

Kan forlenget opphold i ferskvann, før overføring til saltvann, påvirke laksens kapasitet til å omdanne 18:3 n-3 til EPA og DHA?

FHF-prosjekt 900770 – delrapport 3

Tone-Kari Østbye, Gerd Marit Berge, Anna Sonesson, Aleksei Krasnov og Bente Ruyter





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 seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

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

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835

Rapport

ISBN: 978-82-8296-269-8 (trykt) ISBN: 978-82-8296-270-4 (pdf) ISSN 1890-579X	
Tittel: Kan forlenget opphold i ferskvann, før overføring til saltvann, påvirke laksens kapasitet til å omdanne 18:3 n-3 til EPA og DHA? FHF-prosjekt 900770 - delrapport 3	Rapportnr.: 9/2015
Forfatter(e)/Prosjektleder: Tone-Kari Østbye, Gerd Marit Berge, Anna Sonesson, Aleksei Krasnov og Bente Ruyter	Tilgjengelighet: Åpen
Avdeling: Ernæring og forteknologi	Dato: 17. mars 2015
Oppdragsgiver: Fiskeri- og Havbruksnæringens Landsforening, Oslo	Ant. sider og vedlegg: 32
Stikkord: EPA, DHA, smoltifisering	Oppdragsgivers ref.: FHF # 900770
Prosjektnr.: 10109	
Sammendrag/anbefalinger: <p>Det overordnede målet med prosjektet var å bidra til økt kunnskap om hvordan genetisk bakgrunn, miljø (ulike lengde i ferskvann før utsett i sjø) og ulik fettsyreprofil i fôr kan påvirke laksens medfødte evne til å produsere og deponere EPA og DHA. Vi benyttet 4 Høy- og 3 Lav-desaturase familier som gjennomgikk to ulike smoltifiseringsregimer (normalt og utsatt) og ble gitt to ulike fôr med lav (25 %RO) eller høy (90 %RO) innblanding av rapsolje (RO) i fôret. Det ble foretatt fire ulike prøveuttak (før, under og etter smoltifisering). Resultatene viste at regulering av EPA og DHA syntese er kompleks og styres blant annet av faktorer som miljø (lysstyring, overføring til saltvann), genetikk og fôr. Laks som gjennomgikk et utsatt smoltifiseringsregime viste bedre kapasitet til syntese av EPA og DHA, enn laks som fulgte normalt smoltifiseringsregime. Laks som ble seinere smoltifisert viste også høyere DHA nivå i filet enn laks som ble smoltifisert ved et tidligere tidspunkt. Genuttrykk av alle desaturasene ble nedregulert av lysstyring, mens overføring til saltvann oppregulerte $\Delta 6fad_b$ og $\Delta 6fad_c$. Lysstyring kan se ut til å hemme enzymaktiviteten av $\Delta 5$ desaturase og stimulere aktiviteten av $\Delta 6$ desaturase. Laks fra de fleste Høy-desaturase gruppene viste i februar-uttaket høyere kapasitet til EPA+DHA syntese enn Lav-desaturase gruppen. Dette viser at familiene som er selektert for høyt genuttrykk av en $\Delta 6$ desaturase ($\Delta 6fad_b$), også har bedre kapasitet til EPA+DHA syntese. Høy innblanding av RO i fôret ga større økning av DHA i filet, enn lav innblanding av RO. Gruppen med 90 %RO i fôret hadde også høyere genuttrykk av alle desaturasene, enn gruppen som fikk 25 %RO i fôret. Dette kan skyldes en inhiberende effekt av DHA i fôret på genuttrykk av desaturasene.</p>	
English summary: <p>The objective of the project was to increased knowledge on how genetic background, smoltification and feed composition affect salmon's innate capacity to produce and dispose of EPA and DHA. Salmon that followed a postponed smoltification regime showed better capacity to synthesize EPA and DHA, than salmon going through a normal smoltification regime. Salmon smoltified at a later stage also showed higher level of DHA in the fillet than salmon smoltified at a normal time point. Gene expression of all desaturases were down-regulated by light treatment, while transfer to saltwater upregulated $\Delta 6fad_b$ and $\Delta 6fad_c$. Light seems to inhibit the enzyme activity of $\Delta 5$ desaturase and stimulate activity of $\Delta 6$ desaturase. Salmon from most of the High-desaturase groups showed in February higher capacity to synthesize EPA + DHA than Low-desaturase groups. These results show that families selected for high gene expression of $\Delta 6$ desaturase ($\Delta 6fad_b$), also have better capacity to synthesize EPA + DHA. Groups fed 90 % RO showed higher gene expression level of all desaturases, than the group fed 25 % RO. This may be caused by an inhibitory effect of dietary DHA on gene expression of desaturases.</p>	

Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn for prosjektet	1
1.2	Omfang og organisering	2
2	Målsetning.....	4
2.1	Overordnet målsetning	4
2.2	Hovedmål og delmål.....	4
3	Material og metode	5
3.1	Fiskens historie	5
3.2	Gjennomføring av forsøk.....	5
3.3	Analysar	8
3.3.1	Fiskevekt og lengde	8
3.3.2	Kloridmålinger	8
3.3.3	Tørrstoff og protein i fôr.....	8
3.3.4	Celleforsøk.....	8
3.3.5	Fett og fettsyresammensetning i muskel	8
3.3.6	Analyse av radioaktive fettsyremetabolitter	8
3.3.7	Genuttrykk.....	9
3.3.8	Statistikk	9
4	Resultat og diskusjon	10
4.1	Fiskevekt	10
4.2	Plasmaklorid	11
4.3	Kapasitet til syntese av EPA og DHA i leverceller	12
4.4	Genuttrykk i lever	15
4.4.1	Genuttrykk av desaturaser	15
4.4.2	Microarray	21
4.5	EPA og DHA i filet.....	24
5	Konklusjon.....	27
6	Nytteverdi.....	28
7	Referanser	29
8	Leveranser	31

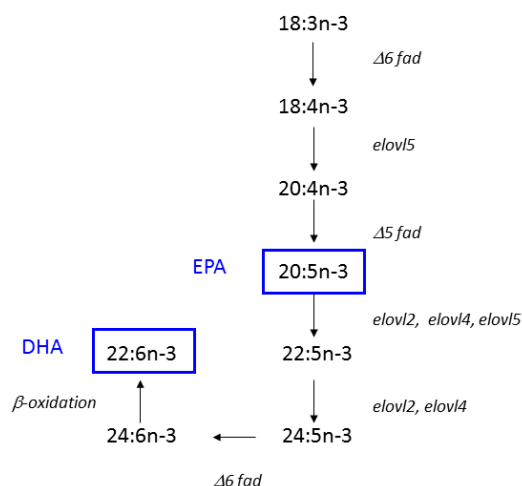
1 Innledning

1.1 Bakgrunn for prosjektet

Marine oljer har tradisjonelt vært den dominerende lipidkilden i fiskefôr. Det er for øvrig ikke nok tilgjengelige marine omega-3 rike oljer på verdensmarkedet til å kunne dekke behovet til akvakulturnæringen de nærmeste 10 årene. I dag blir en stadig større andel av fiskeolje i fôr erstattet med planteoljer, noe som har ført til redusert innhold av omega-3-fettsyrer EPA og DHA i laksefilet.

Laks har evnen til å omdanne 18:3n-3 fra planteolje til EPA and DHA. Flere studier har imidlertid vist at omdanningen er begrenset og at laksens behov for essensielle fettsyrer ikke kan oppfylles av 18:3n-3 alene, men krever EPA og DHA i dietten (Bell, M. V., Dick, J. R., & Porter, A. E. A. 2001; Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O., & Thomassen, M. S. 2000; Ruyter, B., Rosjo, C., Grisdale-Helland, B., Rosenlund, G., Obach, A., & Thomassen, M. S. 2003; Ruyter, B. & Thomassen, M. S. 1999; Tocher, D. R., Bell, J. G., Dick, J. R., Henderson, R. J., McGhee, F., Michell, D. et al. 2000). Det er også vist at evnen til å omdanne 18:3n-3 til EPA og DHA induseres av planteolje i dietten (Moya-Falon, C., Thomassen, M. S., Jakobsen, J. V., & Ruyter, B. 2005). Noen studier har vist at omdanningen er høyere i ferskvannsfasen før smoltifisering, enn senere i post-smolt fasen i saltvann (Bell, M. V. et al. 2001), og videre at kapasiteten for omdanning av 18:3n-3 til EPA og DHA er spesielt lav under smoltifisering (Ackman, R. G. & Takeuchi, T. 1986). Årsaken til disse endringene i EPA og DHA syntese under og etter smoltifisering er ikke kjent.

Omega-3 fettsyrer er viktige i en rekke biologiske funksjoner i kroppen, som essensielle komponenter i cellemembraner og som forløpere til bioaktive molekyler som er involvert i reguleringen av kroppens homeostase og helse (Montero, D. & Izquierdo, M. 2015; Torstensen, B. E., Ruyter, B., Sissener, N., Østbye, T., Waagbø, R., Jørgensen, S. M. et al. 2013). Biosyntesen av omega-3 fettsyrer (Figur 1) ble først beskrevet for pattedyr (Sprecher, H. 1981), og senere for laks (Buzzi, M., Henderson, R. J., & Sargent, J. R. 1997; Monroig, O., Tocher, D. R., & Navarro, J. C. 2013).



Figur 1 Biosyntesen av EPA og DHA fra 18:3n-3. EPA og DHA syntetiseres fra 18:3n-3 via flere trinn som involverer desaturaser ($\Delta 6$ og $\Delta 5$ desaturaser) og elongaser, i tillegg til et trinn med kjedeforkorting ved peroxisomal β -oksidasjon.

Laksens evne til å syntetisere EPA og DHA fra 18:3n-3 er avhengig av aktive desaturase og elongase enzymer i tillegg til et trinn med kjedeforkorting av 24:6n-3 ved peroksisomal β -oksidasjon. De relative

aktiviteter av disse enzymene bestemmer de relative mengder av EPA og DHA som dannes (Monroig, O., Tocher, D. R., Hontoria, F., & Navarro, J. C. 2013; Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O., & Thomassen, M. S. 2000; Ruyter, B. et al. 2000). En rekke faktorer er vist å påvirke aktiviteten til de ulike enzymene. Eksempler på dette kan være ernæring (oljekilder), genetikk, miljø (temperatur, lys og saltholdighet i vann), hormonelle og fysiologiske faktorer (smoltifisering). Flere studier har vist at høye nivåer av fiskeolje i fôret hemmer enzymene som er involvert i syntesen, noe som resulterer i en redusert kapasitet for produksjon av EPA og DHA (Kjaer, M. A., Todorovic, M., Torstensen, B. E., Vegusdal, A., & Ruyter, B. 2008; Sanden, M., Stubhaug, I., Berntssen, M. H. G., Lie, O., & Torstensen, B. E. 2011; Thomassen, M. S., Rein, D., Berge, G. M., Østbye, T.-K., & Ruyter, B. 2012). EPA og DHA innholdet i muskelen er ikke bare avhengig av evnen til å syntetisere EPA og DHA fra 18-3n-3, men også transport, deponering, mobilisering, oksidasjon i andre vev og organer. I laks er det identifisert en $\Delta 5$ desaturase ($\Delta 5fad$), men flere former av $\Delta 6$ desaturasen; $\Delta 6fad_a$, $\Delta 6fad_b$ og $\Delta 6fad_c$ (Hastings, N., Agaba, M. K., Tocher, D. R., Zheng, X. Z., Dickson, C. A., Dick, J. R. et al. 2004; Monroig, O., Zheng, X., Morais, S., Leaver, M. J., Taggart, J. B., & Tocher, D. R. 2010; Zheng, X., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Bell, J. G., & Teale, A. J. 2005). $\Delta 6$ desaturase variantene har i laks vist ulikt genuttrykk i ulike vev og som respons på ulik sammensetning i fôret (Monroig, O. et al. 2010; Thomassen, M. S. et al. 2012; Zheng, X. et al. 2005).

