



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

Melaninflekker i filet hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Forekomst av og næringsinnhold i melaninflekker

Gina Emilie Hansen

Masteroppgave i akvamedisin (60 stp.) BIO-9955

Mai 2024



**Melaninflekker i filet hos atlantisk laks (*Salmo salar* L.):
Forekomst og næringsinnhold i filet**

Gina Emilie Hansen

Masteroppgave i akvamedisin (60 stp.)

Norges fiskerihøgskole

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi

UiT Norges arktiske universitet
Mai 2024



Forord

Etter fem meget raske år, er det både godt og vemodig å skulle avslutte dette kapitlet på Norges fiskerihøgskole. Det har vært en fin opplevelse å være student, samtidig som jeg har vokst enormt som person og ikke minst kunnskapsmessig. Sitter igjen med en stor takknemlighet over disse årene, og gleder meg til å ta fatt på «voksenlivet» og ny jobb.

Vil rette en stor takk til mitt «team» av fantastiske veiledere, som for hvert møte vi har hatt har fått meg til å føle at jeg har kontroll – selv i stressende tider. Takk til Mari Johannessen Walquist, for at du har vist meg en veldig fin måte å håndtere planlegging og utførelse av denne masteren, det vil jeg ta videre med meg i livet. Takk til Tore Seternes for din uvurderlige kunnskap og ditt engasjement rundt valgt tema, samt gode tilbakemeldinger, du har vært til stor hjelp. Takk til Karl-Erik Eilertsen for å bistå i veilederteamet med gode diskusjoner, tilbakemeldinger og din brede kunnskap.

Jeg er også uendelig takknemlig for all hjelp jeg har fått fra Guro Kristine Edvinsen og Tone Friis Aune under labarbeidet. Dere er kunnskapsrike, løsningsorienterte og ikke minst tålmodige – dere har vært til stor hjelp!

En stor takk til mine venner og familie for at dere alltid er der for meg på hver deres måte. Disse årene hadde aldri gått uten dere.

Vil også takke de selskapene som har gitt meg råmateriale og rådata til oppgaven, det har vært til stor hjelp.

Gina Emilie Hansen

Tromsø, mai 2024

Sammendrag

Oppdrettsnæringen har hatt betydelig vekst over flere tiår. Norge er i verdenstoppen av produksjon og eksport, og forbrukermarkedet stiller strenge kvalitetskrav til produktet. Melaninflekker er en mørkfarging i laksefileten og betegnes som et stort kvalitetsavvik, som fører til reklamasjoner og et svekket omdømme, og ikke minst et enormt økonomisk tap. Foreslåtte årsakssammenhenger til melaninflekker er mange, og melaninflekker beskrives som en lokal betennelsestilstand i laksefilet, med tilstedeværelse av betennelsesceller.

I denne masteroppgaven ble næringsinnhold i form av fettinnhold, fettsyresammensetning og fettclassesammensetning analysert i melaninflekker og i omliggende vev uten melanin. Metoder valgt for analysene var fettekstraksjon med etylacetat, gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor og høypresisjon-væskekromatografi. Et datasett fra et slakteri med fileteringslinje ble i tillegg undersøkt, der melaninfileter ble registrert under kontrolltelling. Forekomsten av melaninflekker har de siste 20 årene økt betydelig, og oppdrettsselskapene taper store summer på nedklassifisering av melaninfileter, der flekkene skjæres vekk eller filetene kasseres hel. Det er derfor interessant å se på hva melaninflekkene består av, for å bygge forståelse for hva det er som kasseres og gir økonomisk tap.

Totalt sett var det marginale forskjeller i fettinnhold og fettsyresammensetning, og det er lite som antyder at melanisering påvirker fettinnhold- og fettsyresammensetning i filetene. Det ble observert en lavere konsentrasjon av TAG og en høyere konsentrasjon av FFA, DAG og FAlc i melaninfiletene sammenlignet med kontrollfiletene og punkter utfor melaninflekk, noe som kan tyde på en økt hydrolyseaktivitet av fett i melaninflekkene. Forekomsten av melaninflekkene ble på det aktuelle slakteriet funnet til å være lavest i 2017, høyest i 2018 og jevnt rundt 13 % fra 2019-2022.

Basert på resultatene og tidligere studier kan det antydes fettsyresammensetning og fettinnhold i og rundt melaninflekkene blir lite påvirket av melanisering, samt en litt større påvirkning på fettklasser. Det er i tillegg lite som forklarer forekomsten ved dette slakteriet de aktuelle årene.

Innholdsfortegnelse

Forord	
Sammendrag	
1 Innledning	1
Formål	3
2 Bakgrunn	4
2.1 Helse og sjømat	4
2.2 Atlantisk laks	5
2.3 Lipider	5
2.4 Melanin	7
2.5 Melaninflekker	9
2.5.1 Årsakssammenhenger	10
2.5.2 Forekomst	11
2.5.3 Utfordring	11
3 Materialer og metoder	12
3.1 Forsøksdesign	12
3.2 Innhenting av råmateriale	13
3.3 Innhenting og bearbeiding av data	13
3.4 Bearbeiding av kontrollfileter og melaninfileter	14
3.5 Kjemikalier	15
3.6 Vanninnhold	16
3.7 Fettinnhold	16
3.7.1 Fettekstraksjon med Folchs med sentrifugering	16
3.7.2 Fettekstraksjon med etylacetat	17
3.7.3 Fettsyresammensetning	18
3.7.4 Fettklassesammensetning	19
4 Resultater	20

