atlantisk fiskeolje, omega-3 metabolisme, ketolinsyre	<i>Prosjektnr.:</i> 11068
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i>	
<p>Fiskeoljer fra tobis, sild og lodde kjennetegnes ved et naturlig høyt innhold av den langkjedete mono-umettede fettsyren ketolinsyre (22:1n-11) og et moderat innhold av de marine omega-3 fettsyrene eicosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA). Dette skiller disse fiskeoljene fra søramerikanske fiskeoljer som til sammenligning inneholder lite ketolinsyre og desto mer av de marine omega-3 fettsyrene. Ketolinsyre er en fettsyre vi har relativt begrenset kunnskap om.</p> <p>Målet med dette prosjektet har vært å teste hypotesen om at det høye nivået av ketolinsyre kan gi nordatlantiske fiskeoljer visse helsefortrinn. I prosjektet har det vært utført forsøk som viste at ketolinsyre i ren form stimulerer både humane leverceller og leverceller fra laks slik at de får økt kapasitet til å produsere EPA og DHA fra den kortere α-linolensyre. Disse funnene er i overensstemmelse med 10% høyere retensjon av DHA i laks gitt et fôr hvor oljekilden var sildeolje rik på ketolinsyre. Laks fôret med sildeoljedietten fikk også redusert fettnivå i lever.</p> <p>Kunnskapen om ketolinsyre gir oss et bedre grunnlag for å vurdere hvordan ulike typer fiskeoljer best kan settes sammen slik at det sunne marine omega-3 fett utnyttes maksimalt.</p>	

1	Innledning.....	1
1.1	Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt:	1
1.2	Potensielle fordeler ved bruk av nordatlantiske fiskeoljer i laksefôr:.....	2
1.3	Potensielle fordeler ved inntak av nordatlantiske fiskeoljer i humant kosthold:	3
1.4	Vitenskapelig mål og delmål for prosjektet.....	3
1.5	Prosjektets omfang.....	3
1.6	Prosjektorganisering.....	3
2	Problemstilling og formål	5
2.1	Effekt mål og resultatmål	5
3	Prosjektgjennomføring.....	6
3.1	Metodikk	6
3.1.1	Celleforsøk med leverceller fra laks	6
3.1.2	Celleforsøk med humane leverceller.....	6
3.1.3	Celleforsøk med humane immunceller	6
3.1.4	Bestemmelse av cytokiner (TNF- α og IL-6).....	7
3.1.5	Analyse av acyl-CoA oxidase enzymaktivitet.....	7
3.1.6	Analyse av genuttrykk	7
3.1.7	Analyse av radioaktive metabolitter	8
3.1.8	Fôrproduksjon og formulering	9
3.1.9	Fôringsforsøk med laks.....	11
3.1.10	Beregninger og analyser fra fiskeforsøk.....	11
3.1.11	Analyse av fettsyresammensetning i celler og fisk.....	12
3.2	Gjennomføring av prosjektet	12
4	Resultat og diskusjon	13
4.1	Effekt av ketolinsyre på omega-3 fettsyremetabolisme i humane celler og lakseceller.....	13
4.2	Kapasitet til EPA og DHA syntese	13
4.2.1	Humane leverceller	14
4.2.2	Hepatocytter fra laks	14
4.2.3	Ketolinsyre stimulerer flere trinn i omega-3 synteseveien	15
4.3	Aco aktivitet i celler	16
4.4	Genuttrykk i humane leverceller og leverceller fra laks.....	16
4.5	Immunrespons i humane celler.....	17
4.6	Fôringsforsøk med laks.....	17
4.6.1	Fettsyresammensetning av forsøksfôr.	17
4.6.2	Vekst og fôrutnyttelse.	19
4.6.3	Fettsyreretensjon og fettsyresammensetning i helkropp.	19
4.6.4	Genuttrykk i lever	20
5	Konklusjon	21
6	Vurdering av mulighetene for videre anvendelse av resultater fra prosjektet og evt. nytteverdi for sjømatnæringen.....	22
7	Leveranser	23
8	Referanser	24

1 Innledning

1.1 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 råvaren. Nordatlantiske fiskeoljer fra tobis, sild og lodde, har generelt et lavere innhold av omega-3 fettsyrene EPA og DHA og et høyere nivå av den lange monoumettede fettsyren 22:1n-11 (ketolinsyre), enn søramerikanske fiskeoljer. Norskproduserte nordatlantiske fiskeoljer prises lavere enn søramerikanske fiskeoljer på grunn det lavere EPA og DHA innholdet, men det kan være for snevert å kun se på EPA og DHA nivået i fiskeoljer ved fastsetting av kvalitet. Det er i den sammenheng viktig å øke kunnskapen om hvorvidt norske fiskeoljer har et kvalitetsfortrinn ved at de produseres fra ferske råvarer som inneholder et høyt nivå av den lange monoumettede fettsyren 22:1n-11 (ketolinsyre).

Tall fra IFFO for 2013 viser en samlet produksjon av nordatlantiske fiskeoljer fra Norge, Island og Danmark på 145220 tonn. Vi kan anta at alle disse oljene er rike på langkjedete monoumettede fettsyrer som 22:1n-11 (ketolinsyre). Total global produksjon av fiskeolje er omkring 1 millioner tonn (Shepherd et al., 2013). Tabellene under viser at oljene tobis, lodde og sild inneholder ca 20% av fettsyren 22:1n-11 (% av total fettsyre), mens f.eks. chilensk sardinolje kun inneholder ca 1% (Tabell 1a og b).

Tabell 1a Fettsyresammensetning av oljer*

% av totale fettsyrer	Sild	Lodde	Tobis	Kolmule	Sardin
22:1 n-11/9/7	23	22	18	8	1
20:5 n-3 (EPA)	4	6	8	8	14
22:6 n-3 (DHA)	4	2	9	10	9
EPA+DHA	9	8	17	17	23
Sum SFA	21	18	20	20	33
Sum MUFA	57	63	45	42	30
Sum n-6	2	2	2	2	1
Sum n-3	13	12	26	21	30
Sum PUFA	14	13	28	23	33
Ratio n-3/n-6	7	7	14	13	22

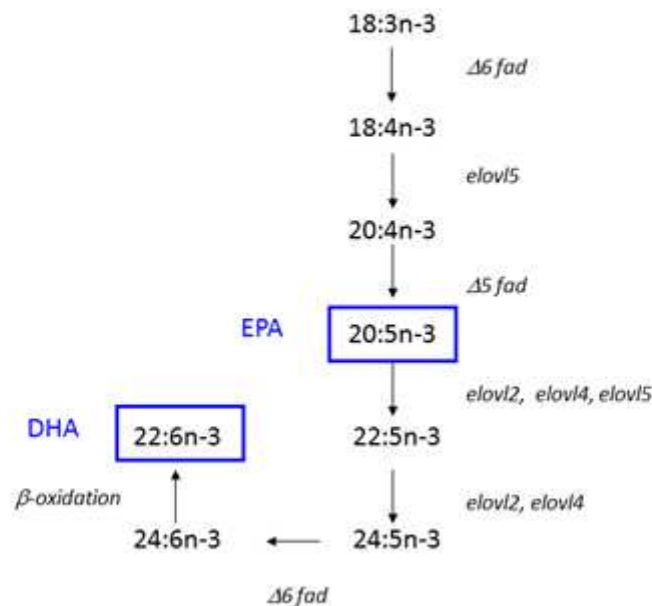
*Tabellen viser eksempler på fettsyresammensetning av oljer fra ulike fiskearter. Det er sesongvariasjon i fettsyresammensetningen av oljene.

