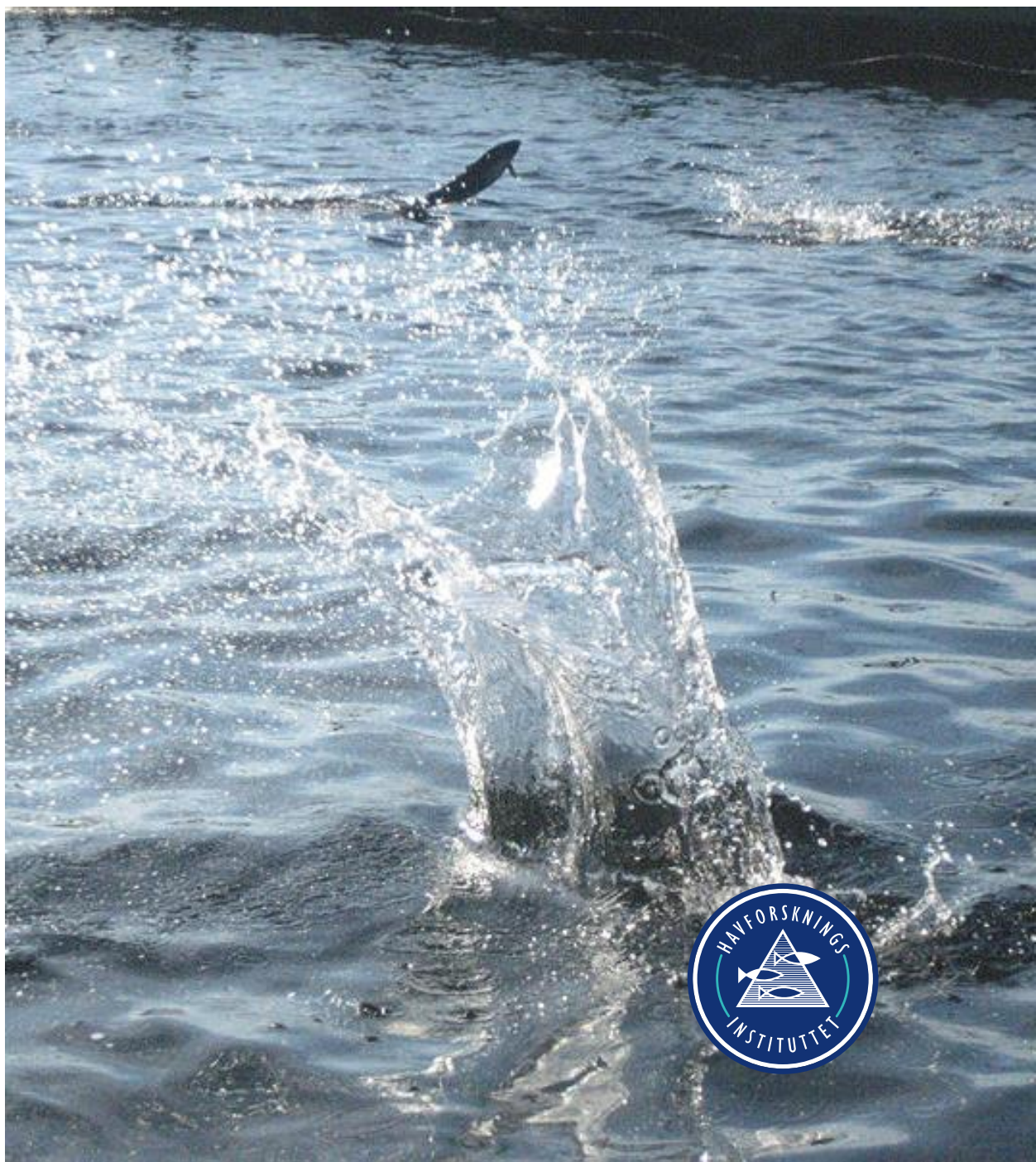


# Validering av optimale mikronæringsstoffnivå i laksefôr

## – ASSESSFEED

Kristin Hamre, John F. Taylor, Joanna Silva, Erik-Jan Lock, Johan Johansen, Marie Hillestad, Luis Conceição, Douglas R. Tocher, Marit Espe, Marit Bjørnevik og Gro-Ingunn Hemre



# Prosjektrapport

**Rapport:** RAPPORT FRA HAVFORSKNINGEN  
**Nr. – År:** 21–2018  
**Dato:** 30.06.2018

**Tittel (norsk og engelsk):**  
Validering av optimale mikronæringsstoff-nivå i laksefôr  
Validation of optimal levels of micronutrients in feed for Atlantic salmon

**Forfattere:**  
Kristin Hamre, John F. Taylor, Joanna Silva, Erik-Jan Lock, Johan Johansen, Marie Hillestad, Luis Conceição, Douglas R. Tocher, Marit Espe, Marit Bjørnevik og Gro-Ingunn Hemre

**Distribusjon:** Åpen

**Havforskningsprosjektnr.:**  
15277

**Oppdragsgiver(e):**  
FHF

**Oppdragsgivers referanse:**  
FHF prosjekt 901341

**Program:**  
Fiskeernæring

**Forskningsgruppe:**  
Fôr og ernæring

**Antall sider totalt:**  
27

## Sammendrag (norsk):

ASSESSFEED er et prosjekt utgått fra EU-prosjektet ARRAINA, med målsetning å validere nye anbefalinger for tilsetning av mikronæringsstoffer, særlig vannløselige vitaminer, i laksefôr. Det ble kjørt et fôingsforsøk der kontrollfôret (100 % NP) ble tilsatt mikronæringsstoffer iht. anbefalinger gitt i NRC (2011), som i stor grad bygger på forsøk med yngel av regnbueørret fra 1980-90-tallet. Forsøksfôret (Ny NP) bygget på resultatene fra ARRAINA. Det var også et kommersielt kontrollfôr (Biomar). Det var ingen signifikant effekt på vekst, men en tendens til større biomassevekst i fisk gitt Ny NP. Opptak av vitaminer og mineraler i fisken fulgte stort sett samme mønster i ASSESSFEED som i ARRAINA, noe som styrker konklusjonene når det gjelder behov fra ARRAINA. Muskelen i fisken som fikk ny NP var bløtere og hadde større celler enn i fisken som fikk 100 % NP. Denne effekten på filetkvalitet ble tolket som økt muskelcelle hypertrofi og falt sammen med endringer i muskelens innhold av noen frie aminosyrer og nitrogen-metabolitter. Noen av disse endringene er kjent som tegn på B-vitaminmangel hos mammalier.

## Summary (English):

ASSESSFEED is a project with basis in the EU-funded project ARRAINA, where the aim was to validate new recommendations for supplementation of diets for Atlantic salmon with micronutrients, especially water-soluble vitamins. A feeding trial was conducted, where the control feed (100% NP) contained micronutrients according to NRC (2011) which is largely based on trials with rainbow trout from the 1980-90ies. The experimental diet (Ny NP) was based on the results from ARRAINA. A commercial control diet was also included (Biomar). There was no significant effect on growth, but a tendency of increased biomass growth with the new NP. Uptake of vitamins and minerals in the fish largely followed the results from ARRAINA, strengthening the ARRAINA requirement estimations. The muscle in fish given Ny NP was softer and had larger cells than the muscle of fish given 100% NP. The effect on fillet quality was interpreted as increased muscle cell hypertrophy and coincided with changes in concentrations of some free amino acids and nitrogen metabolites. Some of these changes are known as indicators of vitamin B-deficiency in mammals.

**Emneord (norsk):**  
Ernæringsbehov, vitaminer, mineraler, filetkvalitet

**Subject heading (English):**  
Nutrient requirements, vitamins, minerals, fillet quality

Veronika Sele, prosjektleder

Robin Ørnrsrud, faggrupeleder



# Innhold

<b>1</b>	<b>Innledning</b> .....	<b>4</b>
1.1	Hvordan fastsetter man behov for mikronæringsstoffer? .....	4
1.2	Biomarkører .....	5
1.3	Forsøkene.....	5
<b>2</b>	<b>Problemstilling og formål</b> .....	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>Prosjektgjennomføring</b> .....	<b>9</b>
3.1	Filetkvalitet .....	9
3.2	Genuttrykk.....	10
<b>4</b>	<b>Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon</b> .....	<b>11</b>
4.1	Vitaminer.....	11
4.2	Mineraler .....	14
4.3	Filetkvalitet .....	16
4.4	Kan tidlig genuttrykk brukes til å forutsi vekst i et forsøk?.....	19
<b>5</b>	<b>Konklusjoner</b> .....	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Referanser</b> .....	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>APPENDIX</b> .....	<b>23</b>

## 1 Innledning

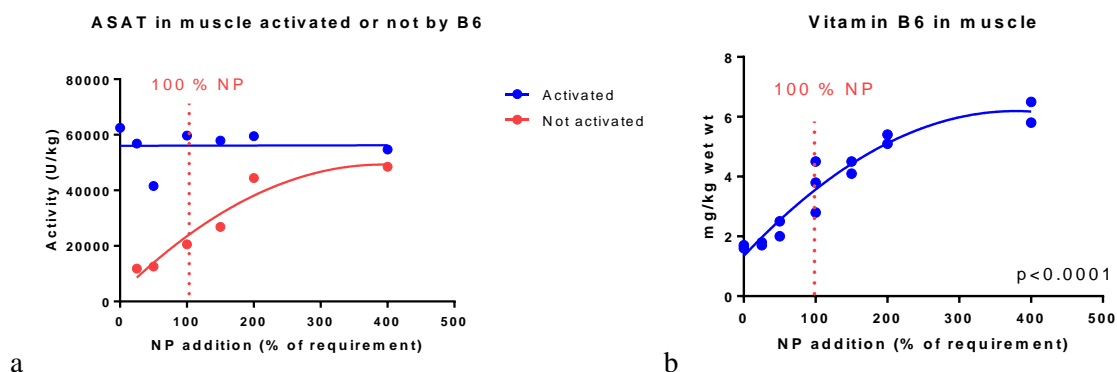
ASSESSFEED er en del av EU-prosjektet ARRAINA og et «proof of concept» på nye kriterier for tilsetning av vitaminer og mineraler i laksefôr. Da behovene for mikronæringsstoffer hos laksefisk ble fastsatt på 1980- og 90-tallet, var fiskefôr basert på marine råvarer, mens man i dag bruker en stor andel planteråvarer. Dette har ført til en stor endring i næringsstoff-sammensetning og biotilgjengelighet av næringsstoffene i fôret, spesielt gjelder dette mikronæringsstoffene og balansen av aminosyrer og fettsyrer.