4.1	Metodeutprøving	20
4.2	Vanninnhold	20
4.3	Fettinnhold	21
4.4	Fettsyresammensetning	21
4.4.1	Mengde fettsyre pr. 100 g fett	21
4.5	Fettklasser påvist ved HPLC	24
4.6	Fettklasser påvist ved tynnsjikt-kromatografi	26
4.7	Forekomst av melaninflekker	27
5	Diskusjon	29
5.1	Metodeutprøving	29
5.2	Fettinnhold	30
5.3	Fettsyresammensetning	30
5.4	Fettklassesammensetning	31
5.5	Forekomst	33
5.6	Forslag til videre arbeid	35
6	Konklusjon	36
	Referanseliste	37
	Vedlegg	43
	Vedlegg 1	43
	Fettsyresammensetning i arealprosent (%)	43
	Vedlegg 2	44
	Kromatogram fra HPLC	44
	Vedlegg 3	44
	Tabell for ukjent areal	44
	Vedlegg 4	45
	Gradientprofil for HPLC-program	45

Forkortelser

ALA alfa-linolensyre C18:3n-3

ARA arakidonsyre C20:4n-6

DHA dokosaheksaensyre C22:6n-3

EPA eikosapentaensyre C20:5n-3

DPA dokosapentaensyre C22:5n-3

MUFA monoumettede fettsyrer

PUFA flerumettede fettsyrer

SFA mettede fettsyrer

FA fettsyrer

FFA frie fettsyrer

TAG triacylglyserol

DAG diacylglyserol

MAG monoacylglyserol

FAlc fettalkohol

4-HNE 4-hydroxy-2-nonenal

PL fosfolipider

MeOH metanol

DCM diklormetan

N₂ nitrogengass

NaCl natriumklorid / saltvann 0.9 %

n-3 omega-3

n-6 omega-3

n-3 LC PUFA langkjedede omega-3 fettsyrer

IS internstandard

GC-FID gaskromatografi flammeionisasjonsdetektor

HPLC høypresisjonsvæskrokromatografi

HSMB hjerte- og skjelettmuskelbetennelse

CMS kardiomyopatisyndrom

1 Innledning

Oppdrett av atlantisk laks (*Salmo salar*, Linnaeus, 1758) begynte på 1970-tallet i Norge (Gjedrem et al., 1991). Grunnlaget for oppdrettsnæringen ble lagt ved å hente laks fra 41 ulike lakseelver i Norge for å på denne måten kunne danne en robust og rasktvoksende domestisert utgave av villaksen (Gjedrem et al., 1991). Oppdrett av atlantisk laks skulle sikre en større matproduksjon, og være en bi-inntekt for jordbrukere og fiskere. Utover 1980-tallet økte produksjonen av atlantisk laks og næringen ble utviklet til å romme mange aktører. De siste tiårene har oppdrett av atlantisk laks hatt jevn økende vekst frem til i dag. Norge ligger i verdenstoppen for produksjon og eksport av atlantisk laks og med en produksjon på 1,5 millioner tonn i 2022 står Norge for over halvparten av lakseproduksjonen i verden, med Chile på andreplass (Norges Sjømatråd, 2023).

Matsikkerhet – tilgang på nok, sunn og bærekraftig produsert mat til verdens befolkning, blir viktigere og viktigere ettersom verdenspopulasjonen forventes å øke til 8,5 milliard mennesker innen 2030 (Nærings- og fiskeridepartementet, 2021; United Nations, 2019). Et av FNs 17 bærekraftsmål for agenda 2030 er å «utrydde sult, oppnå matsikkerhet og bedre ernæring, og fremme bærekraftig landbruk» (United Nations, 2015). Norge har en unik mulighet å bidra grunnet kompetanse og naturlige passende forhold for havbruk. I 2023 ble rekordhøye 1,2 millioner tonn laks eksportert ut av Norge (Norges Sjømatråd, 2024b). Dette tilsvarer mye mat, og en så høy produksjon i årene framover vil det være viktig for næringen å drive bærekraftig.

Norske slakterier slakter og foredler oppdrettslaks, og eksporterer produktet ut i det store verdensmarkedet. Polen, Danmark og USA var i 2023 de tre landene med høyest import av norsk oppdrettslaks (Norges Sjømatråd, 2024a). Eksporten bidrar til stor verdiskapning i Norge og i 2023 ble det eksportert laks for rekordhøye 122,5 millioner kroner, en verdiøkning på 16 % sammenlignet med det forrige rekordåret, 2022 (Norges Sjømatråd, 2024b).

Laksefileter som ikke oppnår forventningene til forbrukermarkedet, kan bli nedklassifisert. Nedklassifisering av laksefileten er en stor utfordring for oppdrettsnæringen. For laks som selges i rundvekt er faktorer som vil lede til nedklassifisering mer utfordrende å detektere sammenlignet med laksefilet. Hos fileterings- og foredlingsfabrikker vil nedklassifiseringer kunne føre til kassering av hele eller deler av fileten. Faktorer som kan føre til nedklassifisering er vanligvis misfarging, filetspalting eller konsistens (Mørkøre, 2012).

Denne nedklassifiseringen har store konsekvenser for oppdrettsnæringen da det skaper svikt i omdømme, økonomisk tap som følge av kvalitetsavvik og misnøye i forbrukermarkedet (Mørkøre, 2012).

En av hovedårsakene til nedklassifisering av fileten de siste årene har vært misfarging med mørke flekker i fileten, også kjent som *melaninflekker*. Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF) opprettet i 2011 et overvåkingsprogram, videreført av Nofima, som viser en økning av disse flekkene i laksefileten de siste 15 årene (Mørkøre, 2017). I 2016 ble det rapportert et omfang på rundt 19 % av mørke flekker i fileten (Mørkøre, 2017). Dette kvalitetsproblemet har en enorm økonomisk konsekvens for næringen da mye laksefilet må kasseres og det anslås et økonomisk tap på melaninrelaterte kvalitetsavvik på 0,5-1 milliard kroner årlig (Bjørger, 2022).

Forskjellige teorier forklarer mulige grunner til melaninflekker, hvor det er foreslått at forandringene kan oppstå av blant annet ribbensbrudd, vaksineringsproblemer, infeksjon med PRV-1 virus, førsammensetning, oksidativt og metabolsk stress (Mørkøre et al., 2022). Årsakssammenhengene er flere, og det fremkommer ikke per dags dato enslige grunner til melaninflekker.