Tabell 1b Utvalgte monoumettede fettsyrer i fiskeoljer

% av totale fettsyrer	Tobis	Lodde	Sild
18:1 n-9	4	9	10
20:1 n-11	1	1	2
20:1 n-9	14	16	13
22:1 n-11	17	20	22
22:1 n-9	1	2	1
Sum 20:1	15	18	15
Sum 22:1	18	22	23

1.2 Potensielle fordeler ved bruk av nordatlantiske fiskeoljer i laksefôr:

Laks er fra naturens side tilpasset et fôr med høyt innhold av den lange monoumettede fettsyren 22:1n-11. Flere studier har videre vist at laks i stor grad utnytter 22:1 n-11 som en god energikilde. I peroksisomal β -oksidasjon forkortes fettsyren 22:1n-11 til 20:1n-11, og deretter videre i mitokondriell β -oksidasjon til 18:1 og 16:0 (Thomassen *et al.*, 1985). Data tyder på at 22:1n-11 stimulerer peroksisomal β -oksidasjon (Bremer and Norum, 1982). Peroxisomal β -oksidasjon er også et viktig hastighetsbegrensende trinn i siste ledd i omdanningen fra 18:3n-3 til DHA i laks (se figur under). Opstvedt (Opstvedt, 1997) presenterte en hypotese om at langkjedete monoumettede fettsyrer bedret hemostase i pattedyr gjennom økt peroksisomal β -oksidasjon og dermed økt syntese av EPA og DHA. Men det er foreløpig ikke testet ut hvorvidt denne hypotesen er gjeldende i laks og menneske. Laks har kapasitet til å omdanne 18:3n-3 fra planteolje til de marine fettsyrene EPA og DHA, men kapasiteten er relativt lav (Ruyter *et al.*, 2000c, Ruyter *et al.*, 2000a, Ruyter *et al.*, 2000b, Ruyter and Thomassen, 1999). Med begrenset tilgang på fiskeolje på verdensbasis, er det viktig å stimulere laksens egenproduksjon av EPA og DHA i størst mulig grad, og da spesielt det siste trinnet i omdanningen med peroksisomal β -oksidasjon fra 24:5n-3 til 22:6n-3 (DHA).



Figur 1 Omega-3 fettsyremetabolismen

1.3 Potensielle fordeler ved inntak av nordatlantiske fiskeoljer i humant kosthold:

Som nevnt over, så presenterte Opstvedt (Opstvedt, 1997) en hypotese om at langkjedete monoumettede fettsyrer bedret hemostase i pattedyr gjennom økt peroksisomal β -oksidasjon og dermed økt syntese av EPA og DHA. Det er foreløpig ikke testet ut hvorvidt denne hypotesen er gjeldende i menneske. I dette prosjektet ville vi teste ut hvorvidt ketolinsyre øker omdanningen av α -linolensyre (ALA, 18:3n-3) til EPA og DHA i en human levercellelinje.

1.4 Vitenskapelig mål og delmål for prosjektet

Hovedmål

Teste ut hypotesen om at tobis-, sild- og loddeolje med høyt innhold av 22:1n-11 vil føre til økt egenproduksjon av EPA og DHA i laks og humane celler.

Delmål

1. Undersøke om ren ketolinsyre fører til økt omdanning av 18:3n-3 til EPA og DHA i primære leverceller fra laks, og om økningen skyldes stimulert peroksisomal β -oksidasjonskapasitet.
2. Undersøke om ren ketolinsyre fører til økt omdanning av 18:3n-3 til EPA og DHA i en human levercellelinje, og om økningen skyldes stimulert peroksisomal β -oksidasjonskapasitet.
3. Fôre laks med to ulike nivåer av nordatlantisk fiskeolje (sildeolje) og to ulike nivåer av søramerikansk fiskeolje (sardinolje) fra en fiskestørrelse på 100 gram ved start av forsøket til en fiskestørrelse på 200 gram ved slutt av forsøket. Bestemme retensjonen av EPA og DHA i helkropp og peroksisomal β -oksidasjonskapasitet i lever.

1.5 Prosjektets omfang

Prosjektets totale økonomiske ramme har vært på 1 510 000 NOK fordelt på 2014 og 2015. Prosjektet har bestått av tre hovedforsøk: 1. celleforsøk primære leverceller fra laks, 2. celleforsøk med human levercellelinje og 3. fôringsforsøk med laks.

1.6 Prosjektorganisering

Nofima er administrativ leder for prosjektet.

Prosjektgruppe

Prosjektleder: Bente Ruyter, ansvarlig for administrasjon og koordinering av forskningsaktivitet og rapportering

Prosjektdeltakere i Nofima

- Odd Helge Romarheim: ansvarlig for fôrproduksjon og rapportering
- Gerd Berge: Ansvarlig for oppfølging av fôringsforsøk, bearbeiding og resultatrapportering fra fôringsforsøk
- Tone-Kari Østbye: Ansvarlig for gjennomføring av forsøk med lakseceller og humane leverceller, bearbeiding og rapportering av resultater
- Astrid Nilsson: Ansvarlig for gjennomføring av forsøk med humane immunceller, bearbeiding og rapportering av resultater

- Inger Øien Kristiansen, Målfrid Bjerke, Silje Kristine Bergum ingeniører ansvarlig for analysearbeid i prosjektet.

Styringsgruppe

Leder: Ola Flesland: TripleNine Group 999

Eldar Bendiksen: Salmar

Jørgen Seliussen: Hordafør

2 Problemstilling og formål

2.1 Effektmål og resultatmål

Resultater fra prosjektet har ført til ny kunnskap om hvorvidt det høye innholdet av den lange monoumettede fettsyren 22:1n-11 (ketolinsyre) i norske fiskeoljer representerer et kvalitetsfortrinn som vil føre til bedret utnyttelse av EPA og DHA i både fisk og menneske.

På sikt vil dette bidra med viktig kunnskap for marin råvaresektor i Norge som kan føre til merverdi på nordatlantiske fiskeoljer. Bedre dokumentasjon av helseeffekter av nordatlantiske fiskeoljekvaliteter er viktig for å styrke næringens omdømme og for en videre verdiskapning.

Prosjektresultater vil også gjøre næringsaktørene innenfor lakseoppdrett bedre rustet til å vurdere hvordan ulike typer fiskeoljer best kan utnyttes for å gi best mulig retensjon av EPA og DHA i fisken, og dermed kunne bidra med kunnskap om best mulig bærekraftig utnyttelse av den begrensede råvaren som fiskeolje representerer.

3 Prosjektgjennomføring

3.1 Metodikk

3.1.1 Celleforsøk med leverceller fra laks

Leverceller ble isolert fra Atlantisk laks i henhold til metode beskrevet av Dannevig og Berg (Dannevig and Berg, 1985). Etter isolering ble cellene filtrert gjennom et 100 µM nylon filter. Cellene ble vasket tre ganger i L-15 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) og sentrifugert i 2 minutter ved 50 xg mellom hver vask. Etter siste vask ble cellene reløst i L-15 med Glutamax (Invitrogen, Carlsbad, USA) dyrkningsmedium tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 1 % bikarbonat, 5mM HEPES og 1 % PenStrep (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Omtrent 1×10^7 celler ble deretter sådd ut i 25 cm² celleflasker belagt med laminin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Cellene ble dyrket ved 13°C. Etter 3 timer inkubering ble cellene tilsatt vekstmedium med 2% føtalt kalveserum og 0, 20, 40, 60 eller 80 uM ketolinsyre. Konsentrasjonene av ketolinsyre ble valgt ut i fra observerte verdier av ketolinsyre i plasma slik at konsentrasjonen var innenfor et fysiologisk område. Cellene ble dyrket i 20 timer før de ble tilsatt nytt vekstmedium (med 2% føtalt kalveserum og 0, 20, 40, 60 eller 80 uM ketolinsyre). Cellene som skulle til analyse av kapasitet til EPA og DHA syntese ble i tillegg tilsatt radioaktivt merket linolensyre, ¹⁴C-18:3n-3 (sluttkonsentrasjon på 7 uM). Den radioaktivt merkede fettsyren ble tilsatt som et natriumsalt bundet til bovint serum albumin (BSA) (i forholdet 1:2.7). Cellene ble inkubert i 48 timer. Før høsting ble cellene vasket to ganger i 1% BSA i PBS og to ganger i PBS. Cellene ble høstet i PBS for analyse av cellulær radiomerket fettsyresammensetning, acyl-CoA oxidase (acox) enzymaktivitet og fettsyresammensetning i celler, og i buffer RLT (Qiagen) for genuttryksanalyse. Det ble benyttet 6 paralleller til genuttryksanalyse, 4 paralleller til analyse av kapasitet til EPA+DHA syntese og 3 paralleller til analyse av fettsyresammensetning i celler og ACOX enzymaktivitet.