I NFR-prosjektet «Towards a sustainable salmonid aquaculture – Salmon as a net producer of n-3 fatty acids» produserte vi laksefamilier der foreldre ble valgt ut fra familier med høyt eller lavt uttrykk av en $\Delta 6$ desaturase ($\Delta 6fad_b$). Dette er et nøkkelenzym i omdanning av plante-omega-3 fettsyrer til EPA og DHA. Avkom fra disse Høy- og Lav-desaturase familiene ble benyttet i dette delprosjektet for å øke kunnskapen om hvordan genetisk bakgrunn, miljø (ulike lengde i ferskvann før utsett i sjø) og ulik fettsyreprofil i fôr kan påvirke regulering av ulike desaturaser og laksens medfødte evne til å produsere og deponere EPA og DHA.

1.2 Omfang og organisering

Prosjektgruppa besto i utgangspunktet av involverte forskere fra Nofima, og representanter fra SalmoBreed og BioMar som begge har vært aktive prosjektdeltagere. Prosjektleder, Gerd Marit Berge, har vært ansvarlig for gjennomføring av prosjektet.

Styringsgruppe for prosjektet ble oppnevnt av FHF, og har bestått av følgende medlemmer:

Arne Schei	Lerøy Seafood Group
Eldar Bendiksen	Salmar
Øyvind Oaland	Marine Harvest
Tommy Hansen	Nordlaks
Kjell Maroni	FHF (observatør/kontaktperson FHF)

Prosjektgruppa har bestått av følgende personer:

Gerd Marit Berge	Nofima
Bente Ruyter	Nofima
Tone-Kari Østbye	Nofima
Marte Avranden Kjær	Nofima

Anna Sonesson

Trygve Sigholt

Håvard Bakke

Nofima

BioMar

SalmoBreed

2 Målsetning

2.1 Overordnet målsetning

For oppdrettsnæringen er det grunnleggende viktig å finne de mest effektive måtene å utnytte den begrensede tilgangen på EPA og DHA. Det er mange faktorer som kan påvirke laksens innhold av disse viktige fettsyrene i filet, og det er viktig å vite hvor i livssyklus man skal sette inn ressursene for å få mest mulig EPA og DHA i fisken. Kan man påvirke utnyttelsen av EPA og DHA gjennom å optimalisere fettsyreprofil i fôr? Er det mulig å avle på fisk med bedre utnyttelse av omega-3 fettsyrer? Kan man utnytte laksens medfødte evne til å omdanne plante-omega-3 fettsyrer til EPA og DHA? Er det noen faser i fiskens liv som er viktigere enn andre med tanke på forsyning og utnyttelse av EPA og DHA?

Ny kunnskap rundt disse spørsmålene kan ha verdi for næringen på flere ulike måter. Bærekraft og ressursutnyttelse er viktig i seg selv, og et grunnlag for godt omdømme. Dersom man kan produsere mer fisk av samme kvalitet uten høyere forbruk av begrensede ressurser, vil det ha et klart positivt økonomisk potensial. Dyrevelferd er et felt som ser ut til å komme mer og mer i fokus, om det viser seg at både genetisk seleksjon og riktigere bruk av fôrråvarer kan brukes målrettet for å bedre fiskens helse, vil dette være positivt.

Det overordnede målet med prosjektet var å bidra til økt kunnskap om hvordan genetisk bakgrunn, miljø (ulike lengde i ferskvann før utsett i sjø) og ulik fettsyreprofil i fôr kan påvirke laksens medfødte evne til å produsere og deponere EPA og DHA.

Med bakgrunn i dette delprosjektet er det levert et faktaark med tittel «Effekt på omega-3 i filet ved sen overføring fra ferskvann til sjøvann», og resultater fra prosjektet er presentert ved konferanser nasjonalt og internasjonalt.

2.2 Hovedmål og delmål

Hovedmål: Undersøke hvordan samspill mellom miljø (saltvann/ferskvann) og genetisk bakgrunn kan påvirke kapasiteten til å omdanne 18:3n-3 til EPA og DHA.

Delmål 1: Beskrive fettsyreprofil og genuttryksprofil i laks som har gått i ferskvann opp til 400 gram sammenlignet med laks som har blitt overført til sjøvann ved 80-100 gram.

Delmål 2: Identifisere mulige samspill mellom genetisk bakgrunn og miljø (saltvann/ferskvann) på fettsyreprofil og genuttryksprofil i laks opp til 400 gram.

Delmål 3: Identifisere kapasitet til å omdanne 18:3n-3 til EPA og DHA i laks på forskjellige stadier i forskjellige miljø (saltvann/ferskvann) ved hjelp av *in vitro* forsøk.

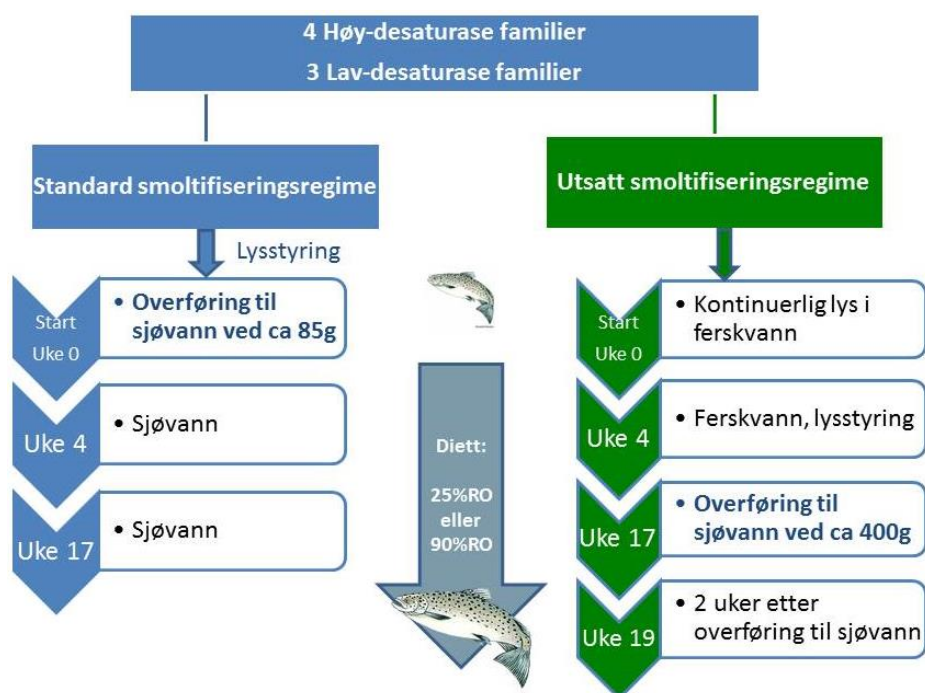
3 Material og metode

3.1 Fiskens historie

Fiskematerialet som ble brukt i forsøk var fullsøskengrupper (familier) fra SalmoBreed AS, produsert innenfor NFR-prosjektet «Towards a sustainable salmonid aquaculture – Salmon as a net producer of n-3 fatty acids». Foreldrefisk var valgt ut på bakgrunn av genuttrykksanalyser av en $\Delta 6$ desaturase (*Δ6fad_b*) i 1000 individer fordelt på ca 100 familier. Foreldrefisk ble valgt ut fra familier med enten høyt eller lavt gjennomsnittlig uttrykk av $\Delta 6b$ -desaturase-genet. Til sammen 9 nye familier ble produsert, 5 Høy-desaturase og 4 Lav-desaturase familier. Alle familiene ble holdt under like vilkår i småskala klekkebakker på samme måte som de andre familiene fra SalmoBreed's familieproduksjon, fram til startfôring. Sju av familiene ble startfôret med kommersielt fôr. Av de 7 familiene som ble startfôret med kommersielt fôr, var det 4 Høy- og 3 Lav-desaturase familier. Fisk fra alle disse familiene ble brukt inn i Delprosjekt 3 – Saltvann og Ferskvann.

3.2 Gjennomføring av forsøk

Fisk fra de syv familiene (4 Høy- og 3 Lav-desaturase familier) ble likt fordelt i to grupper. Fisken var merket med PIT-tags på forhånd. Alle familiegrupper ble delt i to, og gitt forskjellig miljø fram mot forsøksstart (uke 0, oktober 2012). En gruppe ble holdt på kontinuerlig lys, mens den andre ble satt på et standard lysstyringsregime for å indusere smoltifisering (12 timer lys – 12 timer mørke i ca 6 uker, deretter 24 timer lys i ca 360 døgngrader). Figur 2 viser skjematisk gangen i forsøket.



Figur 2 Forsøksdesign, skematisk oversikt over gangen i forsøket.

Ved en gjennomsnittsvikt på 85 gram ble laksen som fulgte standard lysstyringsregime overført til sjøvann. På dette tidspunktet ble forsøket startet, og prøver ble tatt fra begge grupper (uke 0, oktober 2012). Fisken som hadde gått på kontinuerlig lys hele tiden, var noe større ved start, gjennomsnittsvikt var 125 gram. Etter forsøksstart ble denne gruppen satt på et lysstyringsregime som skulle koordinere

smoltifiseringsprosessen (sakte reduksjon av lysdag over 7 uker, til 12 timer mørke som ble holdt en uke, deretter direkte over på 24 timer lys), og etter totalt 17 uker ble gruppen med utsatt smoltifisering overført til sjø. Det ble tatt prøver av alle grupper ved start (oktober 2012), etter 4 uker (november 2012) og etter 17 uker (februar 2013). To uker etter at gruppen med utsatt smoltifisering ble overført til sjøvann (19 uker etter forsøksstart), ble det tatt et siste uttak av denne gruppen (mars 2013). Laksen ble gitt standard kommersielt fôr fram mot forsøksstart ved uke 0, deretter ble fisken overført to ulike fôringsgrupper med ulikt nivå av EPA og DHA i fôret, 25 % rapsolje (RO) og 90 %RO (Tabell 1 og Tabell 2).

Ved hvert prøveuttak ble tatt vevsprøver fra lever til genuttryksanalyse og isolert hepatocytter til celleforsøk for analyse av syntesekapasitet av EPA og DHA. Ved forsøksstart uke 0 (oktober 2012) og i uke 17 (februar) ble det tatt muskelfilet til måling av fettsyresammensetning. I tillegg ble det tatt prøver av muskel for å sikre materiale til flere analyser i ettertid.

Tabell 1 Kjemisk innhold, EPA + DHA (g/100g), n-3/n-6 ratio i fôr fra ca 80 gram til ca 400 gram fiskestørrelse.

Fôr	25 %RO	90 %RO
EPA + DHA (g/100g)	5.4	1.7
Tørrstoff	93.0	92.9
Fett	27.1	27.6
Protein	43.9	43.3
Aske	8.0	8.0

Tabell 2 Fettsyresammensetning (% av total fettsyre) av fôr, 25%RO og 90%RO, brukt i forsøk fra ca 80 gram til ca 400 gram.

Diet	25%RO	90%RO
14:0	5.7	1.5
16:0	14.1	7.3
18:0	3.1	2.6
20:0	0.4	0.5
22:0	0.2	0.3
24:0	0.2	0.1
Sum SFA ¹	24.5	12.7
16:1n-7	6.9	1.8
17:1n-7	1.1	0.3
18:1n-11	1.6	
18:1n-9	19.7	45.9
18:1n-7	2.9	2.3
20:1n-11	1.8	0.5
20:1n-9	1.4	1.9
20:1n-7	0.3	0.1
22:1n-11	0.7	0.1
24:1n-9	0.4	0.2
Sum MUFA ²	37.5	53.4
18:2n-6	7.1	17.3
18:3n-6	0.2	0.1
18:3n-4	0.1	0.1
18:3n-3	2.8	7.5
18:4n-3	0.1	0.0
20:3n-6	0.1	0.0
20:4n-3	0.2	0.0
20:4n-6	0.8	0.2
20:5n-3	12.9	4.2
22:5n-3	1.5	0.4
22:6n-3	9.2	2.7
Sum PUFA ³	35.3	32.7
Sum EPA og DHA	22.1	6.9
n-3/n-6 ratio	3.2	0.8

¹ Includes 15:0, 17:0

² Includes 14:1n-5, 15:1, 16:1n-9, 16:1n-5, 16:3n-4

³ Includes 16:2n-6, 16:2n-3

3.3 Analyser

3.3.1 Fiskevekt og lengde

Vekt og lengde ble registrert for all fisk ved forsøksstart uke 0 (oktober 2012) og uke 17 (februar 2013). Ved de andre uttakene (uke 4 og uke 19) ble kun prøvefisken veid og målt.