I denne masteroppgaven består råstoffet av fileter av atlantisk laks fra Brødrene Karlsen A/S på Husøy, Senja. Brødrene Karlsen A/S har en slaktelinje som slakter og fileterer laksen som sendes til et forbrukermarked i USA med strenge kvalitetsforventninger. Store partier med atlantisk laks med melaninflekker fører til at hele, eller deler av fileten må kasseres og bedriften blir påført store tap. Det er derfor interessant å undersøke næringsinnholdet i laksefilet med melaninflekk, både i selve flekken, men også i omliggende muskel og sammenligne dette med laksefilet uten melaninflekker.

Formål

Hovedformålet med oppgaven er å sammenligne næringsinnhold i form av fett i melaninflekker i laksefilet og omliggende muskel med vev uten melanin. I tillegg skal det undersøkes om det er en trend i forekomst av melaninflekkene gjennom året og over år ved å analysere et datasett med innrapportert melaninforekomst fra et slakteri med slakte- og fileteringslinje, som slakter for oppdrettslokaliteter i Nord-Norge.

Delmål:

1. Bestemme og sammenligne fettsyresammensetning og fettklasseoppbygging i fileter med melaninflekker med fileter uten melaninflekker, både i melaninflekk-området og fastsatte avstander lengre bak i fileten.
2. Analysere et datasett med nedklassifiseringer av filet, herav talte fileter med melaninflekker fra et slakteri med slakte- og fileteringslinje.

2 Bakgrunn

2.1 Helse og sjømat

I 2022 var en andel 43 % av alle verdens voksne overvektig, der 16 % var ekstremt overvektig (fedme) globalt sett (World Health Organization, 2024). Overvekt defineres av en kroppsmasseindeks på over 25 kg/m², mens fedme defineres av en kroppsmasseindeks på over 30 kg/m² (World Health Organization, 2024). I takt med økende andel overvektige har andelen livsstilssykdommer (sykdommer relatert til et individs levemåte, ikke smittsomme) også økt, og overvektige har større sjanse for å bli utsatt for blant annet hjerte- og karsykdommer, type 2 diabetes mellitus, metabolsk syndrom, enkelte krefttyper, endokrine lidelser, muskel- og skjelettsykdommer (Apovian, 2016). Endringer i livsstil vil kunne senke risikoer for en rekke av disse problemene (Willett et al., 2006), hvorav kostholdsendringer til et kosthold med grønnsaker, grove kornprodukter, fisk og magre produkter av kjøtt og meieri anbefales (Helsedirektoratet, 2018).

Fisk og sjømat har høy næringsverdi, og inngår derfor i ulike kostholdsråd. Fisk har et høyt innhold av høykvalitetsproteiner (deriblant essensielle aminosyrer som lysin og metionin), vitaminer (A, B og D) og mineraler (selen, jern, kalsium, sink, fosfor og jod) (Béné et al., 2015). Mest har det vært fokus på innhold av de langkjedede umettede fettsyrene som kommer fra marint fett (Olsen, 2023). Det ble for alvor satt søkelys på disse marine omega-3-fettsyrene etter at det på 1970-tallet ble foretatt studier av Bang og Dyerberg om forekomst av hjerte- og karsykdommer hos inuitter på Grønland, hvor inuittene på Grønland hadde en mindre dødelighet som følge av hjerteproblemer enn inuittene i Danmark og øvrige Skandinavia (Kromann & Green, 1980; Olsen, 2023). Dietten til inuittene på Grønland hadde et mye høyere inntak av langkjedede umettede fettsyrer fra et marint kosthold, enn de skandinaviske. Dette ga ideen til videre forskning angående de aktuelle fettsyrene.

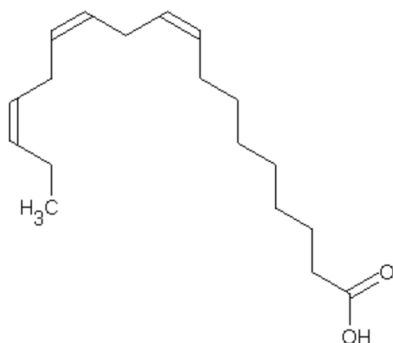
2.2 Atlantisk laks

Atlantisk laks er en art i laksefamilien (*Salmonidae*) som lever i det nordlige Atlanterhavet, i tillegg til elver tilknyttet Nord-atlanteren. Atlantisk laks blir klekket i elven og lever sine første år i ferskvann, før den vandrer ut i Atlanterhavet som smolt for å spise. Smolt betegnes som en ung fisk i fasen før kjønnsmodning, som har gjennomgått utvikling for å tåle saltvann. Når laksen er kjønnsmoden vandrer den tilbake til elva der den klekket for å gyte. Atlantisk laks har vært under fiskeri både i elv og hav, til matauke, i mange tiår (Havforskningsinstituttet, 2019).

Det er kjent at laks er helsebringende, både på grunn av sine høykvalitetsproteiner, men også grunnet innhold av umettede fettsyrer i form av omega-3-fettsyrer (Olsen, 2023). Laksen spiser per dags dato et fôr der planteoljer i stor grad har erstattet de marine oljene, sammenlignet med for 15 år siden (Jensen et al., 2020). Oppdrettet laks inneholder derfor mye mindre EPA og DHA enn før, samtidig som fisken er blitt fetere. Ukesbehovet for EPA og DHA dekkes ved å spise 150 g laks hver uke (Jensen et al., 2020; Moxness Reksten et al., 2022).