3.1.2 Celleforsøk med humane leverceller

HepG2 celler (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) fra tre ulike cellebatcher ble sådd. Etter 4 timers inkubering ved 37 °C og 5% CO₂ ble cellene tilsatt vekstmedium med 10% føtalt kalveserum og 0, 20, 40, 60 eller 80 uM ketolinsyre. Det ble benyttet samme dose av ketolinsyre i celleforsøket med humane celler og lakseceller. Cellene ble dyrket videre i 40 timer før nytt vekstmedium (med 10% føtalt kalveserum og 0, 20, 40, 60 eller 80 uM ketolinsyre) ble tilsatt. Cellene som skulle til analyse av kapasitet til EPA og DHA syntese ble i tillegg tilsatt radioaktivt merket linolensyre, ¹⁴C-18:3n-3 (sluttkonsentrasjon på 7 uM). Den radioaktivt merkede fettsyren ble tilsatt som et natriumsalt bundet til bovint serum albumin (BSA) (i forholdet 1:2.7). Cellene ble inkubert i 48 timer. Før høsting ble cellene vasket to ganger i 1% BSA i PBS og to ganger i PBS. Cellene ble høstet i PBS for analyse av cellulær radiomerket fettsyresammensetning, ACOX enzymaktivitet og fettsyresammensetning i celler, og i buffer RLT (Qiagen) for genuttryksanalyse. Det ble benyttet 6 paralleller til genuttryksanalyse, 4 paralleller til analyse av kapasitet til EPA+DHA syntese og 3 paralleller til analyse av fettsyresammensetning i celler og ACOX enzymaktivitet.

3.1.3 Celleforsøk med humane immunceller

THP-1 celler (en human monocyt cellerlinje) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) ble sådd ut med en tetthet på 1.0×10^6 cells/ml i vekstmedium (RPMI 1640 medium med 10% FCS, 0.05 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin og 100 µg/mL streptomycin) og

tilsatt 100 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) i 72 timer ved 37 °C og 5% CO₂ slik at cellene differensierte til makrofager. Cellene ble vasket 2 ganger med vekstmedium uten merkaptoetanol før de ble tilsatt vekstmedium med 0, 20, 40, 60 eller 80 uM ketolinsyre i 24 timer. For å bestemme LPS (lipopolysakkridd) stimulert sekresjon av cytokiner ble det tilsatt 0.5 ng/ml LPS (E.coli O55:B5). Etter 6 timers ble supernatantene samlet for cytokinanalyse.

3.1.4 Bestemmelse av cytokiner (TNF- α og IL-6)

Mengde IL-6 og TNF- α i celledsupernatanter ble bestemt ved hjelp av ELISA. MaxiSorp™ ELISA plates (Nunc, Roskilde, Denmark) ble coatet med monoklonalt mus anti-human IL-6 eller TNF- α antistoff (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, US) løst i coatingbuffer (0.1 M Carbonate/Bicarbonate buffer pH 9.6) over natt ved 4 °C. Platene ble vasket tre ganger med PBS tilsatt 0.01% Tween-20 før uspesifikke bindingssteder ble blokkert med 5% BSA i PBS 1 time ved romtemperatur. Etter 5 ganger vask med PBS-Tween ble platene tilsatt prøver (cellesupernatanter) eller recombinant IL-6 eller TNF- α standarder (BD Bioscience Pharmingen) fortynnet i HPE buffer (high performance ELISA buffer (Sanquin, Amsterdam, Netherlands)). Etter 1,5 timers inkubering ved romtemperatur og 5 ganger vask med PBS-Tween ble platene inkubert i 1 time med biotinylert muse anti-human IL-6 eller TNF- α monoclonalt antistoff (BD Bioscience Pharmingen) i HPE buffer. Etter nok en vasking ble streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (BD Bioscience Pharmingen) i HPE buffer tilsatt og inkubert i 30 minutter ved romtemperatur. Platene ble så vasket 5 ganger med 30 sekunders mellomrom før 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) i 0.05 M Phosphate-Citrate-Buffer med H₂O₂ ble tilsatt. Etter 10 minutter ble reaksjonen stoppet ved tilsetning av 1 N H₂SO₄, og absorbansen ved 450 nm bestemt ved hjelp av Titertek Multiscan plus MK II plate reader (Labsystems, Finland). *(Resultater av analysen er ikke presentert i rapport, men kan opplyses ved henvendelse).*

3.1.5 Analyse av acyl-CoA oxidase enzymaktivitet

Fortynnet celleprøve (30 uL) ble tilsatt 190 uL assay mix (0.710 mL H₂O, 0.2 mL 0.5 M Tris pH 8.5, 0.050 mL 1 mg/mL peroksidase, 0.010 mL 60 mg/mL BSA), 3 uL FAD (1.3 mg/mL), 3 uL 2.5 mg/ml in 0,01M NaOH 2',7'-dichlorofluorescein diacetate og 3 uL 6 mg/ml PalmCoA i Tris 0.1 M buffer pH 8.5. Endring i absorbans ved 502 ble målt i 3 minutter. Acox aktivitet er definert som: ACO activity = $\Delta A_{502} / \text{min} / 0.156 \mu\text{M}^{-1} \times 0.229 / 0.030 \times \text{fortynning} = \text{nmol/min/ml}$.

3.1.6 Analyse av genuttrykk

Celler til genuttrykksanalyse ble høstet i buffer RLT og RNA ble isolert fra cellene med RNeasy Plus Mini kit (Qiagen). TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) ble brukt for å syntetisere cDNA fra 1000 ng RNA i et totalt volum på 20 uL. Reaksjonen ble kjørt 10 minutter ved 25 °C, 48 °C i 60 minutter, og 95 °C i 5 minutter. PCR reaksjonen ble kjørt med 4 uL cDNA (1:10 fortynnet), 1 uL primer miks (Tabell 2 og 3) og 5 uL SYBR green master miks (Roche) under følgende forhold: 95 °C i 5 sekunder, 45 sykluser med 95 °C i 15 sekunder/60 °C i 15 sekunder/ 72 °C i 15 sekunder. Smeltepunktsanalyse ble kjørt for å bekrefte amplifisering av kun et fragment. Relativt genuttrykk ble beregnet ved $\Delta\Delta C_t$ metoden. *(Resultater av analysen er ikke presentert i rapport, men kan opplyses ved henvendelse).*

Tabell 2 Primere for genuttryksanalyse av humane HepG2 celler

Gen	Genbank nr	Primer navn	Primer sekvens
<i>fads1</i>	NM_013402	hs-fads1-F1	GAGCACCATCTTTTTCCACG
		hs-fads1-R1	CATGCTTGGCACACAAGGAC
<i>Fads2</i>	NM_004265	hs-fads2-F1	AGAAGCATAACCTGCGCACC
		hs-fads2-R1	GAAGGCATCCGTTGCATCTTC
<i>elongase 2</i>	NM_017770	hs-ELOVL2-F1	ATGCTGGCAGAGCTCATTCT
		hs-ELOVL2-R1	AAAGCACCTTGGCTACCCG
<i>elongase 5</i>	NM_021814	hs-ELOVL5-F1	CGTGACATTCCCTCTTGGT
		hs-ELOVL5-R1	CCCCTTTCTTGTTGTAGGTCTGA
<i>acox1</i>	NM_004035	hs-acox1-F1	CCCATAAGCCTTTGCCAGGA
		hs-acox1-R1	GGCTTCACCTGGGCATACTT
<i>rpol2</i>		hs-rpol2-F2	GCGCAATGAGCAGAACGGCG
		hs-rpol2-R2	ACTTCTGCATGGCACGGGGC
<i>gapdh</i>	NM_002046.3	hs-gapdh-F1	ATCCCATCACCATCTTCCAGGAGC
		hs-gapdh-R1	AAATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT
<i>ef1a</i>	NM_001402.5	hs-ef1a-F1	GACACGTAGATTCGGGCAAGTCCA
		hs-ef1a-R1	CCATCTCAGCAGCTCCTTCTCAA