3.3.2 Kloridmålinger

Kloridnivå i plasma ble målt ved alle uttakene for vurdering av smoltifiseringstatus. Det ble analysert kloridnivåer i 6 fisk per familie per smoltregime ved forsøksstart og i 6 fisk per familie per fôr per smoltregime ved de andre uttakene. Kloridnivå ble bestemt ved bruk av Chloride Analyser, modell 926S (Sherwood Scientific Ltd, Cambridge, England).

3.3.3 Tørrstoff og protein i fôr

Ved bestemmelse av tørrstoff ble prøven tørket til konstant vekt ved 105°C. Total mengde nitrogen ble bestemt ved hjelp av Kjeltex Auto System (Tecator, Höganäs, Sweden), og råprotein i fôr ble beregnet som total N * 6,25.

3.3.4 Celleforsøk

Leverceller ble isolert fra Atlantisk laks i henhold til metode beskrevet av Dannevig og Berg (Dannevig, B. H. & Berg, T. 1985). Etter isolering ble cellene filtrert gjennom et 100 µM nylon filter. Cellene ble vasket tre ganger i L-15 medium 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 over natt og deretter tilsatt vekstmedium med 2 % føtalt kalveserum og 7 µM linolensyre ¹⁴C-18:3n-3. Den radioaktivt merkede fettsyren ble tilsatt som et natriumsalt bundet til bovint serum albumin (BSA) (i forholdet 1:2.7). Cellene ble inkubert ved 13°C 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.

3.3.5 Fett og fettsyresammensetning i muskel

Total lipid ble ekstrahert ved hjelp av en metode beskrevet av Folch et al. (Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. 1957). Kloroformfasen ble dampet inn til tørrhet under nitrogengass og lipidet reløst i kloroform. Methyl estere av fettsyrene ble dannet etter en metode beskrevet av Mason og Waller (Mason, M. E. & Waller, G. R. 1964) og av Hoshi et al. (Hoshi, M., Williams, M., & KISHIMOTO, Y. 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.

3.3.6 Analyse av radioaktive fettsyremetabolitter

Lipider fra hepatocytter inkubert med ¹⁴C-18:3n-3 ble ekstrahert ifølge Folch et al. (Folch, J. et al. 1957) og fettsyresammensetningen av cellene ble bestemt med reversert fase høytrykks-væskekromatografi som beskrevet av Narce et al. (Narce, M., Gresti, J., & Bezard, J. 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 μ m 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) (Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951; Peterson, G. L. 1977). Absorbansen ble lest av etter 30 minutters inkubering ved hjelp av Spectrostar Nano plateleser fra BMG LABTECH GmbH (Ortenberg).

3.3.7 Genuttrykk

RNA ble isolert ved bruk av PureLink™ Pro 96 RNA Purification Kit med On-column DNase Digestion (Invitrogen, Carlsbad, USA). Konsentrasjon og renhet av RNA ble vurdert med NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Nano Drop Technologies, USA) og Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, CA, USA) ble benyttet for å syntetisere cDNA. Kvantitativ PCR ble utført med SYBR Green-I Master (Roche Applied Science, Germany). En standard kurve ble inkludert for hvert primerpar for å evaluere primer effektivitet. PCR reaksjonen ble kjørt på LightCycler480 (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Relativt genuttrykk ble beregnet ved hjelp av $\Delta\Delta C_t$ metoden (Pfaffl, M. W. 2004). Transkriptomikk analyse ble utført med oligonukleotid microarray Atlantic salmon 15 k SIQ6 (GEO Omnibus GPL16555). Microarrayene ble laget av Nofima (Krasnov, A., Timmerhaus, G., Afanasyev, S., & Jorgensen, S. M. 2011) og produsert av Agilent Technologies. Individuelle leverprøver ble merket med Cy5 og hybridisert til en samleprøve av alle individer og merket med Cy3; totalt 40 microarray ble benyttet. RNA amplifisering, merking og fragmentering ble utført med Two-Colour Low Input Quick Amp Labelling kit og Gene Expression Hybridization kit i henhold til produsentens instruksjoner (Agilent Technologies). Mengden totalRNA i hver reaksjon var 100 ng. Hybridisering over natt (17 timer, 65 °C, og rotasjonshastighet på 10 rpm) ble utført i en ovn (Agilent Technologies). Slidene ble vasket med Gene Expression Wash Buffers 1 og 2 og scannet med en GenePix 4100A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) med 5 μ m oppløsning. GenePix Pro software (version 6.1) ble brukt for å knytte spot til rutenett, ekstrahering og kvantifisering. Test av spot kvalitet ble utført med GenePix flagg. Nofima's bioinformatikpakke STARS (Krasnov, A. et al. 2011) ble benyttet til data prosessering. Differensielt uttrykte genes (DEG) ble selektert: $\log_2\text{-ER} > |0.8|$ (1.75-fold) og $p < 0.05$ (t-test).

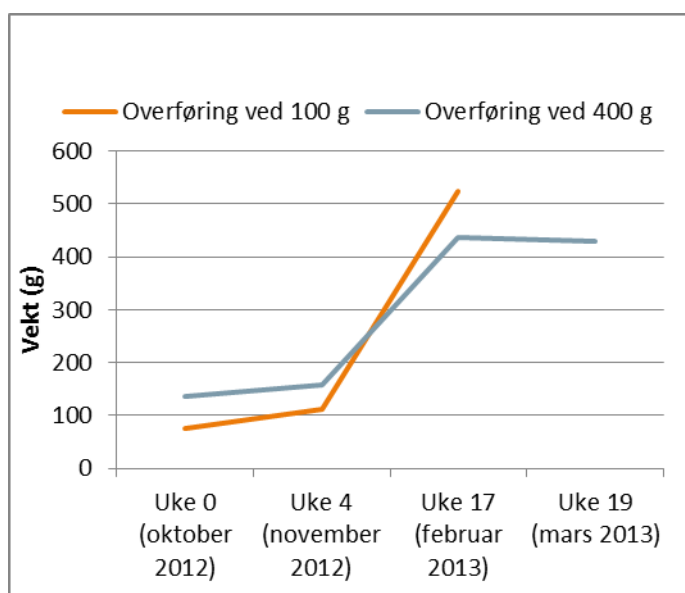
3.3.8 Statistikk

Signifikante forskjeller ble testet med en-veis anova på all data ved hjelp av Unistat (London, England). Signifikansnivå var på $p < 0.05$.

4 Resultat og diskusjon

4.1 Fiskevekt

Ved forsøksstart (uke 0) hadde laksen som gjennomgikk normalt lysregime og overføring til saltvann, en lavere vekt enn laksen som ble overført til saltvann ved et senere tidspunkt (Figur 3, Tabell 3). Lysstyring som forberedelse til smoltifisering medfører reduksjon i veksten blant annet pga redusert fôropptak. All fisk som ble overført til saltvann i uke 0 (oktober 2012) hadde en snittvekt på 85 gram, mens gjennomsnitt av kun prøvefisken var 76 gram. Etter uttak i uke 4 (november 2012) ble gruppen med utsatt smoltifisering satt på lysstyring, noe som kanskje kan forklare en lavere vekt i uke 17 enn laksen som ble overført til saltvann før 100 gram (Figur 3). Laks som ble gitt fôr med det høyeste nivå av EPA og DHA (5.4 g/100g) (25 %RO) hadde høyere vekt enn laksen som fikk det laveste nivået (1.7 g/100g) (90 %RO) ved alle tidspunkt med unntak av uke 4 (november 2012) hvor gruppene med sein smoltifisering hadde lik vekt.



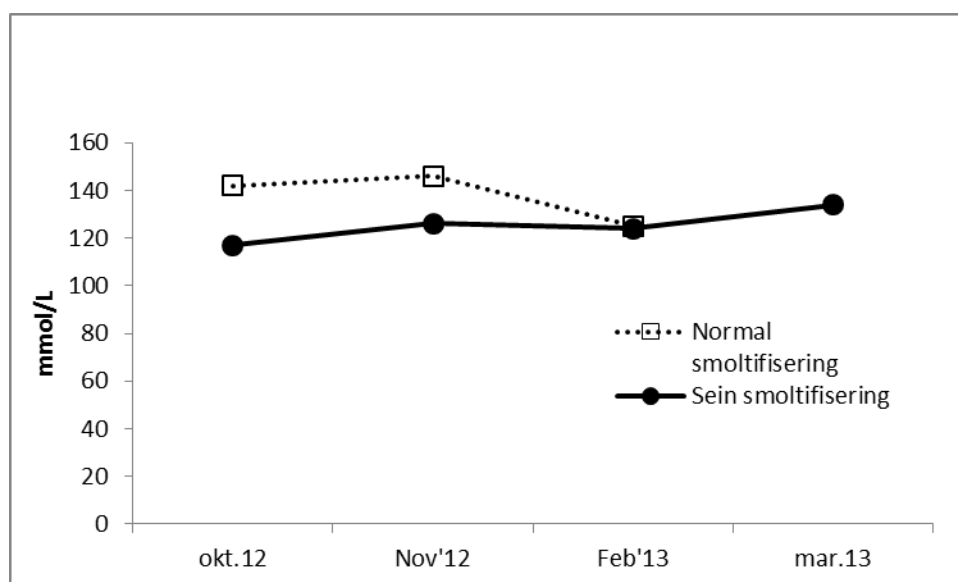
Figur 3 Vektutvikling for laks som gjennomgikk normal og sein smoltifisering.

Tabell 3 Gjennomsnittsvekt til prøvefisken ved de ulike prøveuttakene. Data er vist med standardfeil.

		# Fisk	Vekt (g)	Lengde (cm)
Uke 0 (oktober 2012)	Gjennomsnitt	98	106 ± 39	20 ± 2
	Normal smoltifisering	49	76 ± 14	19 ± 1
	Sein smoltifisering	49	136 ± 16	22 ± 2
Uke 4 (november 2012)	Gjennomsnitt	168	135 ± 34	23 ± 2
	Normal smoltifisering, 90% RO	42	106 ± 17	21 ± 1
	Sein smoltifisering, 90% RO	42	159 ± 28	24 ± 1
	Normal smoltifisering, 25% RO	42	115 ± 18	22 ± 1
	Sein smoltifisering, 25% RO	42	159 ± 30	24 ± 1
Uke 17 (februar 2013)	Gjennomsnitt	204	481 ± 86	33 ± 2
	Normal smoltifisering, 90% RO	51	512 ± 61	33 ± 1
	Sein smoltifisering, 90% RO	51	426 ± 77	32 ± 2
	Normal smoltifisering, 25% RO	51	525 ± 72	34 ± 2
	Sein smoltifisering, 25% RO	51	448 ± 84	32 ± 2
Uke 19 (mars 2013)	Gjennomsnitt	102	429 ± 79	33 ± 2
	Sein smoltifisering, 90% RO	51	419 ± 86	32 ± 2
	Sein smoltifisering, 25% RO	51	439 ± 70	33 ± 2

4.2 Plasmaklorid

Nivåene for plasmaklorid i laksen som smoltifiserte som normalt eller ved sein smoltifisering lå alle innenfor normale verdier (Figur 4). Plasmanivå av klorid gir et bilde på fiskens evne til å skille ut salter og derigjennom en indikasjon for når smolten er klar for å overføres til saltvann.



Figur 4 Plasmaklorid nivå (mmol/L) i laks som gjennomgikk normalt eller seint smoltifiseringsregime ved fire tidspunkt (oktober 2012 til mars 2013).