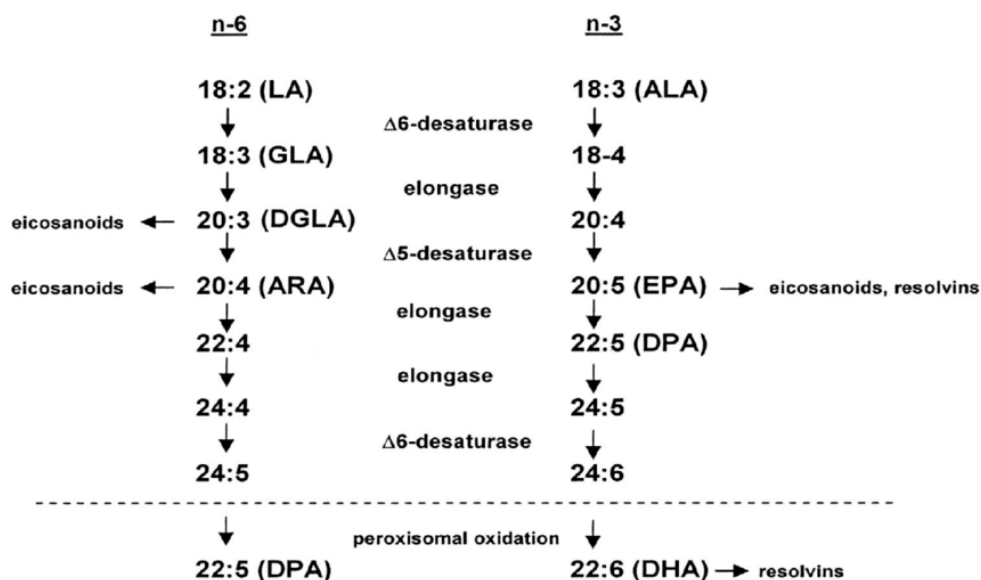
2.3 Lipider

Lipider, eller fett, er en fellesbetegnelse på en stor gruppe biologiske stoffer som karakteriseres av deres løselighet i organiske stoffer (Olsen, 2023). Fettsyrer er den enkleste formen for fett, og er bestanddeler i mange av de komplekse gruppene innenfor fett (Calder, 2015). En fettsyre er bygget opp av en hydrokarbonkjede (karbonatomer med hydrogenatomer i kjedestruktur), og en karboksylgruppe (-COOH) (Olsen, 2023). Fettsyrer kan være mettede (SFA) eller umettede. En mettet fettsyre har en karbonkjede med enkeltbindinger mellom karbonatomene, mens de umettete fettsyrene deles i to: monoumettede fettsyrer (MUFA) som har en dobbeltbinding i karbonkjeden, og flerumettete fettsyrer (PUFA) som har mellom 2 til 6 dobbeltbindinger i karbonkjeden. Omega-3 og omega-6 fettsyrene tilhører PUFA og karakteriseres av hvor den nærmeste dobbeltbindingen er plassert i forhold til metylenden (-CH₃). Omega-3-fettsyrene har en dobbeltbinding plassert tre karbonatomer unna metylenden, på samme måte som omega-6-fettsyrene har en dobbeltbinding plassert seks karbonatomer unna metylenden (Olsen, 2023). Videre kan PUFA med 20-22 karbonatomer i hydrokarbonkjeden navngis langkjededede flerumettete fettsyrer (LC-PUFA). Disse fettsyrene er sentrale når laks og annen sjømat omtales, da blant annet EPA og DHA inngår i LC-PUFA.



Figur 1: Omega-3-fettsyren α -linolensyre (ALA). Figur hentet fra (ChemSynthesis, 2022) 01.02.2024

Omega-6 fettsyren linolsyre (LA) og omega-3 fettsyren alfa-linolensyre (ALA) (Figur 1) er de to essensielle fettsyrene, som har sin opprinnelse i planteriket. Linolsyre kan ved hjelp av en rekke enzymer syntetisere arakidonsyre (ARA) og dokosapentaensyre (DPA), mens alfa-linolensyre på samme måte kan syntetisere EPA og DHA (Olsen, 2023; Simopoulos, 2016) (Figur 2). Det er imidlertid et større inntak av omega-6 kontra omega-3 i vestlig kost, som resulterer i at det vil foregå en høyere syntese av ARA enn EPA og DHA, samtidig som syntesen av EPA og DHA er lite effektiv (Olsen, 2023).



Figur 2: Biokjemisk dannelse av EPA, DHA og DPA fra de essensielle omega-6 og omega-3 fettsyrene linolsyre og α -linolensyre, inklusive enzymer som deltar. Figur hentet fra (Brenna & Lapillonne, 2009) 05.04.2024

Omega-6 er som tidligere nevnt essensielt for en sunn helse, men det er vist at et ubalansert omega-6/omega-3 ratio i omega-6 fettsyrenes favør promoterer overvekt og livsstilssykdommer (Mozaffarian & Rimm, 2006; Rimm et al., 2018; Simopoulos, 2016). Derav ligger det anbefalinger om økt inntak av EPA og DHA, da dette vil være med på å senke forholdet mellom omega-6 og omega-3. En rekke positive helseeffekter av EPA/DHA inntak er undersøkt og bekreftet. Spesielt er dette rettet mot hjerte og -karsykdommer, fosterutvikling, kognitiv funksjon, øyehelse og mental helse, blant annet grunnet deres molekylære struktur med antioksidative signalveier (Calder, 2011; Djuricic & Calder, 2021; Rimm et al., 2018; Simopoulos, 2016; Swanson, 2012).

Grupper innenfor fett er hensiktsmessig å dele opp etter funksjonen i biologiske systemer. Lagringsformen for fett i vertebrater er triacylglyserol (TAG), som består av en glyserolstamme med henholdsvis tre ulike fettsyrer bundet til seg med esterbindinger (Olsen, 2023). Triacylglyserol kan spaltes til frie fettsyrer (FFA), diacylglyserol (DAG) og monoacylglyserol (MAG) av enzymet lipase, og re-esterifiseres tilbake til TAG i enterocytene. MAG og DAG er ofte bare metabolske mellomliggende produkter i hydrolyse eller re-esterifisering av TAG, mens FFA kan bindes til andre funksjonelle molekyler som eksempelvis kolesterol (Epanand, 2015; Olsen, 2023). Kolesterol og fosfolipider (PL) tilhører membranlipidene, og har en hydrofil del og en hydrofob del, som gjør den selektivt permeabel. Kolesterol tilhører sterolene og har fire ringer, med en hydroksylgruppe og en hydrokarbonhale. Kolesterol opptrer i fri form i alle cellemembraner, mens det ellers er bundet ved esterbinding til en fettsyre på hydroksylgruppa, og kalles da kolesterylester (Olsen, 2023). Fosfolipider har flere undergrupper, men den største gruppen er glycerofosfolipid. Disse består av glyserol, to fettsyrer, en fosfatgruppe samt en alkohol, en base eller en aminosyre (Olsen, 2023).