Tabell 3 Primere for genuttryksanalyse av laksehepatocytter

Gene	Genbank nr	Primer navn	Primer sekvens
<i>Acox</i>	DQ364432	Ssa-acox F1	CCTTCATTGTACCTCTCCGCA
		Ssa-acox R1	CATTTCAACCTCATCAAAGCCAA
<i>eitf3</i>	DW542195	Ssa-etif3 F1	CAGGATGTTGTTGCTGGATGGG
		Ssa-etif3 R1	ACCCAACCTGGGACGGTCAAGA
<i>d5fad</i>	af478472	Ssa-d5d F2	GCTTGAGCCCGATGGAGG
		Ssa-d5d R2	CAAGATGGAATGCGGAAAATG
<i>d6fad_a</i>	ay458652	Ssa-d6d A F3	TCCCCAGACGTTTGTGTCAGATGC
		Ssa-d6d A R3	GCTTTGGATCCCCATTAGTTCCTG
<i>d6fad_b</i>	gu207400	Ssa-d6d B F3	TGACCATGTGGAGAGTGAGGG
		Ssa-d6d B R3	AACTTTTGTAGTACGTGATTCCAGTC
<i>d6fad_c</i>	gu207401	Ssa-d6d C F2	TGAAGAAAGGCATCATTGATGTTG
		Ssa-d6d C R2	CACAAACGTCTAGGAAATGTCC
<i>ef1a</i>	AF321836	Ssa-ef1a F	CACCACCGCCATCTGATCTACAA
		Ssa-ef1a R	TCAGCAGCCTCCTTCTCGAACTTC
<i>elovl2</i>	TC91192	Ssa-elong 2F1	CGGGTACAAAATGTGCTGGT
		Ssa-elong 2R1	TCTGTTTGCCGATAGCCATT
<i>elovl5b</i>	NM_001136552	Ssa-elovl5b F2	GCAACCTTGACCCAAACAGG
		Ssa-elovl5b R2	CCTTGTCTCTACGCAAGGGA

3.1.7 Analyse av radioaktive metabolitter

Lipider fra hepatocytter inkubert med ^{14}C -18:3n-3 ble ekstrahert ifølge Folch et al. (Folch *et al.*, 1957) og fettsyresammensetningen av cellene ble bestemt med reversert fase høytrykks-

væskrokromatografi som beskrevet av Narce et al. (Narce *et al.*, 1988). Den mobile fase var acetonitril:vann (85:15 volum/volum) ved en strømningshastighet på 1 mL/ minutt og en temperatur på 30°C. Kolonnen som ble brukt var en symmetri 3.5 lm C18 kolonne og fettsyrene ble identifisert med en radioaktiv detektor A-100 (radiomatic Instrument & Chemicals, Tampa, Florida, USA). Fettsyrene ble identifisert ved sammenligning av deres retensjonstider med eksterne standarder. Bestemmelse av proteinkonsentrasjon i cellene fra hver celleflaske ble utført ved hjelp av Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's modification (Sigma). Absorbansen ble lest av etter 30 minutters inkubering ved hjelp av Spectrostar Nano plateleser fra BMG LABTECH GmbH (Ortenberg).

3.1.8 Fôrproduksjon og formulering

Det ble formulert en grunndiett med ingredienser og kjemisk sammensetning tilpasset atlantisk laks fra ca. 100g (Tabell 4). Alle ingredienser, med unntak av oljene, ble blandet til en grunnblanding der soyaproteinkonsentrat, LT fiskemel og hvetegluten utgjorde hovedkilden til protein. Yttriumoksid ble brukt som markør for bestemmelse av fordøyelighet av næringsstoff. Grunnblandingen ble så ekstrudert i en Wenger TX-52 dobbeltskruet ekstruder (Wenger, USA) til pellet med ca. 3mm diameter. Pelletene ble tørket og fordelt i fire like batcher, og hver batch ble tilsatt ulike oljeblandinger av rapsolje og enten DHA-anriket sardinolje eller nordatlantisk sildeolje (Tabell 5) ved hjelp av en vakuum coater (Dinnissen, Nederland). En oversikt over fettsyresammensetningen i oljene som ble tilsatt er gitt i Tabell 6.

Tabell 4 Formulering og estimert kjemisk sammensetning av diettene

Ingredienser, %	
Soyaproteinkonsentrat ¹	23,92
LT-fiskemel ²	22,00
Oljeblanding ³	22,00
Hvetegluten ⁴	13,00
Sammalt hvete ⁵	11,00
Hestebønner ⁶	3,50
Mononatriumfosfat ⁷	2,00
Mineralmiks ⁷	0,52
Farge (Carophyll Pink 10% CWS) ⁸	0,05
Fordøyelsesmarkør (Yttriumoksid) ⁹	0,01
Estimert kjemisk sammensetning, %	
Protein	42,0
Fett	26,0

¹EWOS, Norge

²Welcon, Egersund, Norge

³Se Tabell 3.4 for detaljer

⁴Tereos Syral, Belgia

⁵Norgesmøllene, Bergen, Norge

⁶Socomac Rouen, Frankrike

⁷Normin, Norge

⁸DSM, Frankrike

⁹VWR, Norway

Tabell 5 Oljeblandinger i forsøksfôrene, % av tilsatt olje

	Fôr 1 Sardin 1	Fôr 2 Sardin 2	Fôr 3 Sild 1	Fôr 4 Sild 2
Rapsolje ¹	80,2	72,5	51,7	33,2
Sardinolje ²	11,9	16,5	-	-
EPAX 1050 TG ³	7,9	11,0	-	-
Sildeolje ⁴	-	-	48,3	66,8

¹Emmelev, Danmark

²Vedde, Norge

³Epax AS, Norge

⁴Norsildmel, Norge

Tabell 6 Fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) av fiskeoljer benyttet i fôret

% av totale fettsyrer	Sildeolje	Sardinolje	EPAX (DHA rik olje)
14:0	8,1	8,3	0,1
16:0	12,0	22,1	4,1
18:0	1,0	3,1	3,7
20:0	0,2	0,2	0,8
22:0	0,1	0,1	0,4
Sum SFA	21,4	33,8	12,3
16:1n-7	3,8	9,3	0,0
18:1 n-9	9,0	18,8	7,8
20:1n-9	12,9	4,1	2,1
22:1n-11	23,9	0,8	1,3
24:1n-9	0,7	0,2	1,3
Sum MUFA	50,3	33,3	2,0
18:2n-6	1,8	0,7	0,0
18:3n-6	0,1	0,3	0,0
20:2n-6	0,3	0,1	0,6
20:3n-6	0,1	0,1	0,0
20:4n-6	0,2	0,2	2,4
Sum n-6	2,5	1,5	1,1
18:3n-3	1,3	0,2	0,4
18:4n-3	3,0	3,1	1,1
20:4n-3	0,7	0,6	0,8
20:5n-3	5,1	16,2	12,5
21:5n-3	0,3	0,9	0,0
22:5n-3	0,8	2,7	2,7
22:6n-3	7,6	3,3	48,4
Sum n-3	18,8	27,0	66,2
Sum EPA+DHA	12,7	19,5	61,0

3.1.9 Fôringsforsøk med laks

Atlantisk laks med gjennomsnittsvekt på 110 gram ble fordelt i 12 kar, 30 fisk i hvert kar. Alle fisk var innenfor vektområdet 101-115 gram. Fisken ble fôret med fire forskjellige forsøksfôr, tre kar for hvert fôr. Alle kar hadde utstyr for oppsamling av fôrspill. Faktisk daglig fôrinntak ble brukt for å bestemme mengde fôr tildelt daglig, med en planlagt overføring på inntil 20 %.

Forsøket ble kjørt på saltvann (31,6 ‰) med en gjennomsnittstemperatur på 8.4 °C. Ved forsøksstart lå vanntemperaturen på 8.2 °C, men i løpet av de første 6 ukene gikk vanntemperaturen gradvis nedover til 7.1 °C. På grunn av dårlig fôrinntak, valgte vi å bruke oppvarmet vann resten av forsøksperioden for å få bedre fôrinntak og oppnå planlagt vekst. Temperaturen gjennom den siste perioden lå på 9.9 °C. Forsøket varte i 67 dager. Ved avslutning av forsøket hadde fisken nådd en gjennomsnittsvekt på 242 gram. Ved start og avslutning ble det tatt prøver av hel fisk for kjemisk analyse, 3x5 fisk ved start og 5 fisk fra hvert kar ved avslutning. I tillegg ble 5 fisk fra hvert kar tatt ut og individvekter ble registrert. Fiskene ble åpnet, lever tatt ut og veid, og leverindeks (HSI=hepatosomatisk indeks) ble beregnet.

$$\text{HSI (\%)} = \text{levervekt} / \text{kroppsvekt} * 100$$

Det ble tatt ut lever som ble frosset på flytende nitrogen for senere analyse av genuttrykk og fettprosent.