4.3 Kapasitet til syntese av EPA og DHA i leverceller

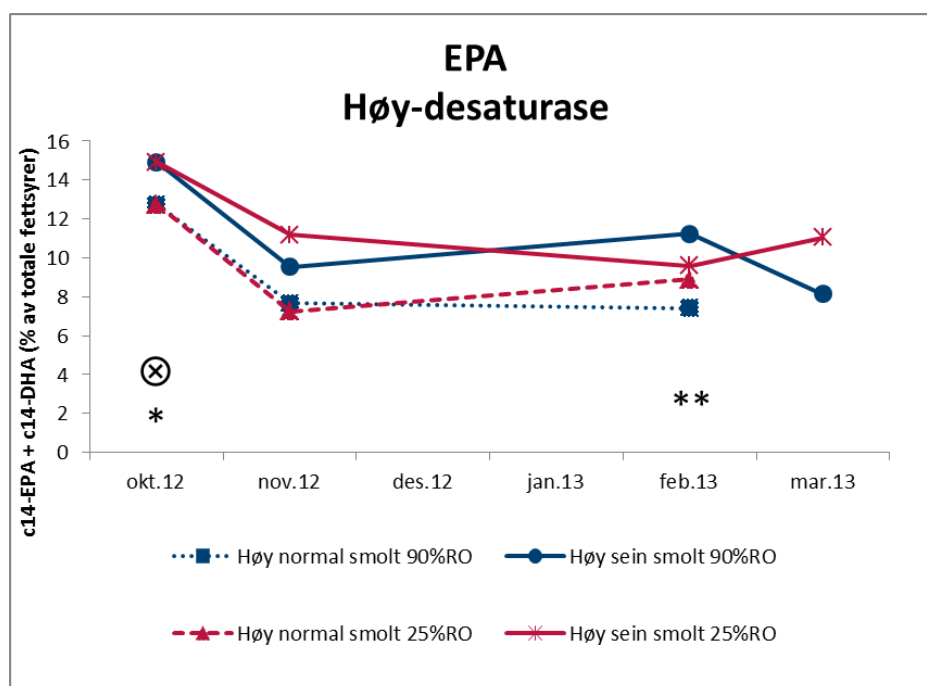
Alle laksegrupper, uavhengig av diett, genetikk og smoltifiseringsregime, viste reduksjon i kapasitet til syntese av EPA og DHA (for DHA med unntak av Høy-desaturase, 25 %RO og sein smoltifisering) fra oktober til november 2012 (Figur 5 - Figur 7). I andre studier (Bell, J. G., Tocher, D. R., Farndale, B. M., Cox, D. I., McKinney, R. W., & Sargent, J. R. 1997; Tocher, D. R. et al. 2000) er det vist at laks har en forberedende tilpasning til parr-smolt overgang ved økning av fettsyredesaturerings- og elongeringsaktivitet i leveren, opp mot 6 måneder før overgang til saltvann. Ved overføring til saltvann er det vist redusert aktivitet av disse prosessene, men reguleringsmekanismen er ikke fullstendig kjent. Reguleringen av fettsyredesaturering og elongering er antatt å være under miljø og genetisk kontroll. Våre resultater tyder på at lysstyring og overføring til saltvann ikke alene er de avgjørende faktorene for den observerte reduksjonen i EPA og DHA syntese, siden laksen som ble satt på smoltifiseringsregime ved et seinere tidspunkt og fikk fôr med 25 %RO, ikke viste redusert EPA og DHA syntese. Ny diett som ble introdusert i oktober 2012 med hhv. 25 %RO og 90 %RO i fôret kan imidlertid ha påvirket kapasiteten til syntese av EPA og DHA.

I oktober 2012 ble det syntetisert mindre EPA i laksen som fulgte normalt smoltifiseringsregime, enn i gruppen med utsatt smoltifisering (Figur 5). Ved samme tidspunkt viste imidlertid laksegruppene som har gjennomgått normal smoltifiseringsregime bedre kapasitet til syntese av DHA enn laksen med utsatt smoltifisering (Figur 6). Dette kan tyde på at lysstyring eller hele smoltifiseringsprosessen (som lyssignalet skal indusere) hemmer $\Delta 5$ desaturasen, som er ansvarlig for omdanningen av 20:4n-3 til EPA, og stimulerer $\Delta 6$ desaturasen, som er essensiell i disse siste trinnene i syntesen av DHA.

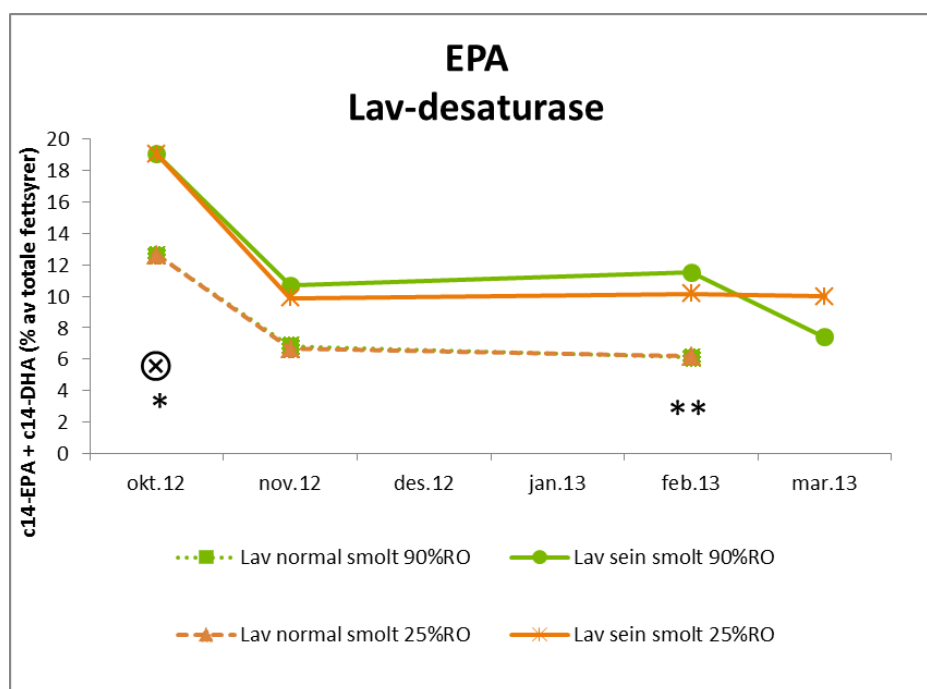
Gjennom hele forsøksperioden viste gruppen som smoltifiserte seint, både for Høy- og Lav-desaturase gruppen, høyere kapasitet til syntese av EPA (Figur 5). Dette kan tyde på at forlenget opphold i ferskvann muliggjør opprettholdelse av den naturlig høye kapasiteten til EPA syntese som laksen har før migrering ut i sjøvann. Syntesen av DHA var derimot høyere i den normalt smoltifiserte laksen i oktober, før overføring til saltvann, men kapasiteten avtok for de fleste grupper etter overføring til saltvann. Den seint smoltifiserte laksen som ble fôret med lav innblanding av RO (25 %RO) klarte imidlertid å opprettholde eller bedre kapasiteten til DHA syntese.

Høy-desaturase gruppen viste etter oktober-uttaket (med unntak av februar-uttaket for sein smolt fôret med 25 %RO) høyere kapasitet til EPA+DHA syntese enn Lav-desaturase gruppen (Figur 7). Dette viser at familiene selektert for høyt genuttrykk av en $\Delta 6$ desaturase (*Δ6fad_b*), også har bedre kapasitet til EPA+DHA syntese.

A)

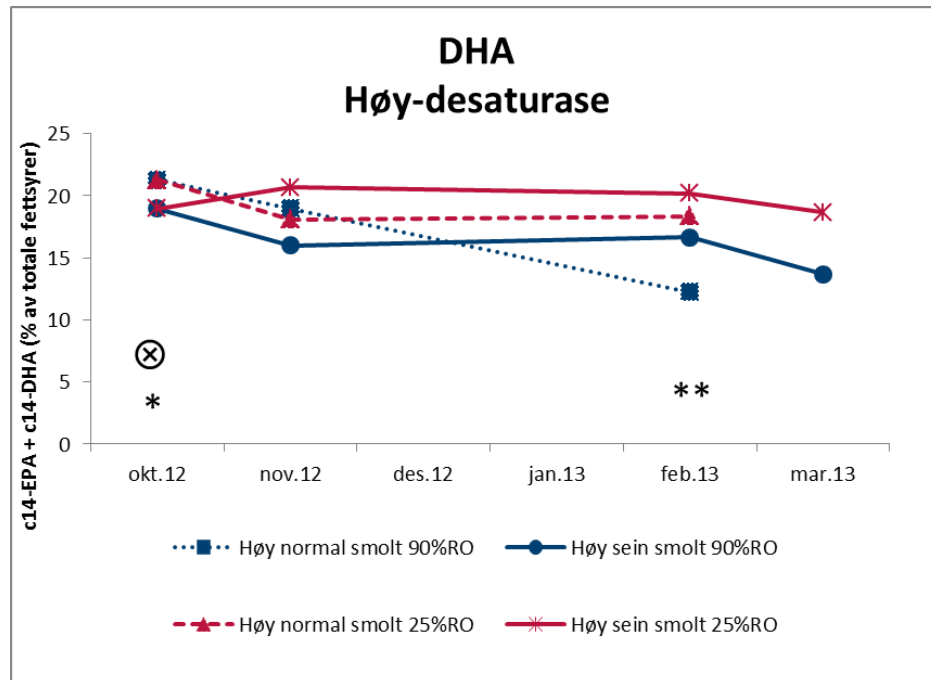


B)

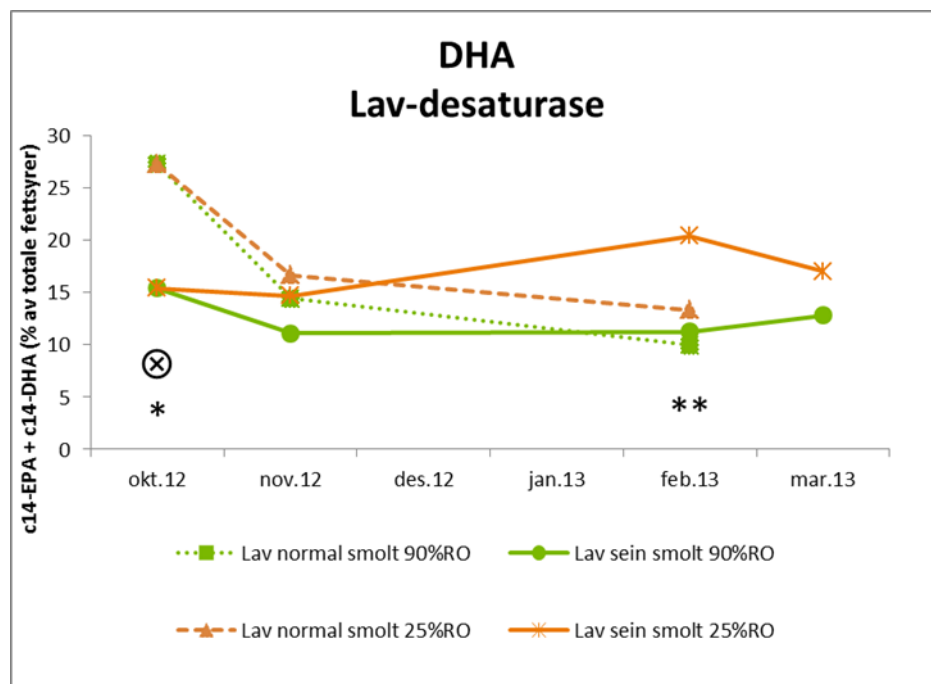


Figur 5 Cellulært nivå av 14C-20:5n-3 syntetisert fra 14C-18:3n-3 i hepatocytter isolert fra A) Høy- og B) Lav-desaturase familiene som fôret med 25 % eller 90 % RO i fôret og smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Overføring til saltvann ved normalt tidspunkt er indikert med * og for seint tidspunkt med **. ⊗indikerer tidspunkt for introduksjon av diett med 25 % eller 90 % RO i fôret.