Resultater fra småskalaforsøk i ARRAINA viser at bruk av de gamle anbefalingene for mikronæringsstoffer og aminosyrer gir fisk som ikke vokser optimalt når de blir gitt plantebaserte fôr, og som akkumulerer mer fett og avleirer mindre protein enn det som er tilfelle hvis man justerer tilsetning av disse næringsstoffene. Målet for ASSESSFEED var å verifisere resultatene for vitaminer og mineraler i større skala. Tilsetning av aminosyrer ble ikke variert. Når det gjelder forsøket med laks i ASSESSFEED, var mesteparten finansiert gjennom ARRAINA, men vi ønsket å gjøre en del analyser for å dokumentere om de samme effektene på metabolismen som man fant i ARRAINA, kunne verifiseres i «proof of concept» prosjektet ASSESSFEED. Vi ønsket også å undersøke om den nye næringsstoffpakken påvirket kvaliteten på fileten.

### 1.1 Hvordan fastsetter man behov for mikronæringsstoffer?

I klassisk ernæring defineres behov som det laveste nivå av et næringsstoff som ikke gir mangelsymptomer. Dette er det samme som minimumsbehovet. For vitamin C-mangel er de typiske symptomene nedsatt vekst og lordose/skoliose (bøyd ryggrad), for vitamin B12, nedsatt vekst og pernisiøs anemi og for vitamin E, nedsatt hemoglobinkonsentrasjon, og ved videreutvikling, nedsatt vekst. Fisk som får vitaminer og mineraler basert på klassiske minimumsbehov får kanskje sine behov dekket under optimale forhold, men kan ha for lav ernæringsstatus til å møte utfordringer som utsett i sjø, raske temperatursvingninger, lusebehandling og høyt smittepress.

En annen måte å fastsette næringsstoffbehov kan være å bestemme hvilke nivå som er nødvendige for å sikre optimal funksjon av organismen, for eksempel hvilke nivå av B-vitaminer som gir den raskeste metabolismen eller hvor mye vitamin C og E som er nødvendig for å stimulere immunforsvaret og forbedre stressmestring. For de fleste vitaminer ser det ut til å være stor forskjell mellom minimumsbehovet og optimal tilsetning. Med optimale nivå vil man ha en sikkerhetsmargin slik at fisken bedre kan håndtere miljøutfordringer, stress ved f.eks. håndtering, næringsstoffinteraksjoner og sykdom.



Figur 1a Aktiviteten til enzymet aspartate amino transferase (ASAT) i muskel fra laks gitt fôr med økende mengde pyridoxin (vitamin B6) i form av en næringspakke (NP). Ikke aktivert er ASAT-aktiviteten i ubehandlet muskel fra fisk på de ulike fôrene. Aktivert er aktiviteten når den ubehandlede muskelen blir tilsatt nok vitamin B6 til at ASAT blir mettet med koenzymet. 1b. Konsentrasjonen av B6 i muskel fra laks ved økende tilsetning av NP i fôret

## 1.2 Biomarkører

Der er 8 B-vitaminer. Disse er kofaktorer til enzymer i prosessene som omdanner mat (og fôr) til kroppsvæv, inkludert enzymer i energiomsetningen. Disse enzymene må være mettet med B-vitaminer hvis de skal ha maksimal aktivitet, som vist for vitamin B6 (pyridoxin) i Figur 1a. Enzymet aspartat amino transferase (ASAT) bruker vitamin B6 som kofaktor og maksimal aktivitet oppnås når vevet er mettet med vitamin B6 (Fig 1b). Dette er antagelig tilfellet for alle B-vitaminene. B-vitaminenes ulike biomarkører, som vil indikere optimal funksjon, er gitt i Hansen et al. 2015, og Hemre et al. 2016. I ARRANA ble behovene satt til det laveste nivået i fôret som ga vevsmetning. Vitamin C er også et vannløselig vitamin der en av funksjonene er som kofaktor. Vi brukte derfor også vevsmetning som kriterium for vitamin C behov.

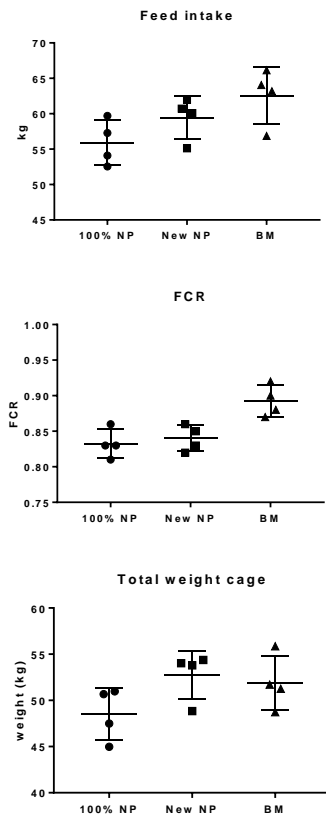
Fettløselige vitaminer, vitamin A, D, E og K, har vanligvis en lineær sammenheng mellom konsentrasjonene i fôr og vev, og man må derfor bruke andre kriterier enn vevsmetning når man skal fastsette behovet for disse. Når det gjelder mineralene viser noen vevsmetning, andre ikke.

## 1.3 Forsøkene

I ARRANA er det kjørt to korttids regresjonsforsøk med laks i ferskvann (18-87 g) og sjøvann (200-500 g), der fisken ble fôret med graderte mengder av en næringspakke bestående av aminosyrer, vitaminer og mineraler, fra ingen tilsetning til 4 ganger gjeldende behov (NRC, 2011). Biomarkører i fisken ble brukt som indikasjon på at behovet for hvert enkelt næringsstoff var dekket (Hemre et al. 2016; Hamre et al., 2016; Lock et al., in preparation). Vi fant at behovet for noen av næringsstoffene var dekket av fôringrediensene, noen behov var på linje med NRC (2011), mens behovet for andre næringsstoffer krevde tilsetning utover det som er angitt i NRC (2011) (Tabell 1). Metabolismen var påvirket ved at fisken som fikk et fôr med næringsstoffpakken tilsatt i henhold til NRC (2011) akkumulerte mer fett og mindre protein enn fisken som fikk økt innblanding av de aktuelle næringsstoffene.



Kvaliteten (farge, fasthet, ferskhets, osv.) av produsert laks er særdeles viktig ved salg. Nyere forsøk har vist at fastheten på fisken endres når fiskefôrets aminosyresammensetning endres (Larsson et al., 2014). Dette skjer mest sannsynlig som en konsekvens av en endret metabolisme i muskelen slik at den blir bløtere etter slakting. Vi ville undersøke om endring i metabolismen som følge av justering av mikronæringsstoffer kan gi en lignende effekt.



Figur 2 Fôrinntak (kg/merd,  $p=0.06$ ), fôrfaktor (FCR,  $p=0.004$ ) og sluttbiomasse (kg/merd,  $p=0.12$ ) hos fisken i ASSESSFEED. 100 % NP er næringsstoffpakken ifølge NRC (2011); New NP er næringsstoffpakken utviklet i ARRAINA; BM er kommersiell kontroll (Biomar).

I ASSESSFEED har vi brukt en næringsstoffpakke basert på anbefalingene i NRC (2011) og en ny næringsstoffpakke basert på resultatene i ARRAINA. Et kommersielt fôr (BIOMAR, BM) ble brukt som kontroll. Fisken gikk i fôringsforsøk ved GIFAS sommer/høst 2016. Selve fôringsforsøket var i hovedsak finansiert av ARRAINA. Det var imidlertid ikke midler til analyser, og vi søkte derfor om midler til dette fra FHF. Det var samme biomassevekst hos fisken som fikk næringsstoffpakken utviklet i ARRAINA og den kommersielle kontrollen, mens fisken som fikk næringsstoffpakken basert på NRC 2011 hadde en tendens til dårligere biomassevekst (Figur 1). Biomassevekst er summen av bedre vekst og mindre dødelighet og det var ingen signifikant effekt på disse to faktorene alene. Et interessant funn var at fôrfaktoren var bedre hos begge gruppene med forsøksfisk enn hos den kommersielle kontrollen (BM, Figur 2).

Vi analyserte biomarkørene for de næringsstoffene som ble variert i forsøksfôrene for å se om vi hadde truffet med tilsetningsnivåene. Tekstur og celledørrelse i filet ble målt for å se om den nye næringsstoffpakken påvirket filetkvalitet. Det ble også gjennomført qPCR-analyser for å kvantifisere uttrykk av utvalgte gener. Formålet var å undersøke om variasjon i genuttrykk tidlig i forsøket (etter 2-5 uker) kunne brukes til å forutse vekst og fôrutnyttelse i hele forsøket (etter 100 dager).