2.4 Melanin

Ordet «melanin» kommer fra den greske termen melas, som betyr svart. Melanin er en gruppe mørke, naturlige pigmenter som finnes i mange forskjellige organismer, med mange forskjellige funksjoner og strukturer (Cordero & Casadevall, 2020). De deles opp i fem klasser, der klassene eumelanin, pheomelanin og neuromelanin finnes i mennesker og dyr, mens allomelanin og pyomelanin hører til planter og mikroorganismer (Cordero & Casadevall, 2020). De biologiske funksjonene består av blant annet UV-beskyttelse, termoregulering, antioksidering mot frie radikaler, metallchelatering og i tillegg kan melanin inneha ulike

immunfunksjoner som antimikrobiell/antivirus aktivitet (Song et al., 2023). Melanin produseres i melanocytter som hos pattedyr lokaliseres i hud (klassiske melanocytter), øyne, indre organer og indre øre (ikke-klassiske melanocytter) (Bjørngen & Koppang, 2024).

Hos teleost fisk produseres det kun eumelanin i melanocytterne, som også er den vanligste formen for melanin (Kottler et al., 2015). Melanocytter hos fisk vil normalt sett bli kalt melanoforer, som er pigmentceller til hud og øye. Det eksisterer flere andre pigment-celler tilhørende fiskens farge utad, blant annet xanthoporer, iridophorer, leukophorer og cyanoporer (Kottler et al., 2015). Melanocytter inneholder intracellulære organeller kalt melanosomer, hvor det foregår melanosyntese. Melanosyntese er dannelsen fra tyrosin til eumelanin ved hjelp av enzymene tyrosinase, tyrosinase-relatert protein-1 og tyrosinase-relatert protein 2/dopachrome tautomerase (Bjørngen & Koppang, 2024).

I tillegg til pigmentering, vil melanin i fisk utspille seg i form av makrofag-celler. Makrofager tilhører de hvite blodcellene (leukocytterne) (Agius & Roberts, 2003). Melanin-relaterte makrofager kan utspille seg som melano-makrofager eller melanofager (Bjørngen & Koppang, 2024). En melano-makrofag er en knute-lignende fagocyt, som inneholder pigmentene lipofuscin, hemosiderin og melanin (Steinel & Bolnick, 2017). Melano-makrofagene eksisterer i amfibier, fisk og reptiler, og har hos laks tilhørighet i de hematopoetiske vevene milt, hodenyre og lever. Melano-makrofager foreligger hos laksefisk jevnt distribuert i de hematopoetiske vevene (Agius & Roberts, 2003).

Det foreligger usikkerhet i hvorvidt melaninnhold i melano-makrofager er et resultat av fagocytose eller om det syntetiseres i cellen, og generelt er lite kjent om cellen. (Bjørngen & Koppang, 2024). Deres funksjon er også mye diskutert, men blant annet deres tilstedeværelse under inflammatoriske tilstander, der de innehar en fagocytterende rolle mot patogener er vist (Bjørngen & Koppang, 2024). I tillegg er det vist at ved vaksinerings med olje-baserte vaksiner, gir en svart fargeendring i det affiserte vevet grunnet melano-makrofagenes akkumulering (Koppang et al., 2005). Dette foreslår at cellene i inflammatoriske områder danner granulomer (Bjørngen & Koppang, 2024). Melano-makrofager er vist å fjerne patogene bakterier fra sirkulasjonen ved fagocytose (Brattgjerd & Evensen, 1996). I inflammatoriske muskelforandringer hos laks har det vist seg å være tyrosinase samt tyrosinase-relatert-protein 2, noe som gir grunnlag for en *de-novo*-syntese av melanin i melano-makrofagene i det affiserte vevet (Bjørngen & Koppang, 2024; Larsen et al., 2012). Hos laks infisert med Piscine orthoreovirus-1 (PRV-1) ble det i to ulike studier påvist virus-antigen og MHC-klasse II

molekyler i melano-makrofager, noe som tyder på en antigen-presenterende evne hos cellene (Bjørngen & Koppang, 2024; Larsen et al., 2012). Celletypen har derfor en rolle innenfor immunforsvaret hos laks.

2.5 Melaninflekker

Melaninflekker er mørkpigmenterte flekker i hvit muskulatur hos atlantisk laks, vanligvis lokalisert i buk- og rygg område i fileten, i forbindelse med ribbein (Jiménez-Guerrero et al., 2022; Mørkøre et al., 2022). Flekkene kan være veldig markerte med en svart/brun farge, eller mer diffuse/grålig. Det kan være variasjoner i størrelse og antall flekker på fileten, men de fleste flekkene er opptil 3 cm brede og noen millimeter tykke (Mørkøre et al., 2022; Wakamatsu et al., 2023).

Melaninflekker fremstår som en akutt eller kronisk betennelsestilstand i muskulaturen, som farges av en økt akkumulering av melano-makrofager (Bjørngen et al., 2019; Mørkøre et al., 2022). Det er ved histologi vist at flekkene inneholder en akkumulering av bindevev, samt økt forekomst av 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) i flekkene (Mørkøre et al., 2022). En økt forekomst av 4-HNE tyder på oksidasjon av flerumettede fettsyrer i cellemembranene (Li et al., 2022). Muskulaturen i melaninflekken er ofte også hardere enn normalvev, som følge av arrdannelse og forhøyet innhold av enkelte mineraler, da spesielt jern (Mørkøre et al., 2022). Begynnelsen på en melaninflekk er trolig en vevsskade som etter hvert karakteriseres av en granulomatøs betennelse (Brimsholm et al., 2023; Mørkøre et al., 2022). Det er også vist nekrotiske muskelceller i melaninflekker (Brandshaug, 2016).