3.1.10 Beregninger og analyser fra fiskeforsøk

Vekstrate ble beregnet både som SGR (specific growth rate) og TGC (thermal growth coefficient). Følgende formler ble brukt:

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

$$\text{TGC} = (W_{21/3} - W_{11/3}) / ((t_2 - t_1) * T) * 1000$$

der W_1 og W_2 er gjennomsnittsvekt (g) ved start (t_1) og slutt (t_2), og T er gjennomsnittstemperatur i perioden

Forfaktor (FCR= feed conversion ratio) er beregnet som følger:

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

Samleprøver av 5 fisk fra start og fra hvert kar, ble homogenisert før analyser. Homogenat ble analysert for totalfett og fettsyrer.

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.

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

Der F_{a2} er mengde fett eller fettsyre i hel fisk ved avslutning av forsøksperioden, F_{a1} er mengde fett eller fettsyre i hel fisk ved oppstart, og F_{as} 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 forskjellig fôroljer. Ved signifikante forskjeller ($p < 0,05$) ble behandlingene rangert ved bruk av Duncan's multiple range test

3.1.11 Analyse av fettsyresammensetning i celler og fisk

Total lipid ble ekstrahert ved hjelp av en metode beskrevet av Folch et al. (Folch *et al.*, 1957). Kloroformfasen ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass og lipid reløst i kloroform. Methyl estere av fettsyrene ble dannet etter en metode beskrevet av Mason et al. (Mason *et al.*, 1964) og av Hoshi et al. (Hoshi *et al.*, 1973). De ulike fettsyrene ble separert i en 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 i fra arealet under toppen.

3.2 Gjennomføring av prosjektet

Prosjektet har i det store og hele vært gjennomført i henhold til opprinnelige planer beskrevet i prosjektbeskrivelsen, ingen uforutsette problemer underveis. Det ble en liten forsinkelse i prosjektet av to årsaker, henholdsvis forsinket levering av ketolinsyre til celleforsøkene og noe senere oppstart av forsøk med laks enn opprinnelig planlagt grunnet ønske om å starte med rett fiskestørrelse.

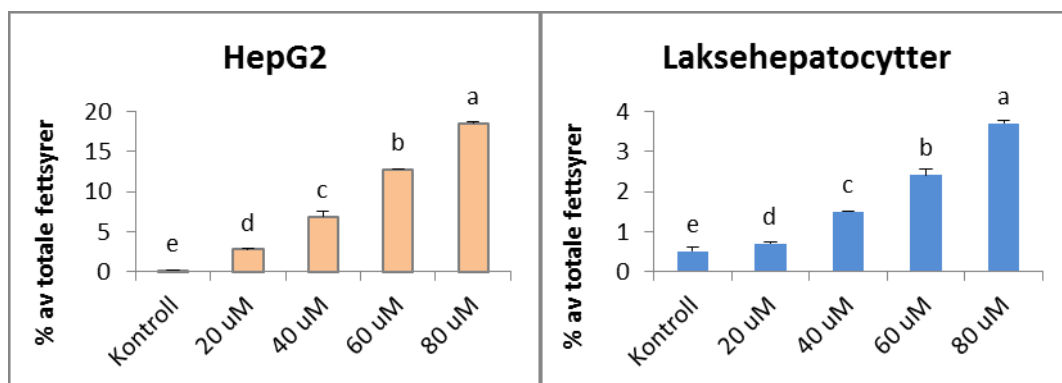
4 Resultat og diskusjon

4.1 Effekt av ketolinsyre på omega-3 fettsyremetabolisme i humane celler og lakseceller.

Hensikten med dette forsøket var å studere hvorvidt leverceller i kultur, fra menneske og laks, endrer kapasiteten til å produsere de langkjedete omega-3 fettsyrene EPA og DHA fra den kortere omega-3 fettsyren 18:3n-3 (ALA) når de inneholder økende mengde ketolinsyre.

For å få celler med økende mengde intracellulært ketolinsyre, ble celler i kultur inkubert med ketolinsyre i dyrkningsmediet over en tidsperiode på 48 timer. Det ble valgt fire ulike doser med ketolinsyre for å få en dose-respons effekt, og dosene ble valgt basert på tidligere observerte plasma nivåer av ketolinsyre. Konsentrasjonen av ketolinsyre lå innenfor fysiologiske nivåer.

Mengden ketolinsyre (% av totale fettsyrer) i cellene økte med økende nivå av denne fettsyren i dyrkningsmediet i begge celletyper (Figur 2). Det ble mer ketolinsyre inkorporert over tid i de humane cellene enn i laksecellene, noe som kan skyldes den høyere dyrkningstemperaturen for de humane cellene, henholdsvis 37°C sammenlignet med 12°C for laksecellene. I tillegg har de humane cellene og laksecellene veldig forskjellig utgangspunkt når det gjelder fettsyresammensetning. Den humane kreftcellelinjen er dyrket over mange passasjer i et vekstmedium rikt på føtalt kalveserum, noe som gjør at disse cellene har en fettsyresammensetning som i stor grad gjenspeiler sammensetning i det føtale kalveserumet. Laksecellene er primærceller, isolert direkte fra laks, og har samme fettsyresammensetning som i levende fisk. Både fettnivå og fettsyresammensetning er kjent å påvirke cellers evne til å ta opp fettsyrer fra dyrkningsmedium, noe som kan være en medvirkende årsak til forskjellene mellom de humane cellene og laksecellene i evnen til å ta opp og deponere ketolinsyre.



Figur 2 Prosent ketolinsyre av totale fettsyrer i HepG2 (humane leverceller) og primære leverceller fra laks. Cellene var inkubert med økende dose ketolinsyre i dyrkningsmedium fra 0 µM til 80µM

4.2 Kapasitet til EPA og DHA syntese

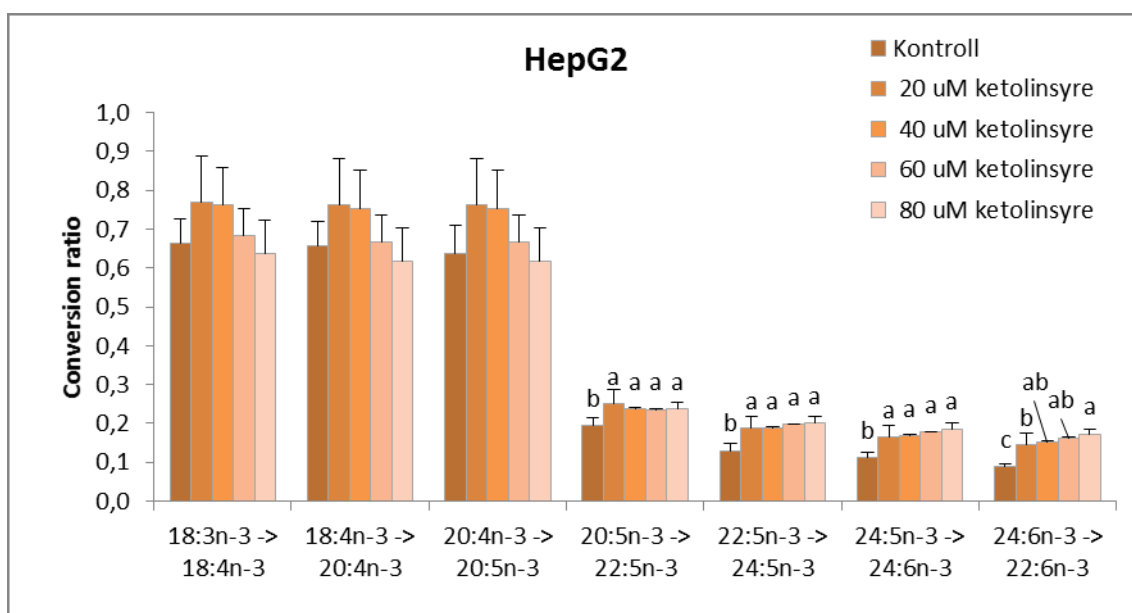
For å studere om økt ketolinsyrenivå i humane leverceller og lakseceller påvirker evnen til å omdanne ALA til EPA og DHA, ble cellene dyrket i medium tilsatt radioaktivt merket 18:3n-3 (ALA) og cellenes evne til å forlenge og desaturere radioaktiv ALA til de radioaktive produktene EPA og DHA, ble analysert. Det ble også analysert for eventuelle andre produkter i synteseveien.