NIFES, nå Havforskningsinstituttet, har vært ansvarlig organisasjon i den FHF-finansierte delen av ASSESSFEED. Vi samarbeider med mange FOU-miljø i forbindelse med ASSESSFEED. Det er GIFAS som utfører fôringsforsøket og BIOMAR deltar som næringsaktør og fôrprodusent, både i ASSESSFEED og ARRAINA. Forsøksfôrene er produsert av SPAROS (Portugal). Andre deltagere er Universitetet i Nordland, Universitetet i Stirling (UK) og CSIC (Spania). NIFES var tilknyttet som ARRAINA-partner og har utviklet vitamin- og mineralmiksen som var planlagt brukt i forsøksfôrene.

Seniorforsker Kristin Hamre er prosjektleder for den FHF-finansierte delen av ASSESSFEED. Prosjektdeltakere er dr. Gro-Ingunn Hemre (Ernæring, NIFES), dr. Erik-Jan Lock (Ernæring, NIFES), dr. Marit Bjørnevik (Filetkvalitet, Nord Universitet), dr. Johan Johansen (Fiskeforsøk, GIFAS), dr. Luis Conceicao (Fôrproduksjon, Sparos), dr. Douglas Tocher (Ernæring, Universitetet i Stirling), dr. Jaume Pérez-Sánchez (Molekylærbiologi, CSIC). Referansegruppen har bestått av Kristian Prytz, FHF, Marie Hillestad, Biomar, og Johan Johansen, Gifas.

Tabell 1 Vitamin konsentrasjoner (mg/kg, analysert) i fôrene til laks i regresjonsstudiet i sjø, ARRAINA. Skyggelagte celler indikerer hvilket nivå i fôret som ga vevsmetning i fisken (Hemre et al., 2016; Hamre et al., 2016).

NP (% of requirement)	0	25	50	100	150	200	400
Pyridoksin, B6	2,6	3,2	4	5,2	7,1	10	16
Biotin	0,25	0,28	0,31	0,4	0,57	0,7	1,14
Cobalamin	0,07	0,06	0,1	0,17	0,3	0,39	0,69
Folate	1,18	1,17	1,58	2,25	3,28	4,2	7,23
Pantothen	6,5	7,5	9,9	16	25	31	54
Riboflavin	2,7	3,2	4,7	6,8	10	13	20
Thiamin	3,4	4,2	5	6,2	8,3	11	16
Niacin	36	36	41	50	64	76	110
Vitamin C	<5,5	14	28	63	89	140	170
Vitamin E	76	91	109	141	178	230	239

## 2 Problemstilling og formål

### Hovedmål:

- Validere ny vitamin og mineralblanding til laksefôr med hensyn på utvalgte biologiske markører og laksemuskelens tekstur

ASSESSFEED ville validere resultatene fra ARRAINA ved hjelp av et forsøk i større skala. Hvis ARRAINA-resultatene viste seg å stemme, ville det å ta i bruk de nye anbefalingene for vitamin- og mineraltilskudd i fiskefôr gi bedret vekst og fôrutnyttelse hos laksen. Fisken ville også bli mer robust, inneholde mer protein og mindre fett, og ha en forbedret mikronæringsstoffstatus. Dette er faktorer som vil gi bedre produktivitet, fiskevelferd og miljø i oppdrett.

Det viste seg imidlertid at fôrene som ble brukt i ASSESSFEED hadde en del mangler, blant annet var cobalamin og tiamin-nivåene for lave i begge forsøksfôrene (Tabell 2). Dette kan være årsaken til at vi ikke oppnådde bedre vekst hos fisken som fikk «ny næringspakke» (Ny NP). Vi fant imidlertid noenlunde lik sammenheng mellom vitaminnivå i fôr og fiskevev som i ARRAINA, noe som støtter ARRAINA resultatene (Figur 3) og viser at en justering av NP også er nødvendig for større fisk.

ASSESSFEED har i tillegg gitt oss rom til å kommunisere våre nye anbefalinger når det gjelder mikronæringsstoffer i laksefôr, basert både på ARRAINA og ASSESSFEED. Det er skrevet populærvitenskapelige publikasjoner om de nye mikronæringsstoffanbefalingene, en på norsk til Norsk Fiskeoppdrett og en på engelsk til Fish Farming Expert. Disse resultatene er også publisert på nifes.no og forskning.no, i et intervju med Intrafish og i form av en presentasjon på FHF dialogmøte i desember 2017. Det er også skrevet en populærvitenskapelig publikasjon om hypotesen at man kan forutse vekst i et forsøk ved hjelp av genuttrykk tidlig i forsøket.



### 3 Prosjektgjennomføring

Forsøket hadde tre behandlinger med fire parallelle merder (5x5x5 m<sup>3</sup>):

1. Standard næringsstoffpakke (vitaminer og mineraler; NRC 2011, 100 % NP)
2. Ny vitamin- og mineralblanding basert på ARRAINA resultater (Ny NP)
3. Kommersiell kontroll (BIOMAR)

Bortsett fra næringsstoffpakkene hadde fôrene, inkludert den kommersielle kontrollen, lik sammensetning (se appendix). Det ble fôret i 100 dager (startvekt ca. 110 g, sluttvekt 800-1000 g). Det ble gjennomført prøveuttak for næringsstoffanalyser ved start og slutt og filetkvalitet ved slutt. Fôropptak ble målt, slik at man kan beregne fôrfaktor (FCR) og næringsstoffretensjon. Fôret var tilsatt yttrium for å kunne måle opptak av næringsstoffer fra tarmen. Næringsstoffer som var tilsatt i forskjellig mengde i de to forsøksfôrene er vitamin C og E, 5 B-vitaminer og noen mineraler. Disse ble analysert i tillegg til fett, protein og tørrstoff i fôr og fisk.

#### 3.1 Filetkvalitet

Ved sluttuttaket ble 10 fisk per merd sendt fra GIFAS forskningsstasjon til Bodø med bil. Umiddelbart ved ankomst Bodø ble halestykket fra ryggfinnen og bakover skjært av alle fiskene. Fra fem utvalgte fisk per merd ble muskelblokker (0,5x0,5x0,5 cm) skjært ut ifra forkant av halestykket (NQC-snittet, Figur 3), dekket med Shandon Cryomatrix<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), raskt frosset ved nedsenking i 2-metylbutan kjølt til smeltepunkt

Tabell 2 Konsentrasjoner av vitaminer (mg/kg) i ASSESSFEED-fôrene. Målet var at fôret med 100 % NP skulle inneholde det samme som tilsvarende fôr i tabell 1, mens fôret med «ny NP» skulle inneholde vitaminer tilsvarende de nivåene som gir vevsmetning.

	100 % NP		ny NP	
	Formulert	Analysert	Formulert	Analysert
Pyridoksin, B <sub>6</sub>	6.8	5	12	8.7
Cobalamin	0.27	0.063	0.45	0.071
Folate	2	0.99	2	1.8
Pantothenic acid	16	13	50	42
Riboflavin	8.3	8.5	11	11
Biotin	0.38	0.41	0.38	0.39
Tiamin	6.4	2.4	10	1.9
Niacin	55	79	75	88
Vitamin C	63	57	200	201
Vitamin E	141	133	178	172

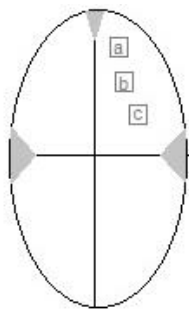
i flytende nitrogen (-159 °C), og oppbevart på -80 °C for videre analyse av muskelcellestørrelse. Antall analyserte fisk var imidlertid mindre enn prøveuttaket (100 % NP, n=8; Ny NP, n=12). Resterende del av fisken (10 fisk per merd) ble oppbevart på smeltende is frem til fisken hadde gått ut av rigor etter tre dager, da de ble analysert for tekstur.

Cellestørrelse ble målt ved hjelp av muskelhistologianalyse i henhold til Johnston et al., (1999). Muskelblokker ble kuttet på tvers av muskefibre med en tykkelse på 7 µm i en kryostat (CryoStar NX50 Thermo Fischer Scientific, MA, USA), montert på objektglass, og farget med hematoksylin (Harris hematoxylin, Merck, Tyskland). Snittene ble analysert ved hjelp av et lysmikroskop utstyrt med et digitalkamera (Axioskop 2 mot plus, Carl Zeiss, Tyskland) og bildeanalyseringsprogramvare (Axio Vision Rel. 4.2, Carl Zeiss). Omkretsen av minimum 450 muskelceller ble målt per fisk, og cellediameter og celleareal beregnet.

Teksturanalyse ble utført med en TA-XT2 PLUS tekstur analysator med Texture Expert Exceed 2.52 software (Stable Micro System, Surrey, England). En probe (10 mm diameter) trykkes ned i fiskens venstre filet på tvers av muskefibre på tre faste plasser under ryggfinneren. Proben trykkes ned til 60 % av fiskens tykkelse med en fart på 1 mm/sekund. Maksimal kraft i proben (N) og totalt arbeid (Areal; N/cm<sup>2</sup>) ble målt.

### 3.2 Genuttrykk

Prøver ble frosset inn i flytende N<sub>2</sub> ved prøveuttak. RNA-ekstraksjon og qPCR ble gjennomført ifølge standard prosedyrer på NIFES.