Røde flekker/blodflekker er også en form for misfarging i laksefileten, og det spekuleres mye om sammenhengen mellom røde flekker og melaninflekker. Rødfargen skyldes ofte blod eller oksiderte proteiner (Mørkøre et al., 2022). Røde flekker kan oppstå allerede hos pre-smolt i ferskvannsfase, mens melaninflekker oppstår som regel noen måneder etter at fisken har kommet i sjøen, altså hos større fisk (Mørkøre et al., 2022). Eumelanin ble i et forsøk detektert i melaninflekker og ikke i røde flekker, så det er et klart skille mellom filetflekkene (Wakamatsu et al., 2023). Røde flekker er derimot foreslått å være en forløper til melaninflekker (Brimsholm et al., 2023).

2.5.1 Årsakssammenhenger

Det finnes flere teorier rundt årsakene til at melaninflekkene oppstår. Økningen av forekomst til melaninflekkene oppsto omtrent på den tiden det ble økt bruk av planteoljer istedenfor marine oljer/fiskemel i fôret, og også parallelt med økning av forekomsten til sykdommen hjerte- og skjelettmuskelbetennelse (HSMB) (Mørkøre et al., 2022). Som følge av økt bruk av planteoljer i fôr har innholdet av EPA + DHA i fileten blitt 60 % lavere fra 2005 til 2020, og innblanding av planteoljer har ført til at mengden omega-6-fettsyrer har økt (Moxness Reksten et al., 2022). En studie fra 2016 viste at laks med mindre EPA + DHA i fôret fikk økt prevalens av melaninflekker i filet, trolig relatert til betennelsesreaksjoner (Sissener et al., 2016).

HSMB er en virussykdom som siden oppdagelsen i 1999 har hatt en stor økning i forekomst. Sykdommen inntreffer laksen i sjøfasen og infiserer erytrocytter med agensen PRV-1 (*Piscine orthoreovirus*) (Sommerset et al., 2024). De mest uttalte forandringene kan sees ved betennelse i hjertemuskulatur og rød skjelettmuskulatur. Det er foreslått at PRV kan påvises i melaninflekker, og muligens forverre problemet, men det er ikke påvist å være begynnende årsak til flekkene da viruset i hovedsak påvises i erytrocyttene (som er til stede under en infeksjon) (Bjørngen et al., 2019; Malik et al., 2021; Sommerset et al., 2024). En studie fra 2016 gjennomført av Krasnov et al. viste at melaninflekkene oppsto som følge av uten spesifikke virale patogener (Krasnov et al., 2016).

Det var også for en tid tilbake spekulasjoner i hvorvidt vaksinerings var årsaken til melaninflekker. Bruk av vaksiner med mineralolje-adjuvans kan fremkalle en immunrespons, vanligvis i bukhinnen, men ved feilstikk kan det forekomme akkumulering av melanin i filet også (Koppang et al., 2005). Dette er derimot ikke noen hovedårsak da melaninflekker forekommer i både vaksinert og uvaksinert fisk (Larsen et al., 2012; Larsen et al., 2014).

En nyere teori omhandler ribbeinsbrudd og svake ribbein i laksen. Avlusing, flytting av fisk og sortering er faktorer som kan gi deformiteter eller brudd i ribbein, og det er vist at det ofte er ribbeinsbrudd i vev relatert til melaninflekkene (Jiménez-Guerrero et al., 2022). I en annen studie fra 2023, hvor ribbeins-morfologi ble undersøkt, fant de melaninflekker i vev uten ribbeinsbrudd (Brimsholm et al., 2023). Ingen av faktorene omtalt til nå i denne masteroppgaven kan derfor anses å være hovedårsak eller antatt start på utvikling av melaninflekker.

2.5.2 Forekomst

Det ble gjort beskrivelser av melaninflekker for over 30 år siden, men ikke før i 2003 ble de rapportert inn som kvalitetsavvik og ble ført statistikk over (Mørkøre, 2017). Statistikkføringen ble først gjort av et røykeri som oppdaget en forekomst på 7/100 melaninfileter med mørke flekker, hvor fargen i flekkene ble ennå mer fremtredende etter røyking av filet. I 2007 var forekomsten allerede økt til 18/100 melaninfileter, og det ble derfor i 2011 opprettet en nasjonal FHF-standard (Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond) for registreringer av flekkene, som fileteringsfabrikker kunne benytte seg av (Mørkøre, 2017). Det har det siste årene vært et omfang på ca. 19% i registreringene fra hele landet, der det har blitt kontrollert hundre fileter hver produksjonsdag (Mørkøre, 2017).