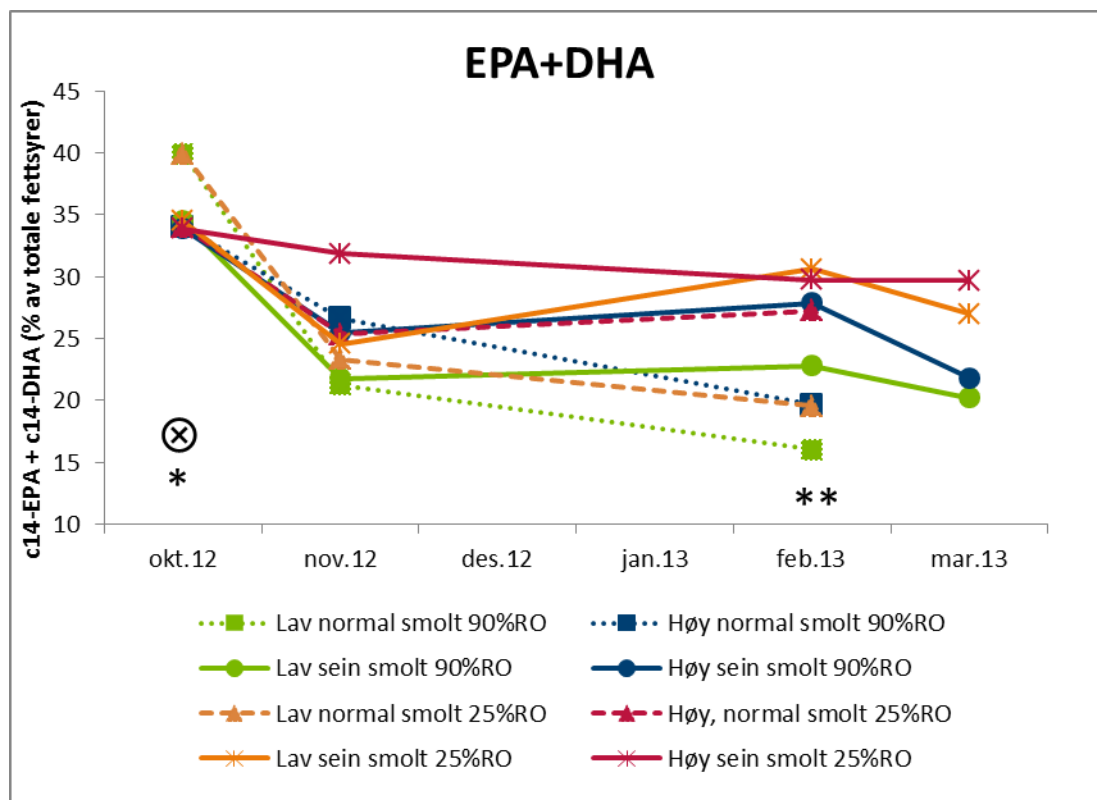
A)



B)



Figur 6 Cellulært nivå av 14C-22:6n-3 syntetisert fra 14C-18:3n-3 i hepatocytter isolert fra A) Høy- og B) Lav-desaturase familiene som føret med 25 % eller 90 % RO i føret og smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Overføring til saltvann ved normalt tidspunkt er indikert med * og for seint tidspunkt med **. ⊗indikerer tidspunkt for introduksjon av diett med 25 % eller 90 % RO i føret.



Figur 7 Cellulært nivå av 14C-20:5n-3 + 14C-22:6n-3 syntetisert fra 14C-18:3n-3 i hepatocytter isolert fra Høy og Lav desaturasefamiliene som føret med 25 % eller 90 % RO i føret og smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Overføring til saltvann ved normalt tidspunkt er indikert med * og for seint tidspunkt med **. ⊗ indikerer tidspunkt for introduksjon av diett med 25 % eller 90 % RO i føret.

4.4 Genuttrykk i lever

4.4.1 Genuttrykk av desaturaser

I laks er det identifisert en $\Delta 5$ desaturase ($\Delta 5fad$) og tre $\Delta 6$ desaturaser ($\Delta 6fad_a$, $\Delta 6fad_b$, and $\Delta 6fad_c$) og disse har ulikt genuttrykksmønster i forskjellig vev (Hastings, N. et al. 2004; Monroig, O. et al. 2010; Zheng, X. et al. 2005). Gjennom heterolog ekspresjon i gjær er det bekreftet at alle genene gir funksjonelle enzymer med hhv $\Delta 5$ og $\Delta 6$ desaturase aktivitet (Hastings, N. et al. 2004; Monroig, O. et al. 2010; Zheng, X. et al. 2005). Miljø og ernæring er vist å påvirke genuttrykket og enzymaktivitetene, men det er fremdeles ikke nok kunnskap om hvordan de ulike desaturasene, og spesielt de ulike $\Delta 6$ desaturasene, er regulert.

Genuttrykksanalyse av $\Delta 5$ og $\Delta 6$ desaturasene i vår studie tyder på at desaturasene har ulik funksjon og regulering under smoltifisering. Reguleringen er kompleks, men diett, overføring til saltvann og lysstyring, kan ha en viktig rolle i reguleringsmekanismen. Liknende genuttrykksmønster kan tyde på at hhv. $\Delta 5fad$ + $\Delta 6fad_a$ og $\Delta 6fad_b$ + $\Delta 6fad_c$ følger samme regulering.

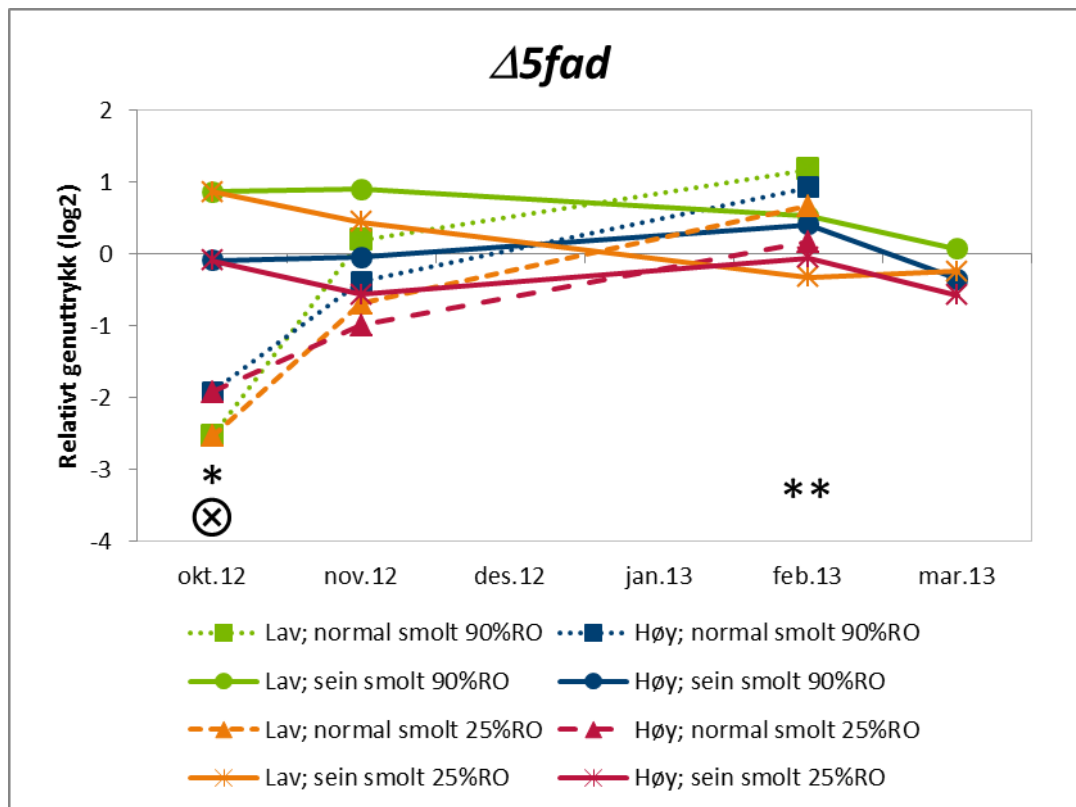
Lysstyring ser ut til å påvirke genuttrykk av desaturasene. I oktober var genuttrykk av $\Delta 5$ og alle $\Delta 6$ desaturasene høyere i gruppen som smoltifiserte seint, enn i gruppen som var lysstyrt og fulgte normalt smoltifiseringsregime (Figur 8 – Figur 11). Også i februar var det ulikt genuttrykksmønster i gruppene som fulgte ulikt smoltifiseringsregime. I februar hadde gruppen med normalt

smoltifiseringsregime gått 13 uker i saltvann, mens gruppen med sein smoltifisering hadde gjennomgått lysstyringsregime, men var ikke overført til saltvann. Dette resulterte i lavere genuttrykk av desaturasene i gruppen som gikk på utsatt smoltifisering sammenliknet med gruppen med normalt smoltifiseringsregime. Dette kan tyde på at lysstyring hemmer genuttrykk av desaturasene.

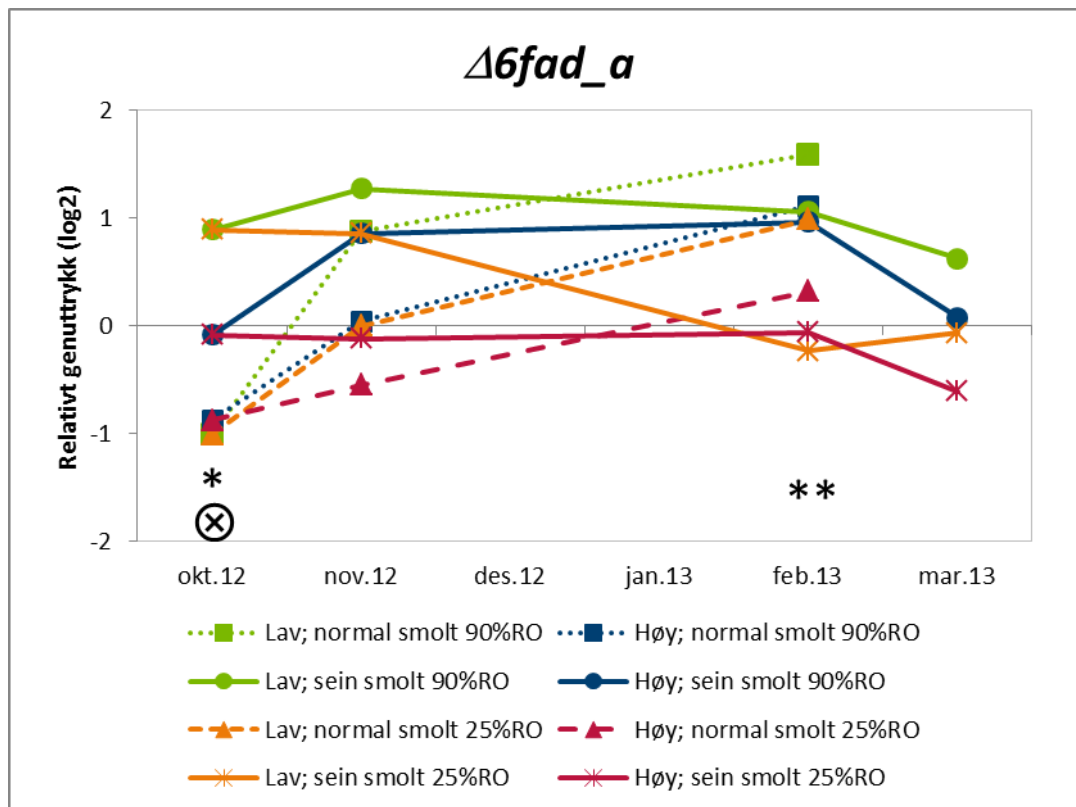
Overføring til saltvann ser ut til å påvirke reguleringen av de ulike desaturasene forskjellig. De to genene *Δ6fad_b* og *Δ6fad_c* viste økt genuttrykk etter overføring til saltvann; fra oktober til november for laksen som gjennomgikk normal smoltifisering og fra februar til mars for laksen med sein smoltifisering (Figur 10 og Figur 11). Dette kan tyde på at disse $\Delta 6$ desaturasene er viktige når laksen overføres til saltvann. *Δ5fad* og *Δ6fad_a* viste økt genuttrykk ved overføring til saltvann i laksen som fulgte normalt smoltifiseringsregime (Figur 8 og Figur 9). I gruppen med sein smoltifisering ble genuttrykket av de samme genene i de fleste grupper redusert etter overføring til saltvann. Det kan hende at effekt av overføring til saltvann for disse genene er avhengig av fiskestørrelse eller alder, slikt at genuttrykk ikke oppreguleres ved seint tidspunkt.

Den genetiske bakgrunnen påvirket genuttrykk av desaturasene. I gruppen med utsatt smoltifisering var *Δ6fad_a* høyere uttrykt i Lav-desaturase gruppen enn Høy-desaturase gruppen ved oktober-uttaket. Ved dette tidspunktet hadde også denne gruppen høyere kapasitet til EPA + DHA syntese. Kan *Δ6fad_a* være viktigere før smoltifisering i Lav-desaturase gruppen enn etter smoltifisering? Lav-desaturase gruppene viste etter oktober-uttaket i stor grad høyere genuttrykk av *Δ5fad*, *Δ6fad_a* og *Δ6fad_c*, enn Høy-desaturase gruppene. Dette tyder på at desaturasene var ulikt regulert i de ulike familiene. I motsetning til de andre desaturasene var genuttrykket av *Δ6fad_b* ved de fleste tilfeller høyere i Høy-desaturase gruppen enn i Lav-desaturase gruppen. Dette stemmer godt overens med den genetiske bakgrunnen og fenotypen seleksjonen av laksefamiliene var basert på. Kapasiteten til syntese av EPA + DHA målt i hepatocytter var også høyere i de fleste Høy-desaturase gruppene etter oktober-uttaket enn i tilsvarende Lav-desaturase gruppene. Resultatene kan tyde på at genuttrykk av *Δ6fad_b* og kapasitet til EPA + DHA syntese samsvarer.