Figur 3 Viser hvor muskelblokker ble skjært ut fra NQC-snitt for analyse av muskelstruktur

## 4 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

### 4.1 Vitaminer

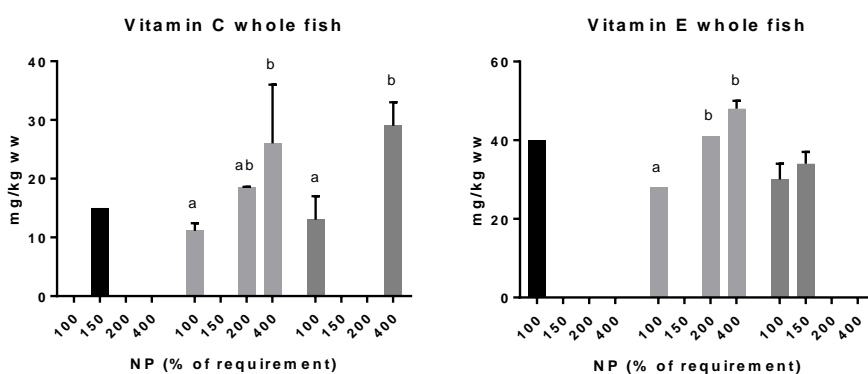
For vitamin C (Figur 4a) ble det oppnådd vevsmetning ved 100 % NP i regresjonsforsøket. I langtidsforsøket og i ASSESSFEED var det signifikant stigning i vevsnivå mellom fisk som fikk 100 og 400 % NP. Fisken i regresjonsforsøket så ut til å være oksidert og dette førte bl.a. til lav retensjon av vitamin C (se Hamre et al., 2016). Fisken i ARRANA langtidsforsøk og ASSESSFEED har like vevskonsentrasjoner av vitamin C i forhold til fôrkonsentrasjoner og bekrefter hverandre. Vi antar derfor at behovet for vitamin C ligger på 400 % NP (170 mg/kg).

Vitamin E (Figur 4a) er et fettløselig vitamin og viser sjelden vevsmetning. Tvert imot viser tidligere forsøk en lineær økning i kroppsnivå med økende mengde vitamin E i fôret opp til 400 mg/kg (Hamre 2011). Behovet er estimert til 150 mg/kg (100 %NP) ut fra tidligere forsøk. Økende vevskonsentrasjoner opp til 400%NP er indikert i langtidsforsøket i sjø og i ASSESSFEED.

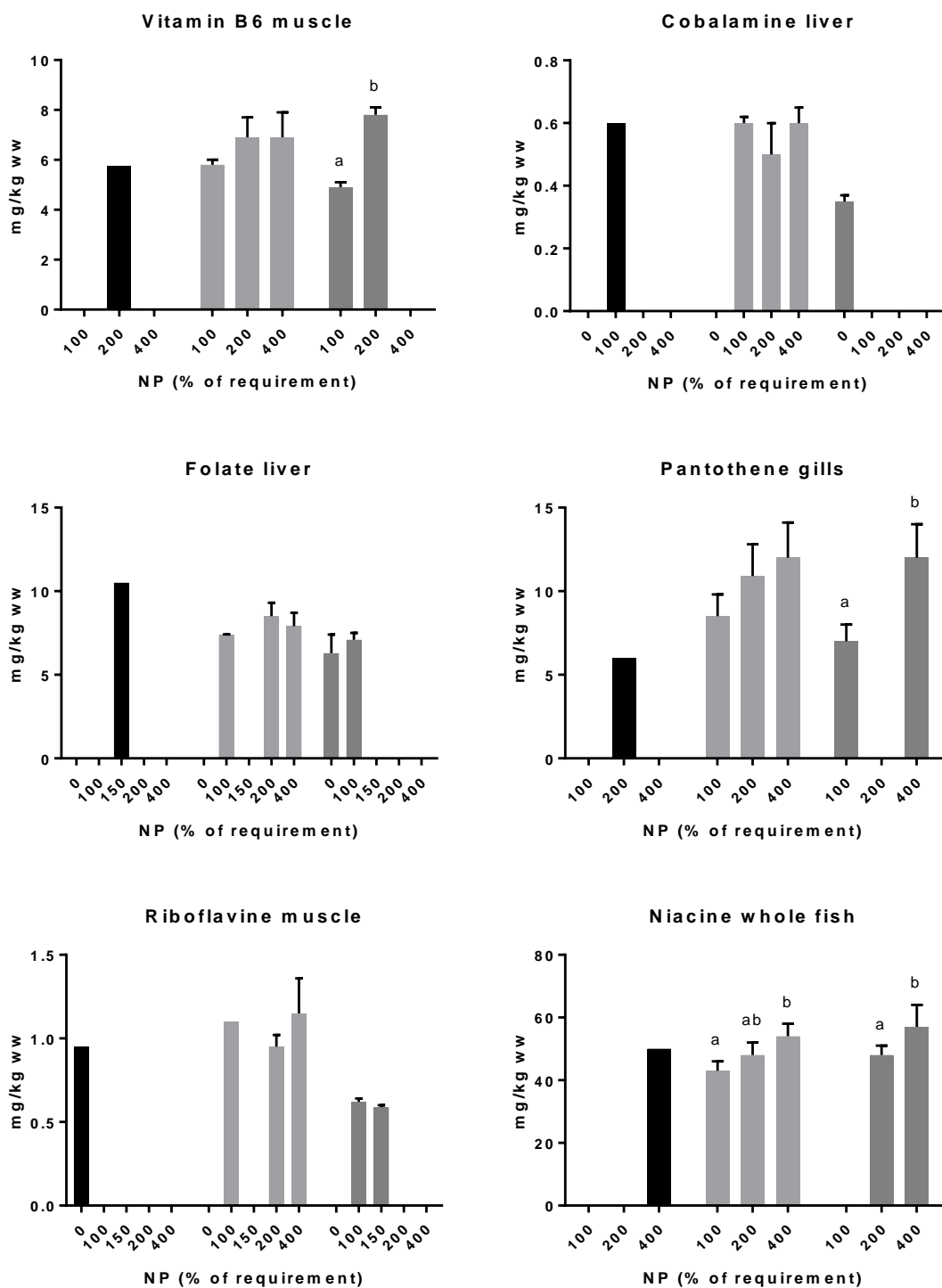
Figur 4b inneholder resultater fra analysene av vevskonsentrasjoner av B-vitaminer i ARRANA og ASSESSFEED:

- Vitamin B6 viste vevsmetning ved 200 % NP i regresjonsforsøket i ARRANA. I langtidsforsøket i sjø var det en tendens til økning i vevskonsentrasjon fra 100 til 200 % NP, der man oppnådde vevsmetning og i ASSESSFEED var det en signifikant økning i vevsnivå fra 100 til 200 % NP. Dette indikerer et behov tilsvarende 200 % NP og 10 mg/kg fôr.
- Cobalamin viste vevsmetning ved 100 % NP i regresjonsforsøket, noe som bekreftes i langtidsforsøket i sjø, hvor vevsnivået var likt ved 100-400 % NP. Cobalamin var ikke tilsatt ASSESSFEED-fôret, noe som resulterte i at konsentrasjonen i lever var halvert i forhold til de andre forsøkene. Dette indikerer et behov for cobalamin på 100 % NP eller 0.17 mg/kg fôr.
- Folat viste vevsmetning ved 200 % NP i regresjonsforsøket. I langtidsforsøket i sjø var det en tendens, men ikke signifikant økning i vevskonsentrasjon fra 100 til 200 % NP. I ASSESSFEED var tilsetningen av folat for lav i forhold til resultatene i ARRANA, sånn at man endte opp med henholdsvis 0 og 100 % NP som også ga en ikke signifikant tendens til økning i vevskonsentrasjon. Ut fra regresjonsforsøket i ARRANA ligger behovet for folat på 200 % NP eller 3,3 mg/kg, men resultatene fra de andre forsøkene har ikke styrke nok til å bekrefte dette. Det er derfor ønskelig med mer data for å kunne gi et sikkert behovsestimat.
- Pantoten viste vevsmetning på 200 % NP i regresjonsforsøket. I langtidsforsøket i ARRANA var det en tendens til økning i vevskonsentrasjon fra 100 til 200 og fra 200 til 400 % NP, men dette var ikke signifikant. I ASSESSFEED inneholdt fôret med Ny NP 300 % NP og vevsnivået var signifikant høyere i denne fisken enn i fisken som fikk 100 % NP. Behovet ser derfor ut til å ligge et sted mellom 200 og 400 % NP eller på 25-54 mg/kg fôr.

- Riboflavin viste vevsmetning uten tilsetning i fôret i regresjonsforsøket. Verken i langtidsforsøket i ARRAINA eller i ASSESSFEED var det forskjeller i vevskonsentrasjoner på ulike fôr. Dette viser at 100 % NP (6,8 mg/kg) i alle fall dekker behovet, i regresjonsforsøket var det nok riboflavin i fôringrediensene (2,7 mg/kg), men dette kan variere mellom fôrbatcher.
- Metning med tiamin ble funnet ved 100 % NP i regresjonsforsøket. Denne målingen ble gjort på muskel. I langtidsforsøket i sjø var det ingen forskjeller i konsentrasjon i hel kropp mellom fisk gitt 100-400 % NP. Dette bekrefter et behov på 100 % NP eller 6,2 mg/kg. Tiamin ble ikke målt i ASSESSFEED.
- For niacin ble det ikke oppnådd vevsmetning i regresjonsforsøket med opp til 400 % NP, noe som ble bekreftet både i langtidsforsøket i ARRAINA og i ASSESSFEED. Behovet ligger derfor på minst 400 % NP eller >110 mg/kg fôr.
- Biotin viste vevsmetning uten at det ble tilsatt fôret i regresjonsforsøket. I langtidsforsøket i ARRAINA var det ingen forskjeller i vevsnivå av biotin ved 100 til 400 % NP. Behovet er derfor i alle fall dekket med 100 % NP eller 0,4 mg/kg, men var i dette tilfellet dekket av fôringrediensene (0,25 mg/kg).