4.2.1 Humane leverceller

De radioaktive fettsyrene ^{14}C -18:3n-3, ^{14}C -18:4n-3, ^{14}C -20:4n-3, ^{14}C -20:5n-3, ^{14}C -24:6n-3, ^{14}C -22:5n-3 og ^{14}C -22:6n-3 ble detektert i de humane levercellene etter inkubering med ^{14}C -18:3n-3. Det var mest igjen av det radioaktive substratet 18:3n-3 i kontrollcellene, noe som tyder på lavere kapasitet i denne gruppen til å metabolisere substratet sammenlignet med de ulike gruppene med økende cellulære nivåer av ketolinsyre.

Ketolinsyre førte til signifikant høyere kapasitet til å produsere EPA og DHA i HepG2 cellene. Det var også en økning i det intermediære produktet 18:4n-3. Nivået av 20:4n-3 ble redusert med økende nivå av ketolinsyre, noe som tyder på økt videre omdanning (forbruk av) dette produktet for videre syntese av 20:5n-3 (EPA). Tilsvarende reduksjon i produktene 24:6n-3 og 22:5n-3 (ikke vist, resultater i supplement) tyder på forbruk av disse for videre syntese til endeproduktet 22:6n-3 (DHA).

Figur 3 gir et indirekte mål på omdanningskapasiteten til de ulike reaksjonstrinnene i syntesen fra ALA til EPA og DHA. Dataene tyder på at ketolinsyre fører til økt kapasitet til elongeringstrinnene fra 20:5n-3 til 24:5n-3. Videre tyder det på økt kapasitet til Δ -6 desaturase trinnet som inngår både i omdanningen fra 18:3n-3 til 18:4n-3 og senere i syntesen fra 24:5n-3 til 24:6n-3. Dataene tyder også på økt kapasitet til det siste trinnet i syntesen, peroxisomal β -oksidasjons kjedeforkorting av 24:6n-3 til 22:6n-3. Samlet tyder dataene på at ketolinsyre stimulerer humane levercellers kapasitet til å produsere EPA og DHA, og flere trinn i synteseveien har trolig økt kapasitet.



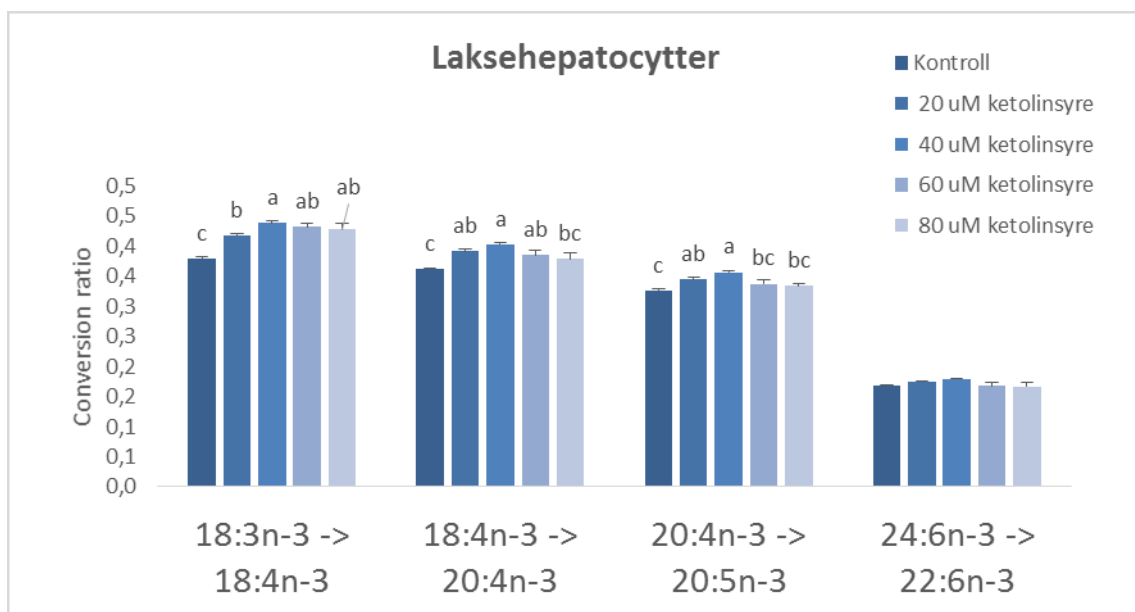
Figur 3 Omdanningskapasiteten til HepG2 for de ulike reaksjonstrinnene i syntesen fra ALA til EPA og DHA

4.2.2 Hepatocytter fra laks

De radioaktive fettsyrene ^{14}C -18:3n-3, ^{14}C -18:4n-3, ^{14}C -20:4n-3, ^{14}C -20:5n-3 og ^{14}C -22:6n-3 ble detektert i leverceller fra laks. Som i humane celler, var det mest av det radioaktive substratet 18:3n-3 i kontrollcellene, noe som viser lavere kapasitet i denne gruppen til å metabolisere substratet sammenlignet med de ulike gruppene med økende cellulære nivåer av ketolinsyre (Figur 2).

Ketolinsyre førte til signifikant høyere kapasitet til å produsere 18:4n-3, 20:4n-3 og 20:5n-3 og tendens til høyere 22:6n-3.

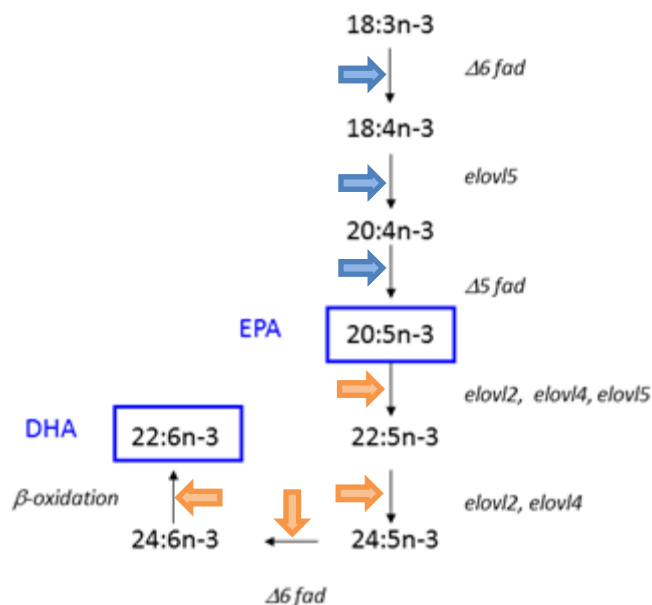
Figur 4 gir et indirekte mål på omdanningskapasiteten til de ulike reaksjonstrinnene fra ALA til EPA og DHA i laksecellene. Dataene tydet på økt aktivitet av de fleste trinn i syntesen, selv om dataene ikke var like tydelig som for de humane cellene. Mindre mengde ketolinsyre ble tatt opp i laksecellene sammenlignet med de humane cellene. I tillegg vil den høyere temperaturen som de humane celler dyrkes i (37°C) sammenlignet med temperaturen som laksecellene dyrkes i (13°C), føre til høyere enzymaktivitet.



Figur 4 Omdanningskapasiteten til de ulike reaksjonstrinnene i syntesen fra ALA til EPA og DHA

4.2.3 Ketolinsyre stimulerer flere trinn i omega-3 synteseveien

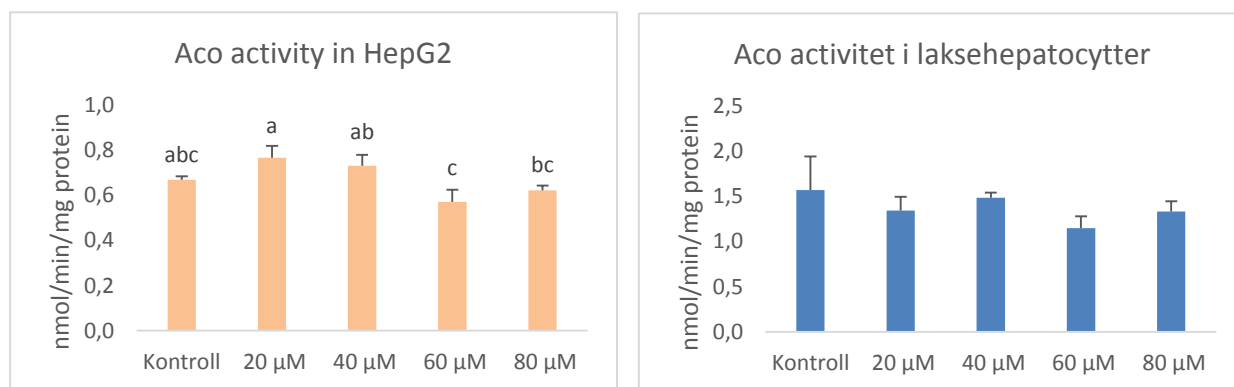
Samlet tyder dataene fra celledforsøkene på at ketolinsyre stimulerer både humane og laksecellers kapasitet til å produsere EPA og DHA. Ulikt opptak av ketolinsyre i de to ulike cellekulturene og dyrking ved ulike temperaturer kan forklare forskjeller i resultater. Basert på omdanningskapasiteten for de ulike trinn i syntesen fra ALA til EPA og DHA viser Figur 5 viser hvilke trinn ketolinsyre stimulerte for hhv. humane leverceller og lakseceller.