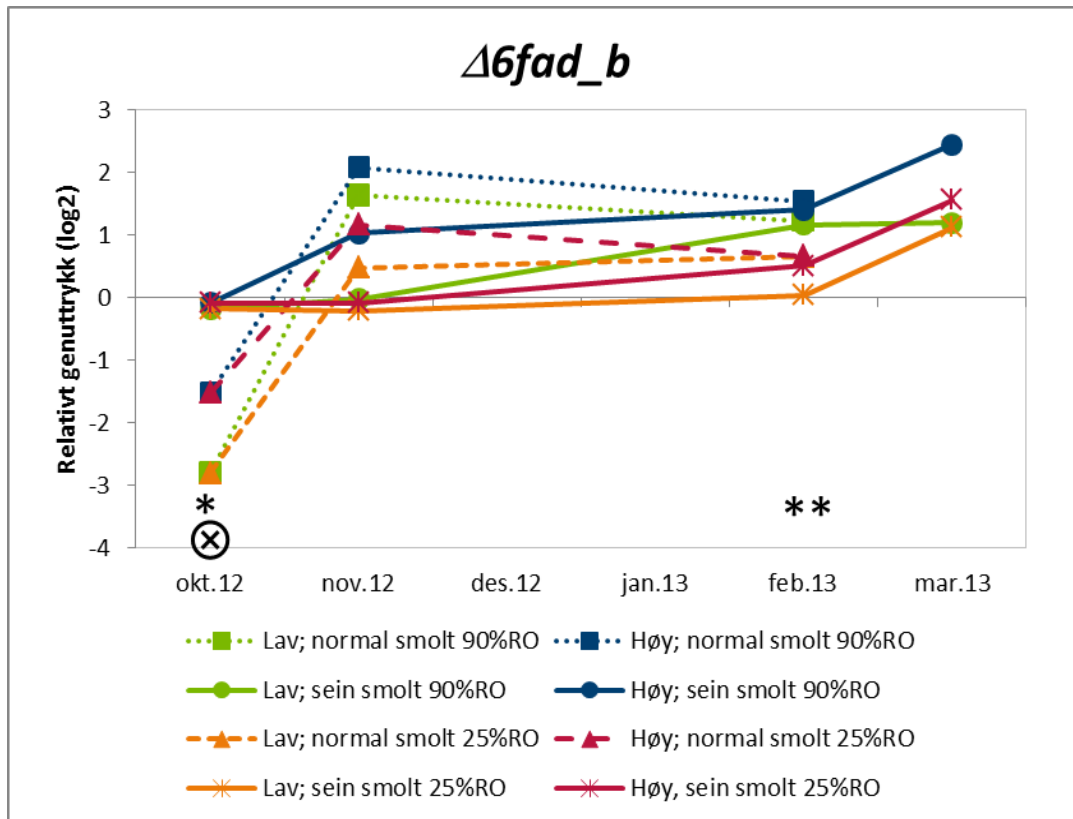
Introduksjon av ny diett etter oktober-uttaket resulterte i høyere genuttrykk av alle desaturasene i gruppene som fikk 90 %RO enn i gruppene som fikk 25 %RO i fôret. Fôret med 25 % RO inneholdt høyere nivå av EPA og DHA enn fôret med 90 % RO. Det er tidligere også vist at høye nivåer av DHA hemmer genuttrykk av desaturasene (Thomassen 2012).



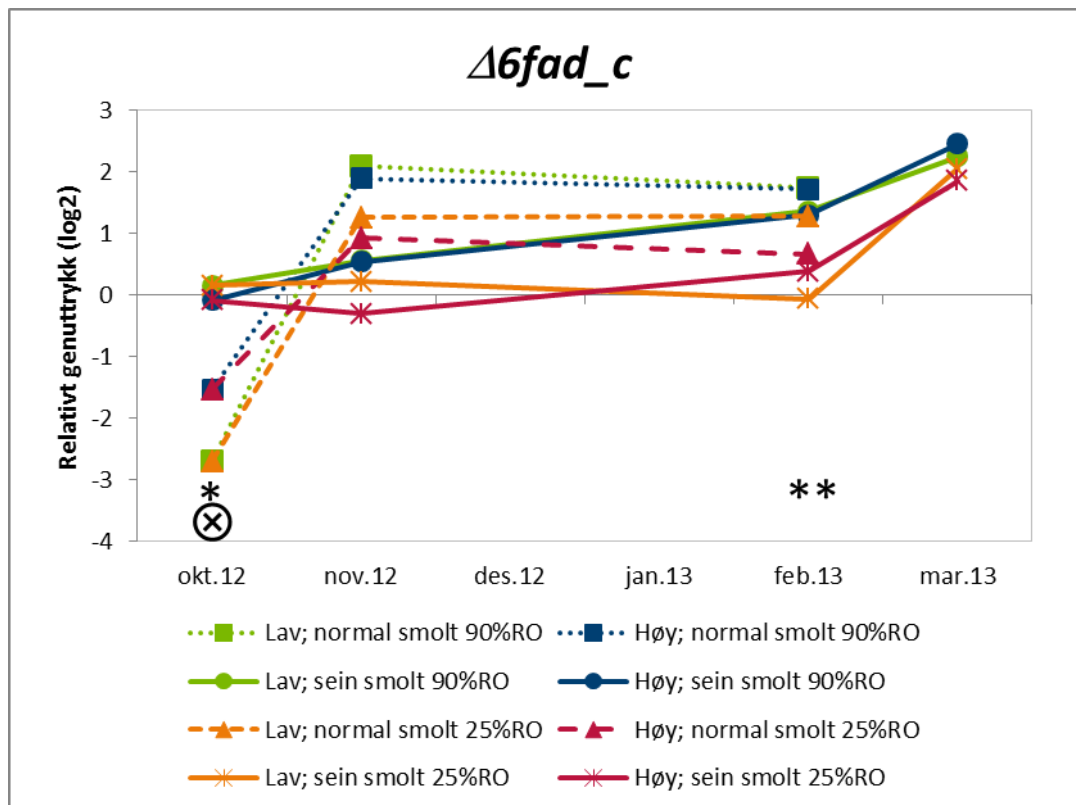
Figur 8 Genuttrykk av $\Delta 5fad$ i lever fra Høy og Lav desaturasefamiliene fôret med 25 % eller 90 % RO i fôret og smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Overføring til saltvann ved normalt tidspunkt er indikert med * og for seint tidspunkt med **. @indikerer tidspunkt for introduksjon av diett med 25 % eller 90 % RO i fôret.



Figur 9 Genuttrykk av $\Delta 6fad_a$ i lever fra Høy og Lav desaturasefamiliene føret med 25 % eller 90 % RO i føret og smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Overføring til saltvann ved normalt tidspunkt er indikert med * og for seint tidspunkt med **. ⊗ indikerer tidspunkt for introduksjon av diett med 25 % eller 90 % RO i føret.



Figur 10 Genuttrykk av $\Delta 6fad_b$ i lever fra Høy og Lav desaturasefamiliene fôret med 25 % eller 90 % RO i fôret og smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Overføring til saltvann ved normalt tidspunkt er indikert med * og for seint tidspunkt med **. @indikerer tidspunkt for introduksjon av diett med 25 % eller 90 % RO i fôret.



Figur 11 Genuttrykk av $\Delta 6fad_c$ i lever fra Høy og Lav desaturasefamiliene fôret med 25 % eller 90 % RO i fôret og smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Overføring til saltvann ved normalt tidspunkt er indikert med * og for seint tidspunkt med **. @indikerer tidspunkt for introduksjon av diett med 25 % eller 90 % RO i fôret.

4.4.2 Microarray

Analyse av totalt genuttrykk (transkriptom) i lever viste flere forskjeller i genuttrykk mellom Lav og Høy-desaturase gruppene. Høy-desaturase gruppen med normal smoltifisering viste i februar oppregulert genuttrykk av fettsyrebindeprotein (FABP) og lipoprotein lipase, sammenliknet med Lav-desaturase gruppen. FABP er transport proteiner for fettsyrer og lipasen hydrolyserer triglycerider i fosfolipider til frie fettsyrer. I gruppen med sein smoltifisering viste Høy-desaturase gruppen i mars oppregulering av CPTI og fosfolipase D2 og phospholipase A2 aktivatorprotein sammenliknet med Lav-desaturasegruppen. CPTI er viktig i β -oksidasjon av fettsyrer, mens fosfolipase hydrolyserer fosfolipider til frie fettsyrer. Det var imidlertid få tydelige forskjeller i genuttrykksmønster for ulike prosesser mellom Lav og Høy desaturase gruppene.

Lysstyring og overføring til saltvann ga tydelig endring i laksens genuttrykksmønster (Tabell 4). Analyse av genuttrykk i laksen som gjennomgikk seint smoltifiseringsregime viste oppregulering av gener involvert i flere vekstrelaterte prosesser. Både lysstyring og overføring til saltvann ga oppregulering av flere gener involvert i protein syntese, protein folding og RNA relaterte prosesser. I tillegg var gener involvert i protein degradering oppregulert. Degradering av proteiner til korte peptider og aminosyrer muliggjør bruk av disse for syntese av nye proteiner. Smoltifisering med lysstyring og overføring til saltvann induserer mange prosesser i laksen med morfologiske, adferds og biokjemiske endringer (Folmar 1980), og kan forklare genuttrykksmønsteret.

Sammenlikning av laks fra de to smoltifiseringsregimene etter overføring til saltvann ga stor forskjell i genuttrykk (Tabell 5). Genuttrykksmønsteret i de to gruppene var i stor grad omvendt med oppregulering av gener relatert til vekst (protein syntese, cellesyklus, RNA) i gruppen med sein smoltifisering, og nedregulering av de samme genene i gruppen som fulgte normalt smoltifiseringsregime. Dette kan skyldes at laksen i de to gruppene var i litt forskjellig vekstfase. Gruppene av laks som ble sammenliknet hadde litt forskjellig tid i saltvann; laksen som fulgte seint smoltifiseringsregime hadde litt kortere tid i saltvann enn laksen som ble smoltifisert som normalt. Dette kan ha påvirket genuttrykksmønsteret.

Tabell 4 *Effekt av lysstyring og overføring til saltvann på genuttrykk i lever fra laks som gjennomgikk seint smoltifiseringsregime. Laks fra november 2012 (før lysstyring) er sammenliknet med laks fra februar 2013 (etter lysstyring) og mars 2013 (etter overføring til saltvann).*

	Nedregulering	Oppregulering
Lysstyring	Kromosom Cellesyklus Cytoskjelett DNA Redox Xenobiotic Kalsium Sucker	Proteindegradering Proteinfolding Cellekjerne Proteasome Reticulum RNA Signalling Proteinsyntese
Overføring til saltvann	Redox Xenobiotic Kalsium sukker Muskel Vekstfaktor Kromosom	Cellesyklus Cytoskjelett DNA Proteinfolding cellekjerne Proteasome Reticulum RNA Signalling Proteinsyntese Proteindegradering

Tabell 5 Effekt av smoltifiseringsregime på genuttrykk i lever. Sammenlikning etter at gruppene hadde gjennomgått lysstyring og overføring til sjøvann; normal smolt (februar 2013) mot sein smolt (mars 2013).