Figur 4a Vevsnivå av vitamin C og E fra ARRAINA (korttids regresjonsforsøk i sjø og langtidsforsøk i sjø) og ASSESSFEED. X-aksen angir nivå i fôret som NP, de konkrete næringsstoff-nivåene kan leses ut av Tabell 1. Den svarte kolonnen angir behov ut fra tidligere forsøk



Figur 4b Vevsnivå av B-vitaminer fra ARRAINA (korttids regresjonsforsøk i sjø (fisken vokste fra ca. 200 til 500 g) og langtidsforsøk i sjø (vekst ca. 0.1 til 2.3 kg) og ASSESSFEED (Vekst ca. 110-900 g). X-aksen angir nivå i fôret som % av NP, de konkrete næringsstoff-nivåene kan leses ut av Tabell 1. Den svarte kolonnen angir fôr- og vevsnivå ved vevsmetning i regresjonsforsøket.

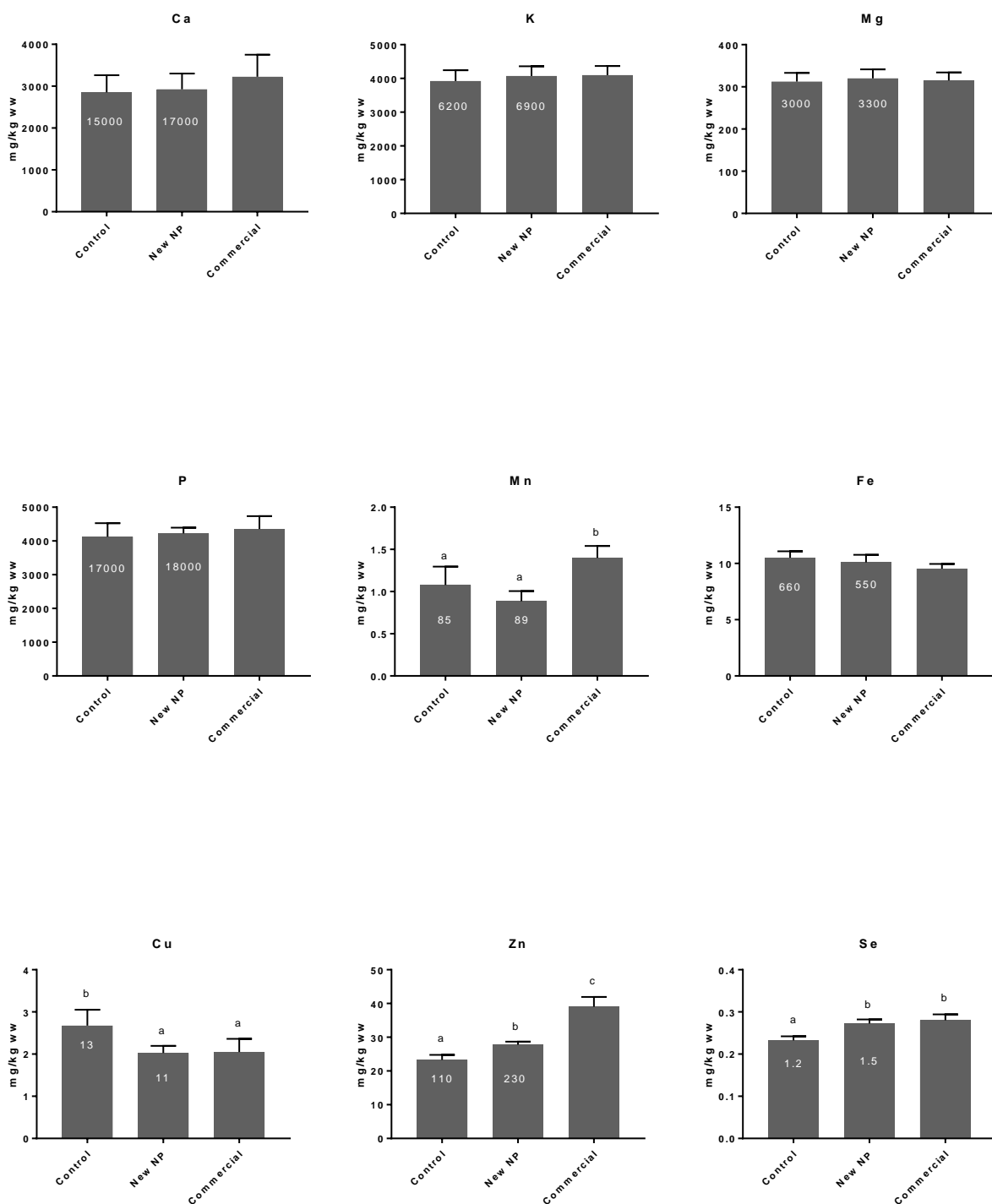
## 4.2 Mineraler

Resultatene når det gjelder mineraler i ARRANA-forsøkene er ikke publisert, derfor omhandler denne rapporten kun resultater fra ASSESSFEED. Generelt var fôrnivåene av en del mineraler svært høye, sammenlignet med det som var formulert på bakgrunn av ARRANA (Tabell 3). Likevel var vevsnivåene av mineraler sammenlignbare med de upubliserte resultatene fra ARRANA for Ca, K, Mg, P og Fe (Figur 5). Det var heller ikke forskjell i vevsnivå av disse næringsstoffene mellom fisk som hadde fått de ulike fôrene. Vevsnivå av Mn var sammenlignbar i fisk som hadde gått på forsøksfôrene, men høyere i fisk fra den kommersielle kontrollen. Vevsnivå av Cu ble senket av lavere kobbertilsetning i fôr med ny NP. Økning av Zn fra 110 til 230 mg/kg i fôret førte til økning av Zn i fisken, mens den kommersielle kontrollen hadde et ytterligere forhøyet vevsnivå av Zn. Selenkonsentrasjonen økte med økende nivå av Se i fôret og samsvarte godt med tidligere resultater fra regresjonsforsøket (Hamre et al., 2016). Mange av mineralene viser vevsmetning ved konsentrasjoner høyere enn behovet og det kan være årsaken til at de høye tilsetningsnivåene av mineraler i ASSESSFEED ga vevskonsentrasjoner som var sammenlignbare med ARRANA-forsøkene. Det kan imidlertid være forskjellige metningskurver for ulike organer, ulike mineral-forbindelser kan ha ulik biotilgjengelighet og sammensetning av fôrråvarer påvirker biotilgjengeligheten. En vurdering av mineralbehov hos laks på plantbaserte fôr vil bli gjort i forbindelse med publisering av mineral-resultatene fra ARRANA.

Tabell 3 Konsentrasjoner av mineraler (mg/kg) i ASSESSFEED-fôrene. Målet var at fôret med 100 % NP skulle inneholde det samme som tilsvarende fôr i ARRANA-forsøkene, mens fôret med «ny NP» skulle inneholde mineraler tilsvarende de nivåene som gir vevsmetning, som ofte var lavere enn 100 % NP. Det var i en del tilfeller store forskjeller mellom formulert og analysert innhold.

	100 % NP		Ny NP	
	Formulering	Analyse	Formulering	Analyse
Selen	0.8	1.2	1	1.5
Kopper	13.4	13	9	11
Mangan	51	85	40	89
Jern	424	660	250	550
Sink	115	110	180	230
Kalsium	4920	15000	4920	17000
Magnesium	1920	3000	1920	3300
Fosfor	15000	17000	15000	18000





Figur 5 Nivå av mineraler i hel kropp fra ASSESSFEED (mg/kg våtvekt). Fisken ble gitt fôr tilsatt ulike nivå av næringsstoffer. De konkrete næringsstoff-nivåene i fôrene er angitt i Tabell 3 og som tall i kolonnene i figuren.

Tabell 4 Lengde, rundvekt, Kondisjonsfaktor (KF) og sløydvekt av fisk som ble brukt til tekstur analyse (Snitt±SD, N=40)

	Lengde cm	Rundvekt g	KF	Sløyd vekt g
100%NP	41,8±1,7	916±119 <sup>a</sup>	1,25±0,06	795±124 <sup>a</sup>
Ny NP	42,7±1,8	986±131 <sup>b</sup>	1,26±0,06	847±99 <sup>ab</sup>
Biomar	42,6±1,9	984±138 <sup>b</sup>	1,26±0,06	857±119 <sup>b</sup>

Ulike bokstaver betyr signifikant forskjell mellom gruppene (p<0.05)

### 4.3 Filetkvalitet

Blant den fisken som var tatt ut til kvalitetsmålingene, var det forskjell i rundvekt og sløydvekt mellom gruppene, fisken gitt 100% NP var minst. Det var større hardhet (Tabell 5) og muskelcellene var mindre (Tabell 6) i fisk som fikk fôr med 100 % NP enn i den som fikk Ny NP. Frekvensen av ulike cellestørrelser (Figur 6) viser at cellepopulasjonen i fisk som fikk fôr med Ny NP besto av færre små og flere store celler sammenlignet med fisk som fikk fôr med 100 % NP. Figur A1 (Appendix) viser at fôrene hadde en klar effekt på hardhet som ikke var størrelsesavhengig.