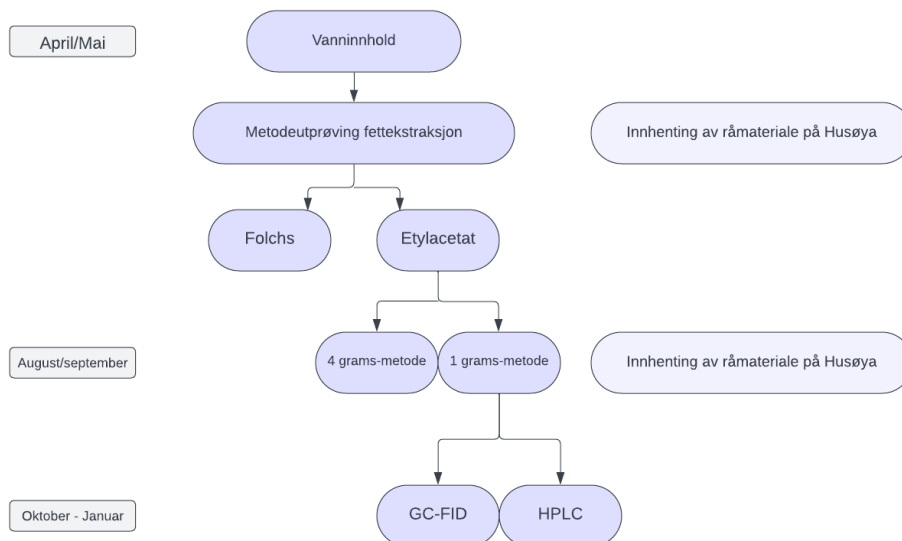
2.5.3 Utfordring

Utfordringen med flekkene er det store økonomiske tapet de medfører, noe som i Norge regnes til å være på opp til en milliard kroner i året (Bjørngen, 2022). Tapet avhenger av hvor mye av fileten som må kasseres, som igjen avhenger av melaninflekkenes størrelse og grad. Ved mindre melaninflekker vil de normalt skjæres vekk, men dette vil gi fileten et avvikende utseende. I en spørreundersøkelse fra 2017 svarte bedrifter at i tilfeller ved små områder ved svak pigmentering ga et økonomisk tap på omlag 5-10 %, mens ved tilfeller der fileten har store melaninflekker vil det kunne føre til økonomisk tap på 30-100 % (Färber, 2017). Økonomisk tap vil også kunne komme som følge av reklamasjoner, som i tillegg vil være med på svekkelse av omdømmet til produktet.

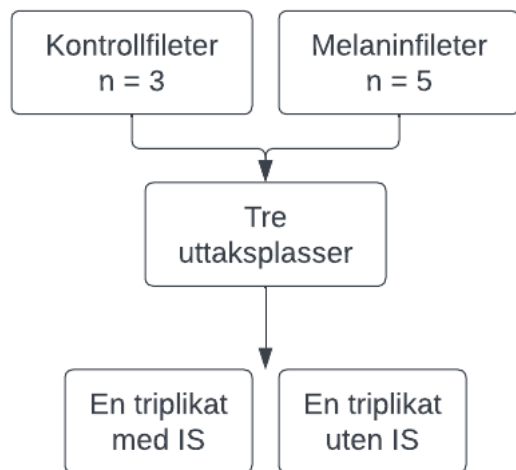
3 Materialer og metoder

3.1 Forsøksdesign

Materialet brukt til analyser i denne masteroppgaven bestod av melaninfileter (laksefilet med melaninflekker, samt kontrollfileter (fileter uten melanin). Siden melaninflekker ikke tidligere er undersøkt ved forskningslaben ble det lagt opp til en metodeutprøving av to fettekstraksjonsmetoder. Bakgrunn for dette var usikkerheten rundt innhold av melanomakrofager i melaninflekkene og hvordan dette påvirket fettprosent og fettsyresammensetning i de to ulike fettekstraksjonsmetodene. En modifisert versjon av Folchs fettekstraksjon med sentrifugering (Folch et al., 1957) (metode seksjon 3.7.1), og en modifisert metode for fettekstraksjon med etylacetat (NS9402, 1994) (metode seksjon 3.7.2) ble utprøvd, og det ble videre i denne masteroppgaven bestemt å bruke etylacetat – en mer miljøvennlig metode for fettekstraksjon da den ikke benytter klorerte løsemidler under selve ekstraksjonen (NS9402, 1994). Videre ble etylacetatmetoden nedskalert da ikke prøvemateriale var stort nok til paralleller under ekstraksjonen (metode seksjon 3.7.2). Den nedskalerte versjonen gav tilsvarende resultat som den modifisert etylacetatmetoden og ble brukt videre i denne masteroppgaven.



Figur 3: En oversikt over forsøksarbeidet i masteroppgaven, inkludert arbeid på lab og innhenting av råmateriale. GC-FID = Gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor. HPLC = høypresisjonsvæskeskromatografi.



Figur 4: En oversikt over prøveuttak fra kontrollfileter og melaninfileter. Det ble tatt prøver fra tre plasser på totalt åtte fileter, med to triplikater (tre paralleller), en med IS og en uten IS. IS = Internstandard.

3.2 Innhenting av råmateriale

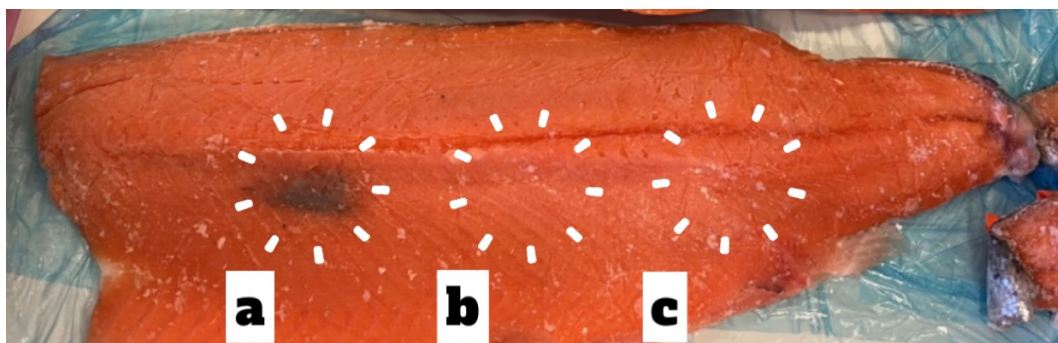
Til metodeutprøving i denne masteroppgaven ble det brukt kontrollfileter og melaninfileter donert fra Brødrene Karlsen A/S på Husøy, Senja i april 2023. Kontrollfileter og melaninfileter brukt i hoveddelen av forsøkene i masteroppgaven ble også donert fra Brødrene Karlsen A/S på Husøy, Senja, i september 2023. Filetene var av atlantisk laks (*Salmo salar*) fra samme produksjon, samt at de var slaktet og filetert hos Brødrene Karlsen A/S i samme tidsrom.