	Nedregulering	Oppregulering
Normal smolt	Cellesyklus	Apoptose
	DNA	Redox
	Protein folding	Xenobiotic
	Cellekjerne	Differensiering
	Proteasome	Ekstracellulær matrix
	RNA	Globin
	Transkripsjon	Vekstfaktor
	Transport	Neural
	Mitokondrier	
	Proteinsyntese	
	Steroid	
	Sekresjon	
Sein smolt	Apoptose	Cellesyklus
	Redox	DNA
	Xenobiotic	Proteinfolding
	Differensiering	Cellekjerne
	Ekstracellulær matrix	Proteasome
	Globin	RNA
	Vekstfaktor	Transkripsjon
	Neural	Transport
		Mitokondrier
		Proteinsyntese
		Steroid
		Sekresjon

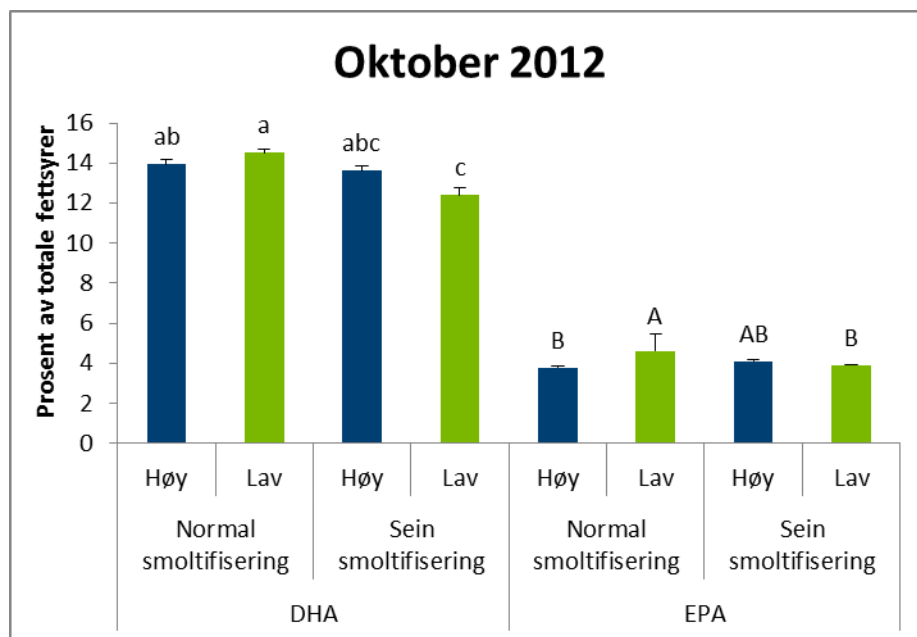
4.5 EPA og DHA i filet

Lav-desaturase gruppen som var satt på normalt smoltifiseringsregime viste i oktober 2012 signifikant høyere muskel-nivå av EPA og DHA, sammenliknet med laksen som skulle gjennomgå utsatt smoltifisering (Figur 12). Dette samsvarer med kapasiteten til EPA+DHA syntese målt i hepatocytter (Figur 7), som også var høyere i Lav-desaturase gruppen på normalt smoltifiseringsregime sammenliknet med gruppen som skulle på utsatt smoltifisering. I Lav-desaturase gruppen med normalt smoltifiseringsregime var imidlertid genuttrykk av samtlige målte desaturaser lavere enn i gruppen med utsatt smoltifisering. Årsaken til disse forskjellene kan skyldes at genuttrykk gir et øyeblikksbilde, og at det er tidsforskjell mellom uttrykk av genet og tidspunkt for når enzymet er funksjonelt.

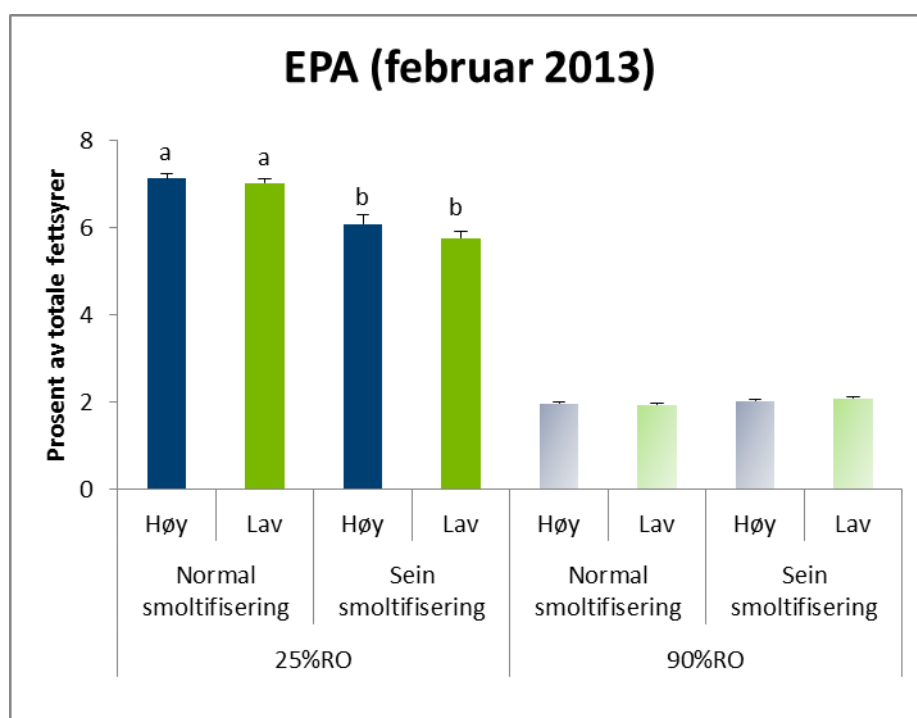
I begge fôringsgrupper (90 %RO og 25 %RO) var det i februar høyere nivå av DHA i muskelfilet fra laks med sein smoltifisering (med unntak av Lav-desaturasegruppen med 25 %RO i fôret), sammenliknet med laks som hadde gjennomgått normal smoltifisering (Figur 14). Alle laks med sein smoltifisering viste høyere kapasitet til DHA syntese i hepatocytter, enn laks som gjennomgikk normal smoltifisering (Figur 6), og dette stemmer godt overens med resultatene for DHA innhold i muskelfilet. Disse resultatene tyder på at ved å holde laksen i ferskvann lenger før smoltifisering og overføring til saltvann kan en opprettholde høy kapasitet til DHA syntese og høyere innhold av DHA i muskelfilet.

I februar ga lav innblanding av RO i fôret (25 %RO), høyere filet-nivå av EPA i gruppen med normal smoltifisering enn i gruppen med utsatt smoltifisering (Figur 13). Høy innblanding av RO i fôret (90 %RO) ga ingen signifikant forskjell i EPA nivå mellom de to smoltifiseringsregimene. Syntesekapasiteten av EPA ved samme uttak var imidlertid høyere i laksen som smoltifiserte seint (med unntak av Høy-desaturase 25 %RO gruppen), enn i laksen som fulgte normalt smoltifiseringsregime. DHA dannes ved kjedeforlengelse av EPA, via ulike elongering- og desatureringstrinn. Lave nivåer av EPA kan skyldes at trinnet videre er stimulert slik at det dannes mer DHA. Dette kan være årsaken til at vi ser lavere innhold av EPA i gruppen som smoltifiseres seint samtidig med høy kapasitet til EPA syntese og signifikant eller tendens til høyere DHA. Genuttrykket av $\Delta 5$ desaturasen, som omdanner 20:4n-3 til EPA, var i lever i februar høyere i laksen med normal smoltifisering sammenliknet med utsatt smoltifisering, og kan forklare økt muskel EPA nivå i disse gruppene. $\Delta 6$ desaturasene har viktige funksjoner i flere trinn av syntesen av EPA og DHA. Genuttrykket av de tre $\Delta 6$ desaturasene i februar-uttaket var høyere i gruppen som fulgte normalt smoltifiseringsregime enn gruppen med seint smoltifiseringsregime. Det var imidlertid høyere genuttrykk av $\Delta 6$ desaturasene ved oktober-uttaket, og i tillegg ved november-uttaket for $\Delta 6fad_a$, for gruppen med seint smoltifiseringsregime, noe som kan forklare det høyere nivået av DHA vi målte i filet fra februar-uttaket.

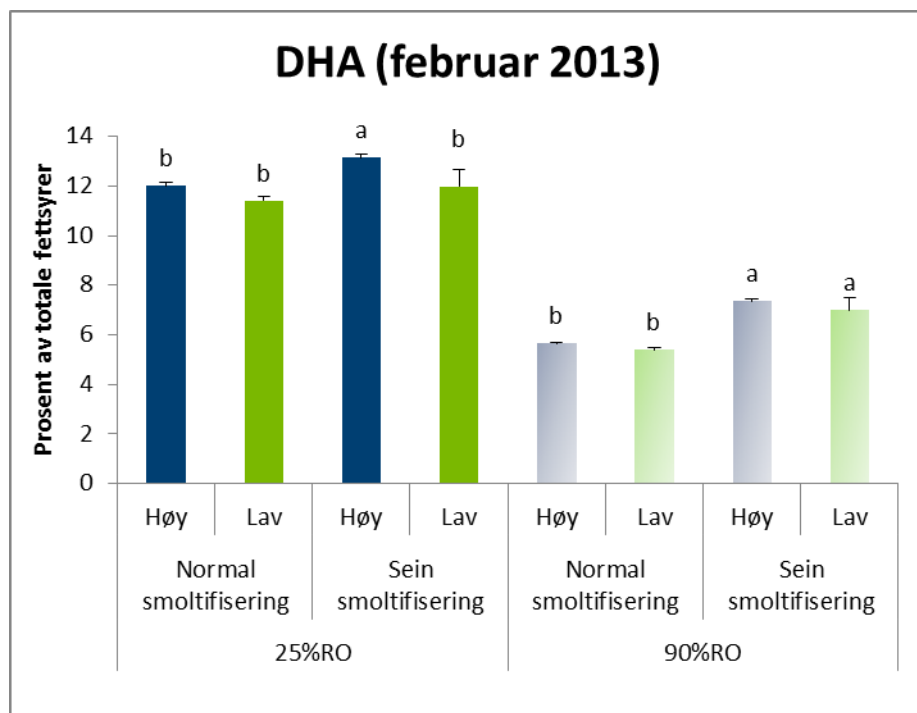
Innhold av EPA og DHA i filet reflekteres av innhold av disse fettsyrene i fôret. Redusert nivå av EPA og DHA i fôret med høy innblanding av RO (90 %RO) ga lavere nivå av EPA og DHA i filet enn med 25 %RO-fôret som inneholdt høyere EPA og DHA nivå. Forlenget opphold i ferskvann med utsatt smoltifisering ga ved høy innblanding av RO i fôret markant effekt på DHA nivå i filet med økning fra ca. 5.6 til 7.3 %, sammenliknet med gruppen som gjennomgikk normalt smoltifiseringsregime. Til sammenlikning ga lav innblanding av RO, 25 % RO, i fôret en økning fra ca. 12 til 13.1 %. Dette kan skyldes at høyt nivå av DHA i fôret hemmer uttrykk av desaturasene (Thomassen, M. S. et al. 2012).



Figur 12 Nivå av EPA og DHA i muskel i oktober 2012 (uke 0) vist som prosent av totale fettsyrer i Høy og Lav desaturasefamiliene smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint. Data ($n=3-4$) er vist med SEM. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller. Signifikante forskjeller ($p \leq 0.05$) for DHA er vist med små bokstaver og for EPA store bokstaver.



Figur 13 Nivå av EPA muskel i februar (uke 17) vist som prosent av totale fettsyrer i Høy og Lav desaturasefamiliene smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint, og føret med 25 %RO eller 90 %RO i føret. Data ($n=3$) er vist med SEM. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller ($p \leq 0.05$).



Figur 14 Nivå av DHA i muskel i februar (uke 17) vist som prosent av totale fettsyrer i Høy og Lav desaturase familiene smoltifisert ved to ulike tidspunkt, normalt eller seint, og fôret med 25 %RO eller 90 %RO i fôret. Data ($n=3$) er vist med SEM. Ulike bokstaver viser signifikante forskjeller ($p \leq 0.05$) med små bokstaver for 25 %RO fôringsgruppen og store bokstaver for 90 %RO gruppen.

5 Konklusjon

Resultatene tyder på at det kan være potensiale for å opprettholde til en viss grad laksens kapasitet til EPA og DHA syntese fra tidlige livsfaser ved å holde den i ferskvann til den når ca 400 gram. Regulering av EPA og DHA syntese er kompleks og styres blant annet av faktorer som miljø (lysstyring, overføring til saltvann), genetikk og fôr.