Muskelen kan vokse enten ved hypertrofi (vekst av hver enkelt celle) eller hyperplasi (vekst i antall celler). I dette studiet er ikke totalt antall celler i kotelettens tverrsnitt målt, men sløydvekt kan antyde hvilken mekanisme som har vært virksom. Det var signifikant forskjell i størrelse mellom fisk fra 100 % NP og Ny NP i de 40 fisk per gruppe som ble tatt ut til tekstur og en tendens til forskjell i sløydvekt mellom gruppene for fisken som ble brukt til muskelanalyse (p=0.055), mens lengden var lik (p=0.31). Siden cellene også var størst i fisk som fikk ny NP, kan man anta at denne fisken har hatt bedre vekst på grunn av hypertrofi. En alternativ forklaring er at fisken gitt 100% NP hadde økt nyrekruttering av celler, som ville gitt utgangspunkt for bedre vekst senere, men dette virker mindre sannsynlig.

For å lete etter mulige mekanismer for hypertrofi i fisk gitt Ny NP, har vi analysert sammensetning av makronæringsstoffer i muskel, lever og hel fisk, samt frie aminosyrer og andre nitrogenforbindelser i muskel. Det var et signifikant høyere tørrstoffinnhold i muskel fra fisk gitt Ny NP enn 100 % NP (Tabell 7). Ellers var det ingen forskjeller i makronæringsstoffer, verken i muskel, lever eller hel fisk, mellom gruppene (Appendix).

Tabell 5 Hardhet (Max kraft) og det totale arbeidet (Areal) proben bruker på å presse 60 % ned i fileten. (Snitt±SD, N; Newton)

	Hardhet / Max kraft (N)	Areal (N/cm <sup>2</sup> )
100 % NP	5,77 ± 0,77 <sup>a</sup>	15,99 ± 3,46
Ny NP	5,18 ± 0,58 <sup>b</sup>	16,13 ± 3,32
Biomar	5,24 ± 0,65 <sup>b</sup>	16,41 ± 3,07

Ulike bokstaver betyr signifikant forskjell mellom gruppene (p<0.05)

Tabell 6 Gjennomsnittlig størrelse på muskelceller målt som areal ( $\mu\text{m}^2$ ), omkrets og diameter ( $\mu\text{m}$ ), samt den målte fiskens sløyd vekt (g) og lengde (cm, Snitt $\pm$ SEM, N=8 (100%NP) eller 12 (Ny NP)). Minimum 450 celler ble målt per fisk.

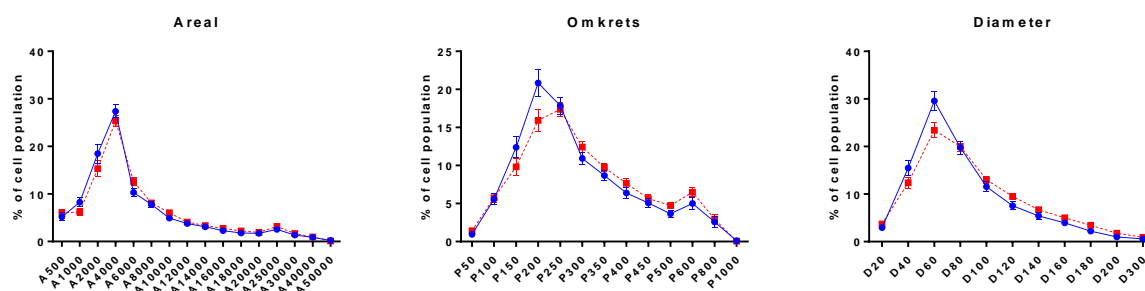
	Areal	Omkrets	Diameter	Lengde	Sl vekt
100% NP	5190 $\pm$ 470 <sup>b</sup>	250 $\pm$ 10 <sup>b</sup>	71 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	41 $\pm$ 1	745 $\pm$ 41
Ny NP	6520 $\pm$ 270 <sup>a</sup>	280 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	42 $\pm$ 1	846 $\pm$ 30

Ulike bokstaver betyr signifikant forskjell mellom gruppene (p<0.05)

Av frie aminosyrer var glutamin og lysin høyest i fisk gitt Ny NP. Frie aminosyrer er dem som ikke er bundet til protein men er tilgjengelig i for å kunne inngå i ulike biokjemiske prosesser. Dette er også tilfelle for andre N-metabolitter. Av N-metabolittene var cystathionin lavere og Beta-alanin høyere i fisk gitt Ny NP. Det var ingen forskjeller i aminosyresammensetning mellom fôrene, og dette antyder at ulik mineral og vitaminblanding påvirket metabolismen i fisken.

Vitamin C og E, vitamin B6, pantoten og niacin var de vitaminene der status i fisken var påvirket av fôrene (Figur 4). Det var også forskjeller i status mellom gruppene for Cu, Zn og Se (Figur 5). Det er selvfølgelig vanskelig å si hvilke næringsstoffer som spilte en rolle for forskjellene i filetkvalitet, men vi kan peke på noen sammenhenger som er kjent fra litteraturen.

Cystationin er en del av metabolismeveien fra homocystein til taurin eller glutation og dannelselse og nedbryting av cystathionin ved enzymet cyststionine synthase er avhengig av vitamin B6. Dette er første og hastighetsbegrensende enzym ved nedbrytning av svovelaminosyrer, også kalt transsulfurering. Alternativet kan homocystein kan remetyleres til metionin. I den ene av to metabolismeveier fra homocystein til metionin, er vitamin B12 cofaktor og folat metyldonor (Espe et al 2008). Det er kjent at plasma- og urin-konsentrasjonen av cystationin øker ved mangel på vitamin B6, vitamin B12 eller folat (Stabler et al., 2018). Den økte konsentrasjonen av cystationin er derfor en tilleggs-indikasjon på mangel på ett eller flere av disse vitaminene i 100 % NP-gruppen. Cystationin konsentrasjonen kan også påvirkes av mengde metionin i fôret (Espe et al 2008; 2014), men i dette forsøket, var ikke fôrenes metionin-innhold forskjellig.



Figur 6 Andel av cellepopulasjonen fordelt på klasser av areal, omkrets eller diameter. A500 angir areal under 500  $\mu\text{m}^2$ , A1000 angir celler med areal 500-1000  $\mu\text{m}^2$  osv. Omkrets og diameter er gitt i  $\mu\text{m}$ . (Snitt $\pm$ SEM, N=8 (100 % NP) eller 12 (Ny NP)).

Glutamin inneholder en  $\epsilon$ -aminogruppe og brukes til transport og lagring av  $\text{NH}_3$  i forbindelse både med nedbrytning og syntese av nitrogenholdige stoffer. Muskelen er det organet som inneholder mest glutamin hos mammalier. Glutamin er en ikke essensiell aminosyre, men dannes fra og omdannes til glutamat ved hjelp av binding eller avspalting av  $\epsilon$ -aminogruppen. Høyere konsentrasjon av glutamin i muskelen hos fisk gitt Ny NP, kan kanskje tyde på en mer aktiv proteinomsetning og/eller syntese av ikke essensielle aminosyrer.

Lysin er en essensiell aminosyre i fisk som i mennesker (NRC 2011). Det meste av lysinet som blir inntatt blir deponert i muskelen, dog vil en mindre andel gå til syntese av metabolitter som for eksempel carnitin. Her er forets lysinkonsentrasjon lik, men likevel er det en forskjell i muskelens innhold av fritt lysin. Det at fritt lysin er nesten dobbelt så høy i fisk som har fått ny NP sammenlignet med 100 % NP, kan tyde på at det er større turnover av muskelprotein i denne fisken. Dette bør imidlertid undersøkes nærmere.

Tabell 7 Endringer i muskelen hos fisk føret med 100% NP og Ny NP. (Snitt $\pm$ SD, n=4). Resterende data på makronæringsstoffer i hel fisk og lever, samt frie aminosyrer og andre N-metabolitter i muskel er gitt i Appendix)

	100 % NP	Ny NP
Tørrstoff (%)	25,5 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	26,2 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>
Sum frie AA ( $\mu\text{mol/g WW}$ )	11,9 $\pm$ 0,9	12,0 $\pm$ 0,8
L-Glutamin	0,33 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
L-Lysin	0,26 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,42 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
Andre N-metabolitter ( $\mu\text{mol/g WW}$ )		
Cystathionin2	0,10 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
Beta-Alanin	0,28 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>

Beta-alanin er en del av peptidet carnosin som er til stede i høy konsentrasjon og fungerer som buffer i cellene. Det var ikke forskjell i carnosin mellom gruppene (Appendix). Beta-alanin inngår også i pantotensyre som var forhøyet i muskelen hos fisk som fikk Ny NP (Figur 4b).