Figur 5 Omega-3 fettsyremetabolismen. Basert på omdanningskapasiteten for de ulike trinn i syntesen fra ALA til EPA og DHA er det indikert hvilke trinn som stimuleres av ketolinsyre med oransje piler for humane celler og med blå piler for lakseceller

4.3 Aco aktivitet i celler

Det var ingen signifikant effekt av økende cellulært nivå av ketolinsyre på enzymaktivitet av Acyl-CoA oxidase, som inngår i peroxisomal β -oksydasjon i humane celler, i forhold til kontrollgruppen uten stimulering med ketolinsyre (Figur 6). Det var imidlertid signifikant lavere aktivitet i cellene dyrket med 60 μ M ketolinsyre enn de lavere dosene (20 og 40 μ M). I tillegg var det en svak tendens til økt kapasitet i de humane cellene når cellene ble dyrket i vekstmedium med 20 og 40 μ M ketolinsyre.



Figur 6 Enzymaktivitet av Acyl-CoA oksidase som inngår i peroxisomal β -oksydasjon i humane celler og i lakseceller

4.4 Genuttrykk i humane leverceller og leverceller fra laks

Resultater av analysen er ikke presentert i rapport, men kan opplyses ved henvendelse.

4.5 Immunrespons i humane celler

Resultater av analysen er ikke presentert i rapport, men kan opplyses ved henvendelse.

4.6 Fôringsforsøk med laks

4.6.1 Fettsyresammensetning av forsøksfôr.

I celleforsøkene så vi at ketolinsyre i ren form gav økt kapasitet til å omdanne omega-3 fettsyren 18:3n-3 til de lengre omega-3 fettsyrene EPA og DHA. Det var et videre mål i dette prosjektet å studere om ketolinsyre har den samme stimulerende effekten i levende fisk når den gis som del av en nordatlantisk fiskeolje (sildeolje) i fôret til laksen. Tabell 7 viser fettsyresammensetningen av de 4 ulike forsøksfôrene. Fôr 1 og Fôr 2 var tilsatt to ulike nivåer av søramerikansk fiskeolje (sardinolje) med relativt lave nivåer av ketolinsyre, ca 1% av totale fettsyrer. Fôr 3 og Fôr 4 var tilsatt to ulike nivåer av Nordatlantisk sildeolje rik på ketolinsyre (22:1n-11), henholdsvis ca 11% og 15% av totale fettsyrer. Det ble benyttet en EPAX triglyserid DHA anriket olje for å balansere fôrene til å inneholde ca de samme nivåene av EPA og DHA i de to ulike nivåene av sardinolje og sildeolje. Sardinoljefôrene inneholdt henholdsvis 7.5 og 9.8% av totalfettsyre av EPA + DHA, mens sildeoljefôrene kom litt lavere med 7.2 og 9.1% EPA+DHA. Sardinoljefôrene inneholdt noe høyere nivå av forløperen til EPA og DHA, 18:3n-3 (hhv. 7.6 og 7.1% av totale fettsyrer), sammenliknet med sildeoljefôrene (som inneholdt hhv 5.7 og 4.2% av totale fettsyrer). Laks ble fôret med de ulike diettene i 67 dager.

Tabell 7 Fettsyresammensetning av de fire ulike forsøksfødrene vist som prosent av totale fettsyrer

Prosent av totale fettsyrer	Fôr 1 Sardin 1	Fôr 2 Sardin 2	Fôr 3 Sild 1	Fôr 4 Sild 2
14:0	1,3	1,5	3,9	5,2
16:0	7,6	8,1	9,1	10,5
18:0	2,0	2,1	1,4	1,4
20:0	0,5	0,5	0,4	0,3
22:0	0,3	0,3	0,2	0,1
Sum SFA	12,5	13,3	15,6	18,4
16:1n-7	1,5	1,6	2,0	2,7
18:1n-11	0,0	0,0	0,0	0,0
18:1n-9	46,6	44,4	33,2	24,4
20:1n-9	2,1	2,2	6,3	7,9
20:1n-11	0,3	0,6	1,4	1,9
22:1n-7	0,2	0,2	0,3	0,4
22:1n-11	1,5	1,3	10,8	14,6
24:1n-9	0,3	0,3	0,5	0,6
Sum MUFA	52,5	50,6	54,5	52,5
18:2n-6	16,5	15,6	12,8	9,7
18:3n-6	0,1	0,1	0,1	0,1
20:2n-6	0,1	0,2	0,2	0,2
20:3n-6	0,1	0,0	0,0	0,0
20:4n-6	0,2	0,3	0,1	0,2
22:4n-6	0,1	0,2	0,1	0,1
Sum n-6	17,4	16,6	13,5	10,6
18:3n-3	7,6	7,1	5,7	4,2
20:4n-3	0,1	0,1	0,2	0,4
20:3n-3	0,1	0,0	0,0	0,1
20:5n-3	2,9	3,9	2,8	3,6
22:5n-3	0,5	0,7	0,4	0,5
22:6n-3	4,6	5,9	4,4	5,5
Sum n-3	8,5	10,7	8,0	10,2
Sum EPA+DHA	7,5	9,8	7,2	9,1
Sum PUFA	33,8	27,4	34,8	25,2
Sum andre	2,0	2,7	2,0	3,4

4.6.2 Vekst og fôrutnyttelse.

Det var ingen dødelighet i forsøket, bare en fisk døde. I løpet av forsøksperioden hadde fisken mer enn doblet vekten, og vekstraten var lik for alle fôrtyper (Tabell 8). Siden oljetype var eneste forskjell mellom fôr, var det heller ikke forventet at dette skulle ha signifikant effekt på tilvekst. Mange fôringsforsøk har vist at tilveksten blir lik om man sammenligner forskjellige oljekilder. Vekstrate i dette forsøket, SGR på 1.14 – 1.18 og TGC på 2.46 – 2.57, er innenfor normale verdier.

Tabell 8 Vekst (gjennomsnitt ± standard feil, n=3)

	Fôr 1 Sardin 1	Fôr 2 Sardin 2	Fôr 3 Sild 1	Fôr 4 Sild 2	ANOVA p-verdi
Startvekt, g	109,7 ± 0,2	111,0 ± 1,9	108,3 ± 0,7	110,9 ± 0,6	0,31
Sluttvekt, g	240,8 ± 2,0	240,0 ± 7,6	240,6 ± 4,5	247,1 ± 7,3	0,80
SGR	1,16 ± 0,01	1,14 ± 0,05	1,18 ± 0,03	1,18 ± 0,05	0,82

Leverindeks (HSI) (Tabell 9) var heller ikke signifikant forskjellig mellom gruppene, selv om gjennomsnittsverdiene viser en trend der HSI er lavere i de to sildeoljegruppene. Tabell 9 viser en sterk tendens til at sildeolje i fôret til laks fører lavere fettakkumulering i lever enn bruk av sardinolje (p= 0.08).

Tabell 9 Fettinnhold i lever (%) og leverindeks (HSI) (gjennomsnitt ± standard feil, n=3)

	Sardin 1	Sardin 2	Sild 1	Sild 2	p-verdi
Fett	11,57 ± 1,12 ^a	9,51 ± 1,64 ^{ab}	8,38 ± 1,06 ^{ab}	6,61 ± 0,52 ^b	0,08
HSI	1,45 ± 0,03	1,39 ± 0,06	1,32 ± 0,03	1,30 ± 0,04	0,33

4.6.3 Fettsyreretensjon og fettsyresammensetning i helkropp.

Retensjon er den andelen av mengde næringsstoff spist, og som blir avleiret i fisken til vekst, i den aktuelle perioden (i prosent av mengde spist). For fettsyrer er dette tilsynelatende retensjon siden det er et netto resultat inkludert resultat av metabolisme.