Laks som gjennomgikk et utsatt smoltifiseringsregime viste bedre kapasitet til syntese av EPA og DHA, enn laks som fulgte normalt smoltifiseringsregime. Laks som ble seinere smoltifisert viste også høyere DHA nivå (både målt som prosent av totale fettsyrer og i g/100g filet) i fileten, enn laks som ble smoltifisert ved et tidligere tidspunkt. Genuttrykk av alle desaturasene ble nedregulert av lysstyring, mens overføring til saltvann oppregulerte $\Delta 6fad_b$ og $\Delta 6fad_c$. Lysstyring, eller hele smoltifiseringsprosessen, kan se ut til å hemme enzymaktiviteten av $\Delta 5$ desaturasen, som er ansvarlig for omdanningen av 20:4n-3 til EPA, og stimulere aktiviteten av $\Delta 6$ desaturasen, som er essensiell i disse siste trinnene i syntesen av DHA.

Laks fra de fleste Høy-desaturase gruppene viste i februar-uttaket høyere kapasitet til EPA+DHA syntese enn Lav-desaturase gruppen. Dette viser at familiene som er selektert for høyt genuttrykk av en $\Delta 6$ desaturase ($\Delta 6fad_b$), også har bedre kapasitet til EPA+DHA syntese.

Høy innblanding av RO i fôret ga større økning av DHA i fileten, enn lav innblanding av RO. Gruppen med 90 %RO i fôret hadde også høyere genuttrykk av alle desaturasene, enn gruppen som fikk 25 %RO i fôret. Dette kan skyldes en inhiberende effekt av DHA i fôret på uttrykk av desaturasene.

6 Nytteverdi

Tidspunkt for smoltifisering med lysstyring og overføring til saltvann har signifikant betydning for kapasitet til EPA og DHA syntese i lever og innhold av DHA i filet i 400-500 grams laks. Vi vet ikke om den observerte forskjellen i innhold av og syntesekapasitet til EPA og DHA opprettholdes slik at laksen når den når slaktestørrelse også har høyere innhold av disse omega-3 fettsyrene. Det bør derfor undersøkes videre om utsatt tidspunkt for smoltifisering gir høyere nivå av EPA og DHA i laks ved slaktestørrelse.

Syntesen av EPA og DHA reguleres av mange faktorer. Vi vet at miljø (lys, vann), genetikk og fôr er blant faktorene som påvirker genuttrykk og enzymaktivitet av desaturasene, som er ansvarlig for flere trinn av EPA og DHA syntesen. Stimulering av desaturasene kan gi mer EPA og DHA. Bedre kunnskap om reguleringsmekanismen kan muliggjøre økt nivå av EPA og DHA i filet.

I denne studien har vi brukt avkom etter laksefamilier selektert for høyt genuttrykk av en $\Delta 6$ desaturase (*$\Delta 6fad_b$*). Etter en generasjon bekreftet vi høyere genuttrykk av *$\Delta 6fad_b$* i Høy-desaturase familiene enn i Lav-desaturase familien. Det var også bedre syntesekapasitet til og høyere eller tendens til høyere nivå av DHA i Høy-desaturase familiene enn i Lav-desaturase familiene. Genetisk seleksjon av familier med høyt *$\Delta 6fad_b$* genuttrykk og det resulterende høyere filetnivå av DHA gir en mulighet til å opprettholde høyere nivå av EPA og DHA i laks med lavere innhold av de begrensede omega-3 fettsyrene i fôret. Videre avl på denne egenskapen vil kunne øke den positive effekten på filetnivå av EPA og DHA.

Seleksjon av enkelte familier basert på genuttrykk av $\Delta 6$ desaturasen vil også medføre seleksjon av flere andre egenskaper. Det er viktig med videre studier for å undersøke hvilke egenskaper som følger og hvordan disse egenskapene påvirker laksens helse og fettsyre metabolisme.

7 Referanser

- Ackman, R. G. & Takeuchi, T. 1986. Comparison of Fatty-Acids and Lipids of Smolting Hatchery-Fed and Wild Atlantic Salmon *Salmo-Salar*. *Lipids*, 21(2): 117-120.
- Bell, J. G., Tocher, D. R., Farndale, B. M., Cox, D. I., McKinney, R. W., & Sargent, J. R. 1997. The effect of dietary lipid on polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing Parr-Smolt transformation. *Lipids*, 32(5): 515-525.
- Bell, M. V., Dick, J. R., & Porter, A. E. A. 2001. Biosynthesis and tissue deposition of docosahexaenoic acid (22 : 6n-3) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*, 36(10): 1153-1159.
- Buzzi, M., Henderson, R. J., & Sargent, J. R. 1997. Biosynthesis of docosahexaenoic acid in trout hepatocytes proceeds via 24-carbon intermediates. *Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol. Biol.*, 116(2): 263-267.
- Dannevig, B. H. & Berg, T. 1985. Endocytosis of Galactose-Terminated Glycoproteins by Isolated Liver-Cells of the Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, 82(4): 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(1): 497-509.
- Hastings, N., Agaba, M. K., Tocher, D. R., Zheng, X. Z., Dickson, C. A., Dick, J. R., & Teale, A. J. 2004. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from alpha-linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Biotechnology*, 6(5): 463-474.
- Hoshi, M., Williams, M., & KISHIMOTO, Y. 1973. Esterification of Fatty-Acids at Room-Temperature by Chloroform-Methanolic Hcl-Cupric Acetate. *Journal of Lipid Research*, 14(5): 599-601.
- Kjaer, M. A., Todorcevic, M., Torstensen, B. E., Vegusdal, A., & Ruyter, B. 2008. Dietary n-3 HUFA affects mitochondrial fatty acid beta-oxidation capacity and susceptibility to oxidative stress in Atlantic salmon. *Lipids*, 43(9): 813-827.
- Krasnov, A., Timmerhaus, G., Afanasyev, S., & Jorgensen, S. M. 2011. Development and assessment of oligonucleotide microarrays for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics*, 6(1): 31-38.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Mason, M. E. & Waller, G. R. 1964. Dimethoxypropane Induced Transesterification of Fats + Oils in Preparation of Methyl Esters for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry*, 36(3): 583-&.
- Monroig, O., Tocher, D. R., Hontoria, F., & Navarro, J. C. 2013. Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with Delta 6/Delta 8 activity and an Elovl5 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*, 412: 14-22.
- Monroig, O., Tocher, D. R., & Navarro, J. C. 2013. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. *Mar. Drugs*, 11(10): 3998-4018.
- Monroig, O., Zheng, X., Morais, S., Leaver, M. J., Taggart, J. B., & Tocher, D. R. 2010. Multiple genes for functional 6 fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1801(9): 1072-1081.
- Montero, D. & Izquierdo, M. 2015. Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. In G. Turchini, W.-K. Ng, & D. R. Tocher (Eds.), *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*: 439-487. CRC press.

- Moya-Falon, C., Thomassen, M. S., Jakobsen, J. V., & Ruyter, B. 2005. Effects of dietary supplementation of rapeseed oil on metabolism of [1-C-14] 18 : 1 n-9, [1-C-14] 20 : 3n-6, and [1-C-14]20 : 4n-3 in Atlantic salmon hepatocytes. *Lipids*, 40(7): 709-717.
- Narce, M., Gresti, J., & Bezard, J. 1988. Method for Evaluating the Bioconversion of Radioactive Poly-Unsaturated Fatty-Acids by Use of Reversed-Phase Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography*, 448(2): 249-264.
- Peterson, G. L. 1977. Simplification of Protein Assay Method of Lowry et Al - Which Is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2): 346-356.
- Pfaffl, M. W. Quantification strategies in real-time PCR. Bustin, S. A. A-Z of Quantitative PCR. IUL Biotechnology Series, 87-120. 2004. La Jolla, CA, International University Line.
- Ref Type: Generic
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O., & Thomassen, M. S. 2000. 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(2): 119-127.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Einen, O., & Thomassen, M. S. 2000. 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(2): 109-117.
- Ruyter, B., Rosjo, C., Grisdale-Helland, B., Rosenlund, G., Obach, A., & Thomassen, M. S. 2003. Influence of temperature and high dietary linoleic acid content on esterification, elongation, and desaturation of PUFA in Atlantic salmon hepatocytes. *Lipids*, 38(8): 833-840.
- 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(11): 1167-1176.
- Sanden, M., Stubhaug, I., Berntssen, M. H. G., Lie, O., & Torstensen, B. E. 2011. Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) as a Net Producer of Long-Chain Marine omega-3 Fatty Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(23): 12697-12706.
- Sprecher, H. 1981. Biochemistry of essential fatty acids. *Prog.Lipid Res.*, 20: 13-22.
- Thomassen, M. S., Rein, D., Berge, G. M., Østbye, T.-K, and Ruyter, B. High dietary EPA does not inhibit delta 5 and delta 6 desaturases in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed rapeseed oil diets. *Aquaculture* 360-361, 78-85. 2012.
- Ref Type: Generic
- Tocher, D. R., Bell, J. G., Dick, J. R., Henderson, R. J., McGhee, F., Michell, D., & Morris, P. C. 2000. Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23(1): 59-73.
- Torstensen, B. E., Ruyter, B., Sissener, N., Østbye, T., Waagbø, R, Jørgensen, S. M, Ytteborg, E., Rud, I., Liland, N., Mørkøre, T., and Dessen, J. E. Fett for fiskehelse. 2013. FHF-rapport.
- Ref Type: Report
- Zheng, X., Tocher, D. R., Dickson, C. A., Bell, J. G., & Teale, A. J. 2005. Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a delta6 desaturase of Atlantic salmon. *Lipids*, 40(1): 13-24.

8 Leveranser

I løpet av perioden har prosjektet gitt følgende leveranser:

01.01.2012	Møte med styringsgruppen
31.12.2012	Faktaark: «Kan vi gjennom avl og ernæring påvirke laksens kapasitet til å produsere omega-3 fettsyrene EPA og DHA?»
31.12.2012	Framdriftsrapport pr 2012
07.03.2013	Møte med styringsgruppen (telefonmøte)
05.06.2014	Møte med styringsgruppen
22.10.2013	Presentasjon på FHF-samling Verdikjede havbruk 21.-22.oktober
31.12.2013	Faktaark: «Kan størrelse ved overgang til sjøvann påvirke laksens kapasitet til å produsere omega-3 fettsyrene EPA og DHA?»
31.12.2013	Framdriftsrapport pr 2013
15.05.2014	Presentasjon på FHF-samling, dialogmøte med Nifes og industri, 15.05.2014
10.12.2014	Faktaark; «Genetisk bakgrunn er av betydning for laksens evne til å opprettholde god helse ved lave nivåer av EPA og DHA i fôret»
21.01.2015	Presentasjon på FHF-samling, dialogmøte med Nifes og industri

Under bearbeiding:

- Artikkel til fagpresse

Prosjektet har også fått omtale her:

18.09.2012

<http://www.forskning.no/artikler/2012/september/333809>

<http://www.intrafish.no/norsk/nyheter/article1355968.ece>

http://www.kyst.no/?page_id=120&article_id=95814

20.09.2012

http://www.fishnewseu.com/index.php?option=com_content&view=article&id=8983:genes-effect-omega-3-conversion&catid=46:world&Itemid=56

31.03.2014

http://www.kyst.no/nyhet/?article_id=104723

10.04.2014

http://www.kyst.no/nyhet/?article_id=104959

13.05.2014

<http://nofima.no/nyhet/2014/05/stor-laksesmolt-produserer-mer-sunt-fett/>

<http://www.sysla.no/2014/05/13/pressemelding/stor-laksesmolt-produserer-mer-sunt-fett/>

http://www.intrafish.no/gratis_nyheter/article1390358.ece

<http://www.fishupdate.com/larger-salmon-smolts-produce-healthier-fat-fishupdate-com/>

<http://www.dagligvarehandelen.no/oppdrettslaks-kan-produsere-mer-marint-omega-3/>

23.05.2014

<http://www.kystmagasinet.no/nyheter/2014/stor-laksesmolt-produserer-mer-sunt-fett/>

16.06.2014

Nationen (papirutgave) Gjør laksen enda sunnere (om stor smolt og omega-3)

<http://forskning.no/fisk-oppdrett-mat/2014/05/laksen-skal-lage-mer-av-det-sunne-omega-3-fettet>

http://www.kyst.no/nyhet/?article_id=106126

<http://www.sysla.no/2014/06/16/havbruk/slik-skal-oppdrettslaksen-bli-sunnere/>

<http://www.nord24.no/sjomat/article7422026.ece>