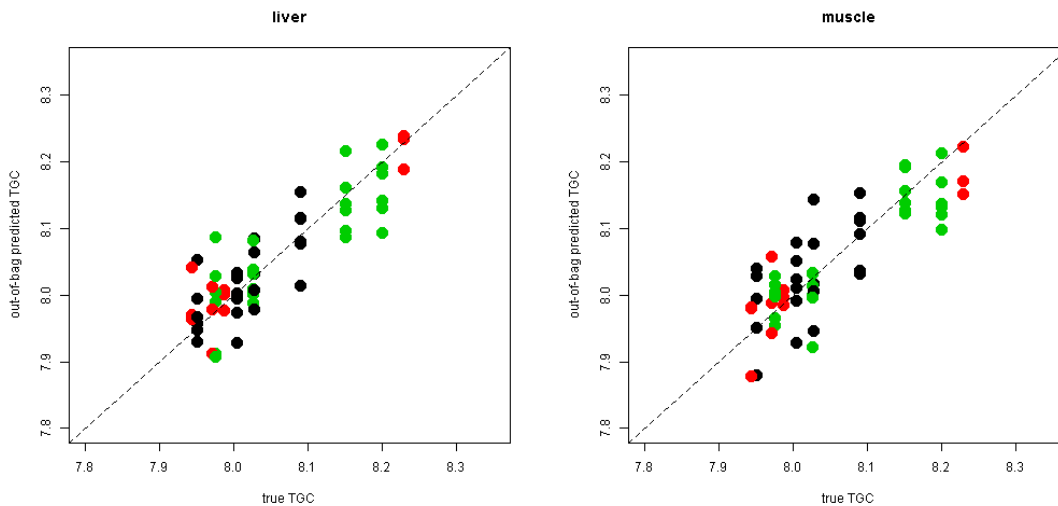
Oppsummert, var det en tendens til høyere sløydvekt og signifikant mindre hardhet og større muskelceller i fisk gitt Ny NP, sammenlignet med 100 % NP. Dette falt sammen med økt tørrvekt og noen forskjeller i frie aminosyrer og N metabolitter i muskelen, som kan tyde på endringer i proteinomsetningen. Det trengs flere data hvis man skal forklare mekanismene nærmere.

#### 4.4 Kan tidlig genuttrykk brukes til å forutsi vekst i et forsøk?

Målet for denne aktiviteten var å utvikle en metode som i løpet av uker kan vise potensielle effekter av ulike forsøksbetingelser, f.eks. nye fôrresepter, på vekst og fôrutnyttelse hos laks. Siden ASSESSFEED ikke ga forskjell i vekst mellom de ulike forsøksgruppene, ble modellen konstruert basert på vekst per merd. Resultatene viser at modellen ga god sammenheng mellom tidlig genuttrykk og temperaturavhengig vekst ( $R^2$  hhv 0,88 og 0,83 for lever og muskel, Figur 7). Man må likevel gjøre flere forsøk for å undersøke modellens egnethet og robusthet.

#### Konklusjon:

Dette er en lovende metode for raskere utprøving av ulike fôrresepter. Man trenger likevel flere forsøk ved ulike eksperimentelle betingelser for å undersøke metodens egnethet og robusthet.



Figur 7 Scatter plot som viser sammenhengen mellom sann og predikert TGC (skalert 1000 gg). Det er brukt en modell som predikerer TGC basert på hhv lever (20 gener) og muskel (17 gener) genuttrykk de første 2-5 ukene, plottet mot sann TGC målt etter 100 dager. Den stiplede linjen viser  $y=x$  og de fargete punktene representerer merder på samme fôr.

Tabell 8. Målte genuttrykk i lever, muskel, hodenyre og røde blodceller i uke 2, 3, 4 og 5 som ble brukt til å konstruere modeller til å forutse vekst og fôrutnyttelse i hele forsøket som varte i 100 dager.

	Liver	Muscle	HK	RBC	Underlying reason
APOE	✓				INUTR project (unpublished)
BANF			✓		Immunological indicator
C3			✓	✓	ARRAINA db (Mauri et al., 2011, Fish Shellfish Immunol; Bado Nilles et al., 2011, Ecotox Environ Safe; Guardiola et al., 2012, Aquaculture; Reyes-Becerril et al., 2011a, b, Fish Shellfish Immunol)
CANPN1	✓				Cell mobility and tissue remodeling indicator
CANPN2	✓				Cell mobility and tissue remodeling indicator
CAT			✓	✓	ARRAINA db (Espe & Holen 2013)
CD4			✓	✓	ARRAINA db (Mikalsen et al., 2012, PlosOne)
COX1	✓	✓			ARRAINA db (Martinez-Rubio et al., 2012, PlosOne; Holen et al., 2011, Fish Shellfish Immunol)
COX2	✓	✓			ARRAINA db (Martinez-Rubio et al., 2012, PlosOne; Holen et al., 2011, Fish Shellfish Immunol)
CPT1A	✓	✓			Beta-oxidation capacity indicator
CS	✓	✓			Lipogenesis and ROR-alpha signaling indicator
CTSD	✓	✓			ARRAINA db (Acerete et al., 2007, Comp Biochem Phys B)
CTSL1	✓	✓			Tissue remodeling indicator
CuZnSOD			✓	✓	ARRAINA db (Fontagné et al., 2008; Tovar-Ramirez et al., 2010; Pérez-Sánchez et al., unpublished)
DREL1	✓	✓			ARRAINA db (Calduch-Giner et al., 2010)
GHR1	✓	✓			Growth stimulation indicator
GPx1			✓	✓	ARRAINA db (Espe & Holen 2013 and others)
HAMP			✓		ARRAINA db (Reyes-Becerril et al., 2011a, b, Fish Shellfish Immunol; Calduch-Giner et al., 2010, BMC Genomics)
HSP10	✓	✓			Mitochondrial stress indicator
HSPA8	✓	✓			ARRAINA db (Holen et al. 2011)
IGF1	✓	✓			ARRAINA db (Hevrøy et al. 2008, Valente et al., 2012)
IGF2	✓	✓			ARRAINA db (Hevrøy et al. 2008; Sissener et al. 2013 online; Valente et al. 2012; others)
IGFBP1B	✓				IGF activity indicator
LTB4R1			✓		ARRAINA db (Martinez-Rubio et al., 2012, PlosOne)
LXR	✓	✓			Immunological indicator
MEFA		✓			Growth stimulation indicator
MEFA2C		✓			Growth stimulation indicator
MMP-9				✓	ARRAINA db (Ytteborg et al., 2010ab, BMC Physiol; Cabas et al., 2012, Dev Comp Immunol)
MnSOD			✓	✓	ARRAINA db (Fontagné et al., 2008; Pérez-Sánchez et al., unpublished)
MT-ND2	✓	✓			Respiratory activity indicator
MYF5		✓			ARRAINA db (Valente et al., 2012)
PCNA			✓		ARRAINA db (Servili et al., 2009; Alami-Durante et al., 2010)
PPARA	✓	✓			ARRAINA db (Espe & Holen 2013)
PPARG	✓	✓			Indicator of peroxisome proliferation and metabolic alterations
PPARGC1A	✓	✓			Indicator of peroxisome proliferation and metabolic alterations
PTX	✓				INUTR project (unpublished)
SIRT	✓	✓			Stress and protein deacetylation marker
TLR5			✓	✓	ARRAINA db
TNF1A-a	✓	✓			ARRAINA db (Holen et al., 2011, Fish Shellfish Immunol)
TNF1A-b	✓	✓			ARRAINA db (Holen et al., 2011, Fish Shellfish Immunol)
UCP1	✓				Respiratory uncoupling indicator



## 5 Konklusjoner

- Vevsmetning av vannløselige vitaminer kan brukes som kriterium for at behovet er dekket.
- Nye anbefalinger når det gjelder tilsetning av B-vitaminer, vitamin C og E til plantebasert laksefôr er gitt i tabell 9.
- Konsentrasjoner av mineraler i hel fisk og fôr samsvarer med tidligere upubliserte studier. Nye anbefalinger vil bli gitt senere.
- Det var ingen forskjeller i vekst mellom fisk gitt de ulike fôrene i dette studiet.
- Fôr med mikronæringsstoffer i henhold til nye anbefalinger (Ny NP) ga en tendens til høyere sløydvekt og signifikant mindre hardhet og større muskelceller sammenlignet med gamle anbefalinger (100 % NP). Dette falt sammen med økt tørrvekt og noen forskjeller i frie aminosyrer og N metabolitter i muskelen, som kan tyde på at det var høyere muskelvekst (hypertrofi) og økt proteinomsetningen i denne gruppen.
- Modellen som skal kunne forutse vekst og fôrutnyttelse ved hjelp av tidlig analyse av genuttrykk må verifiseres i flere forsøk med ulike betingelser.

Tabell 9 Nye anbefalinger for vitamintilsetning (mg/kg) i fôr til laks på under 0.5kg i sjø ved utfordrende betingelser (basert på ARRAINA). Tall fra NRC (2011) er stort sett fra forsøk med regnbueørret. \* Behovet for folat bør verifiseres med flere forsøk.