Tabell 10 viser signifikant høyere retensjon av EPA, sum EPA+DHA og 22:5n-3 i Sild 2 sammenlignet med Sardin 2 i helkropp, noe som tyder på at laksen i denne gruppen her har høyere kapasitet til å omdanne 18:3n-3 til EPA og DHA. Dette er i overenstemmelse med funnene fra celleforsøkene. Det var ingen signifikant forskjell i retensjon av ketolinsyre.

Tabell 11 viser fettsyresammensetningen av helkropp i de fire forsøksgruppene. Det var signifikant høyere prosent av EPA, sum EPA+DHA i Sild 2 gruppen sammenlignet med Sardin 2 i helkropp, til tross for litt lavere nivå av disse fettsyrene i fôret. Dette støtter hypotesen om at det høye nivået av ketolinsyre i sildeoljen stimulerer laksens egen kapasitet til å produsere EPA og DHA fra ALA i samsvar med retensjonsstudiene og cellestudiene.

Tabell 10 Retensjon av totalfett, ketolinsyre og EPA+DHA (%) (gjennomsnitt ± standard feil, n=3)

	Diett 1 Sardin 1	Diett 2 Sardin 2	Diett 3 Sild 1	Diett 4 Sild 2	ANOVA p-verdi
Totalfett	75,5 ± 2,7	70,2 ± 3,2	74,2 ± 0,3	69,8 ± 3,1	0,37
22:1n-11	55,2 ± 2,5	49,6 ± 14,7	53,2 ± 0,9	50,9 ± 2,5	0,95
EPA+DHA	85,7 ± 3,0 a	70,2 ± 2,3 b	89,3 ± 0,6 a	80,9 ± 4,7 a	0,01

Tabell 11 Fett, ketolinsyre og EPA+DHA (% av totale fettsyrer) i hel fisk (gjennomsnitt ± standard feil, n=3). Anova er sammenligning mellom forskjellige dietter ved slutt

	Start	Diett 1 Sardin 1	Diett 2 Sardin 2	Diett 3 Sild 1	Diett 4 Sild 2	ANOVA p-verdi
Fett	11,75 ± 0,23	15,18 ± 0,29	15,02 ± 0,45	15,15 ± 0,04	14,85 ± 0,22	0,85
20:1n-11	1,54 ± 0,01	1,06 ± 0,02 ^b	1,00 ± 0,04 ^b	1,29 ± 0,01 ^a	1,35 ± 0,02 ^a	<0,0001
EPA+DHA	13,52 ± 0,07	10,29 ± 0,07 ^c	11,15 ± 0,19 ^b	10,37 ± 0,04 ^c	11,63 ± 0,05 ^a	<0,0001

4.6.4 Genuttrykk i lever

Resultater av analysen er ikke presentert i rapport, men kan opplyses ved henvendelse

5 Konklusjon

Samlet tyder resultatene fra celleforsøkene på at ketolinsyre i ren form stimulerer både humane og laksecellers kapasitet til å produsere EPA og DHA.

Når laks fôres med sildeolje rik på ketolinsyre fører det til høyere retensjon av EPA+DHA i helkropp enn om fisken fôres med søramerikansk sardinolje.

6 Vurdering av mulighetene for videre anvendelse av resultater fra prosjektet og evt. nytteverdi for sjømatnæringen

Resultater fra prosjektet har gitt ny kunnskap som styrker hypotesen om at det høye innholdet av den lange monoumettede fettsyren 22:1n-11 (ketolinsyre) i nordatlantiske fiskeoljer fører til bedret utnyttelse av EPA og DHA i både fisk og menneske. Denne kunnskapen er viktig for marin råvaresektor i Norge og dersom utnyttet kan kunnskapen føre til merverdi på nordatlantiske fiskeoljer.

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

7 Leveranser

Leveranser i henhold til prosjektplan

Rapporter og presentasjoner

- Statusrapport celleforsøk
- Foredrag på Havbrukskonferansen i april 2016 i regi av FHF og NFR
- Sluttrapport
- Prosjektet er valgt ut til muntlig presentasjon på den internasjonale fiskeernæringskonferansen i Idaho Juni 2016
- Det vil utarbeides en vitenskapelig publikasjon i løpet av 2016.

Prosjektet har vært omtalt i pressen, i internettartikler på hjemmesiden til Nofima og på Nofima og NFD sine facebooksider

- Forskning.no: (<http://forskning.no/fisk-mat-og-helse/2015/12/sild-er-enda-sunnere-enn-du-trodde>)
- Artikkel i VG: (<http://www.vg.no/forbruker/mat-og-drikke/kos-deg-med-sild-paa-julebordet-proppfull-av-sunne-fettsyrer/a/23577977/>)
- Norges sildesalgslag: (<https://www.sildelaget.no/44116>),
- Kyst.no (<http://kyst.no/nyheter/silda-er-sunnere-enn-vi-trodde/>)
- Fiskeribladet Fiskaren: (<http://fiskeribladetfiskaren.no/nyheter/?artikkel=44344>),
- Norsk Matmagasin: <http://elskermat.no/blog/sild-er-enda-sunnere-enn-antatt/>
- Dagligvarehandelen: <http://www.dagligvarehandelen.no/2015/sild-er-sunnere-enn-vi-trodde>
- Nofima.no : <http://nofima.no/nyhet/2015/12/silda-er-sunnere-enn-vi-trodde/>
- Nationen: <http://www.nationen.no/naering/fleire-helsefremjande-eigenskapar-ved-sild/>

8 Referanser

- Bremer, J. & Norum, K.R. (1982) Metabolism of very long-chain monounsaturated fatty acids (22:1) and the adaptation to their presence in the diet. *J Lipid Res.* 23. 243-256.
- Dannevig, B.H. & Berg, T. (1985) Endocytosis of galactose-terminated glycoproteins by isolated liver cells of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp Biochem Physiol B.* 82. 683-688.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G.H.S. (1957) A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *Journal of biological chemistry.* 226. 497-509.
- 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. 406-414.
- Mason, M.E., Eager, M.E. & Waller, G.R. (1964) A Procedure for the Simultaneous Quantitative Determination of Glycerol and Fatty Acid Contents of Fats and Oils. *Analytical Chemistry.* 36. 587-590.
- Narce, M., Gresti, J. & Bezdard, J. (1988) Method for evaluating the bioconversion of radioactive polyunsaturated fatty acids by use of reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr.* 448. 249-264.
- Opstvedt, J. (1997) Fish lipids: more than n-3 fatty acids? *Med Hypotheses.* 48. 481-483.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O. & Thomassen, M.S. (2000a) Essential fatty acids in Atlantic salmon: effects of increasing dietary doses of n-6 and n-3 fatty acids on growth, survival and fatty acid composition of liver, blood and carcass. *Aquaculture Nutrition.* 6. 119-127.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O. & Thomassen, M.S. (2000b) Essential fatty acids in Atlantic salmon: time course of changes in fatty acid composition of liver, blood and carcass induced by a diet deficient in n-3 and n-6 fatty acids. *Aquaculture Nutrition.* 6. 109-117.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Masoval, K., Einen, O. & Thomassen, M.S. (2000c) Influence of dietary n-3 fatty acids on the desaturation and elongation of [1-C-14] 18 : 2 n-6 and [1-C-14] 18 : 3 n-3 in Atlantic salmon hepatocytes. *Fish Physiology and Biochemistry.* 23. 151-158.
- Ruyter, B. & Thomassen, M.S. (1999) Metabolism of n-3 and n-6 fatty acids in Atlantic salmon liver: stimulation by essential fatty acid deficiency. *Lipids.* 34. 1167-1176.
- Shepherd, C. J. and A. J. Jackson, *Journal of Fish Biology* (2013) 83, 1046–1066, Global fishmeal and fish-oil supply: inputs, outputs and markets.
- Thomassen, M.S., Helgerud, P. & Norum, K.R. (1985) Chain-shortening of erucic acid and microperoxisomal beta-oxidation in rat small intestine. *Biochem J.* 225. 301-306.