	NRC (2011)	ARRAINA (sjø)
Pyridoksin, B6	2-16	10
Biotin	0.05-0.14	0.3
Cobalamin	0.02	0.17
Folat	1-2	-*
Pantoten	20	31
Riboflavin	4-7	6.8
Tiamin	1-10	6.2
Niacin	1-10	>110
Vitamin C	20	190
Vitamin E	50	150

## 6 Referanser

- Espe M., Hevrøy E.M., Liaset B., Lemme A., El-Mowafi A. 2008. Methionine intake affect hepatic sulphur metabolism in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 274, 132-141.
- Espe M, Andersen SM, Holen E, Rønnestad I, Veiseth-Kent E, Zerrahn J-E, Aksnes A. 2014. Methionine deficiency does not increase polyamine turnover through depletion of liver S-adenosylmethionine (SAM) in juvenile Atlantic salmon. *Br J Nutr.*, 112, 1274-1283
- Johnston, I. A. 1999. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. *Aquaculture* 177, 99-115.
- Hamre, K., 2011. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aquaculture Nutrition* 17, 98-115.
- Hamre, K., Sissener, N.H., Lock, E.-J., Olsvik, P.A., Espe, M., Torstensen, B.E., Silva, J., Johansen, J., Waagbø, R., Hemre, G.-I., 2016. Antioxidant nutrition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt, fed diets with high inclusion of plant ingredients and graded levels of micronutrients and selected amino acids. *PeerJ* 4:e2688 <https://doi.org/10.7717/peerj.2688>.
- Hansen AC, Waagbø R and Hemre GI (2015). New B vitamin recommendations in fish when fed plant-based diets. *Aquaculture Nutrition*, 21, 507-527. doi: 10.1111/anu.12342.
- Hemre, G., Lock, E., Olsvik, P.A., Hamre, K., Espe, M., Torstensen, B.E., Silva, J., Hansen, A., Waagbø, R., Johansen, J.S., Sanden, M., Sissener, N.H., 2016. Atlantic salmon (*Salmo salar*) require increased dietary levels of B-vitamins when fed diets with high inclusion of plant based ingredients. *PeerJ* 4:e2493, <https://doi.org/10.7717/peerj.2493>.
- Larsson, T., Koppang, E.O., Espe, M., Terjesen, B.F., Krasnov, A., Moreno, H.M., Rorvik, K.A., Thomassen, M., Morkore, T., 2014. Fillet quality and health of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed a diet supplemented with glutamate. *Aquaculture* 426, 288-295.
- NRC, 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academic Press, Washington D.C.
- Stabler, S.P., Lindenbom, J., Savage, D.G., Allen, R.H. 1993. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 81, 3404-3413.

## 7 APPENDIX

### Faglig sluttrapport FHF-prosjekt 901341 Validering av optimale mikronæringsstoffnivå i laksefôr (ASSESSFEED)

Tabell A1 Sammensetning av og teoretisk innhold av makronæringsstoffer i fôrene

<b>Ingredients</b>	100NP (%)	Ny NP (%)	Biomar (%)
Fish meal LT	10	10	10
Fish meal SA	10	10	10
Krill meal	4,2	4,2	4,2
Soy protein concentrate	14,96	14,96	14,96
Pea protein concentrate	10,2	10,2	10,2
Wheat glúten	10	10	10
Corn glúten	5	5	5
Wheat meal	10,13	10,13	10,13
Fish oil	9,99	9,99	9,99
Rapeseed oil	10	10	10
Monocalcium phosphate	3,36	3,36	3,36
Lucantin Pink (astaxanthin)	0,05	0,05	0,05
Yttrium oxide	0,05	0,05	0,05
Amino acid mix	1,46	1,46	1,46
Premix 100NP	0,6	0	0
Premix NEW_NP	0	0,6	0
Premix BIOMAR	0	0	0,6
Total	100	100	100
<b>Gross composition (as fed)</b>	100NP (%)	Ny NP (%)	Biomar (%)
Crude protein	46,280	46,280	46,280
Crude fat	22,679	22,679	22,679
Fiber	1,005	1,005	1,005
Ash	6,823	6,823	6,823
Gross energy	22,787	22,787	22,787
Total P	1,499	1,499	1,499
Ca	1,664	1,664	1,664
Na	0,153	0,153	0,153

Tabell A2 Tørrstoff, fett og protein i muskel, lever og hel fisk avhengig av fôrene. (Snitt±SD, n=4)

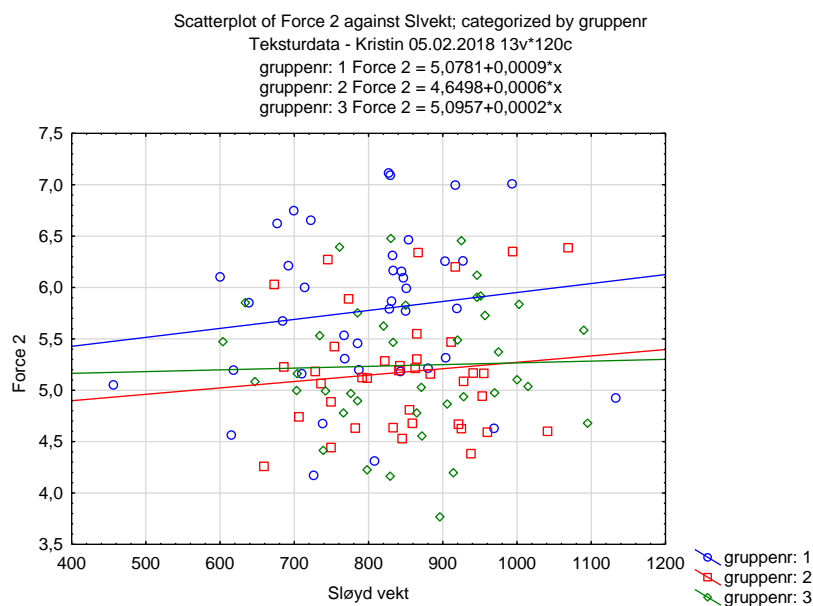
	100% NPI	New NP	Biomar
<b>Muscle</b>			
Dry matter	25,5±0,4 <sup>a</sup>	26,2±0,5 <sup>b</sup>	26,0±0,3 <sup>ab</sup>
Lipid	3,7±0,1	3,9±0,2	3,9±0,2
Protein	21,0±0,8	21,3±0,5	21,0±0,0
<b>Liver</b>			
Lipid	4,6±0,1	4,7±0,2	4,9±0,1
Protein	20±3	18±1	18±0
<b>Whole body</b>			
Dry matter	33±0	33±0	33±0
Lipid	12,4±0,3	12,7±0,1	13,0±0,2
Protein	18,3±0,5	18,5±0,6	18,5±0,6

Tabell A3 Frie aminosyrer ( $\mu\text{mol/g WW}$ ) i muskelen avhengig av fôrene (Snitt $\pm$ SD, n=4)

	100% NP	New NP	Biomar
Taurine	0,91 $\pm$ 0,12	0,83 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,11
L-Aspartic acid	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
Hydroxy-L-Proline	0,44 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,34 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
L-Threonine	0,28 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,07
L-Serine	0,24 $\pm$ 0,07	0,27 $\pm$ 0,07	0,18 $\pm$ 0,04
L-Asparagine	0,02 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00
L-Glutamic acid	0,63 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,08	0,58 $\pm$ 0,06
L-Glutamine	0,33 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,46 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,38 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>
L-Proline	1,03 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,07
L-Glycine	1,78 $\pm$ 0,25	1,59 $\pm$ 0,15	1,48 $\pm$ 0,22
L-Alanine	2,39 $\pm$ 0,26	2,44 $\pm$ 0,23	2,31 $\pm$ 0,26
L-Valine	0,21 $\pm$ 0,04	0,25 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,04
L-Cystine	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
L-Methionine	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,01
L-Isoleucine	0,07 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01
L-Leucine	0,25 $\pm$ 0,05	0,32 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,04
L-Tyrosine	0,39 $\pm$ 0,04	0,35 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,18
L-Phenylalanine	0,15 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,03
L-Lysine	0,26 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	0,42 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,30 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
L-Histidine	2,24 $\pm$ 0,21	2,14 $\pm$ 0,09	2,37 $\pm$ 0,34
L-Tryptophan	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Arginine	0,15 $\pm$ 0,04	0,16 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,04
Sum	11,9 $\pm$ 0,9	12,0 $\pm$ 0,8	11,2 $\pm$ 1,4

Tabell A4 Nitrogenmetabolitter ( $\mu\text{mol/g WW}$ ) i muskelen (Snitt $\pm$ SD, n=4)

	Control	New NP	Commercial
O-Phosphoethanolamine	0,053 $\pm$ 0,005	0,048 $\pm$ 0,005	0,048 $\pm$ 0,005
Urea	0,38 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,03
L-Citrulline	0,10 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,02
L-Alfa-Amino-n-Butyric acid	0,060 $\pm$ 0,000	0,058 $\pm$ 0,005	0,055 $\pm$ 0,010
Cystathionine2	0,10 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,02 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	0,02 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup>
B-Alanine	0,28 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	0,38 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>
Ammonium chloride	5,7 $\pm$ 0,2	5,6 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,6
L-Ornithine	0,060 $\pm$ 0,008	0,038 $\pm$ 0,005	0,038 $\pm$ 0,005
1-Methyl-L-Histidine	0,090 $\pm$ 0,016	0,098 $\pm$ 0,022	0,090 $\pm$ 0,020
Anserine	22,9 $\pm$ 0,7	23,4 $\pm$ 0,5	22,9 $\pm$ 2,4
Carnosine	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>



Figur A1 Filetkvalitet. Regresjon som viser sammenheng mellom sløyd vekt og hardhet (Force 2). for de ulike gruppene Gr.1 = 100% NP, Gr. 2=Ny NP, Gr.3 = Biomar. Man ser at størrelsen på fisken påvirker hardhet en del, men at det er en klar størrelsesuavhengig forskjell mellom 100% NP og Ny NP (+Biomar) når det gjelder filetkvalitet.



Retur: Havforskningsinstituttet, Postboks 1870 Nordnes, NO-5817 Bergen

**HAVFORSKNINGSINSTITUTTET**  
**Institute of Marine Research**

Nordnesgaten 50 – Postboks 1870 Nordnes  
NO-5817 Bergen  
Tlf.: +47 55 23 85 00  
E-post: [post@hi.no](mailto:post@hi.no)

**[www.hi.no](http://www.hi.no)**