3.3 Innhenting og bearbeiding av data

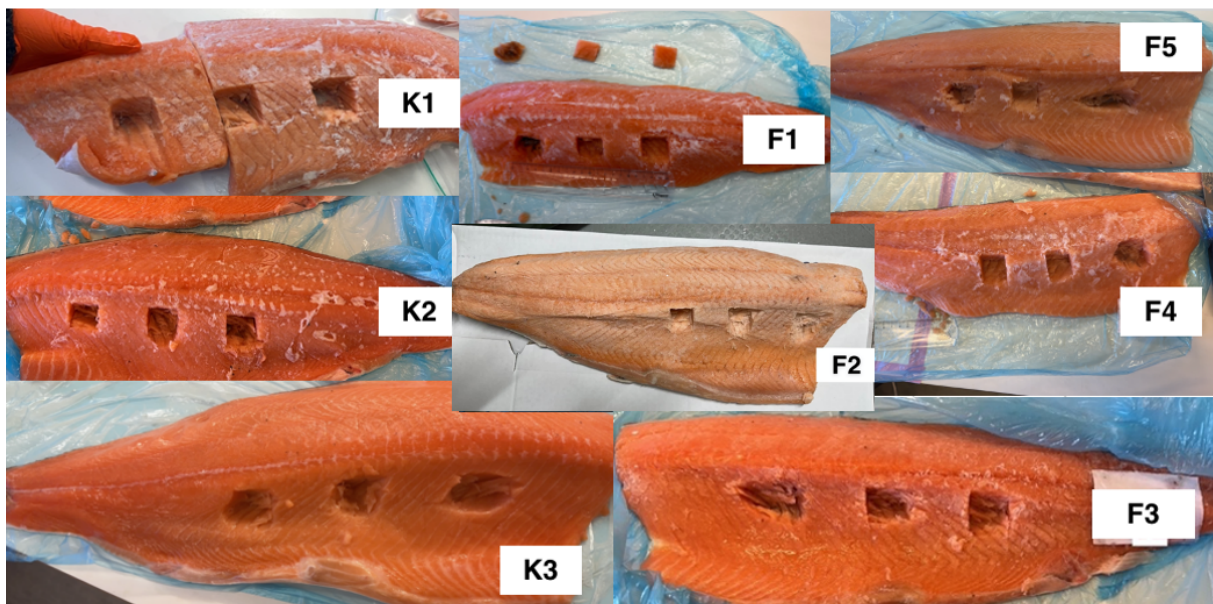
Et nord-norsk slakteri med fileteringslinje tilsendte et datasett med registrering av melaninfileter for hver produksjonsdag gjennom årene 2017-2022. Dette datasettet ble analysert i denne masteroppgaven. Et like stort antall fileter ble kontrolltalt hver produksjonsdag. Dataene ble bearbeidet og fremstilt i Excel (versjon 16.66.1, Microsoft, 2022).

3.4 Bearbeiding av kontrollfileter og melaninfileter

Melaninfileter ble klargjort for analyser ved å skjære ut melaninflekk lokalisert i forparten av fileten (Figur 5a). Deretter ble områder på 2,5x3 cm skåret ut, henholdsvis 5 cm (Figur 5b) og 13 cm (Figur 5c) bakover i fileten, målt i cm fra bakre del av melaninflekken, i skillet hvor flekken avtar. Dette ble utført for alle melaninfileter, og kontrollfiletene ble bearbeidet på samme måte, der det ble skåret ut vev i det området melaninflekken normalt sett befinner seg. Kontrollfiletene og melaninfiletene er derfor sammenlignbare, med samme sted for uttak (Figur 6). Alle prøvene ble homogenisert av stavmikser, pakket i separate poser og oppbevart ved -20 °C frem til fett ekstraksjon.



Figur 5: Et representativt bilde av en filet med melaninflekker som viser hvor prøvene er hentet. «a» viser til melaninflekk-området, «b» viser til prøve tatt 5 cm fra enden av melaninflekk-området og «c» viser til prøve tatt 13 cm fra enden av melaninflekk-område.



Figur 6: Oversikt over hvor prøvene er skåret ut i kontrollfileter (K1, K2 og K3) (n=3) og melaninfileter (F1-F5) (n=5).

3.5 Kjemikalier

Kjemikalier brukt i oppgaven er alle av analytisk kvalitet, og er listet opp i Tabell 1.

Tabell 1: Kjemikalier brukt for metodene, inkludert produsent, land og produktnummer.

Navn	Produsent	Land	Produktnummer
Etylacetat (99,9 %)	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA	23882.296
Diklormetan; DCM (100 %)	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA	23366.293
Metanol; MeOH (99,9 %)	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA	20847.318
n-Heptan (99,8 %)	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA	24551.290
Natriumklorid; NaCl	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA	27788.297
Svovelsyre; H₂SO₄ (95-97 %)	Merck	Burlington, MA, USA	-
Natriumsulfat; Na₂SO₄ (vannfri)	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA	238597
Internstandard; IS C17:0 Heptadekansyre	Supelco Analytical	Bellefonte, PA, USA	000259167
FAME-standard GC; GLC 502	Nu-Chek Prep Inc.	Elysian, MN, USA	-
Nitrogengass; N₂	Linde Gas AS	Oslo, Norge	100776
Kloroform (99-99,4 %)	Honeywell Fluka	Muskagon, MI, USA	32211
Aceton	VWR Chemicals	Radnor, PA, USA	20066.296
Eddiksyre	Honeywell Fluka	Muskagon, MI, USA	33209
Isooktan	Merck	Darmstadt, Tyskland	1.04727.1000
Dietyleter	Sigma Aldrich	St. Louis, MO, USA	-
Isopropanol	Merck	Darmstadt, Tyskland	-
TLC standard 18-5A	Nu-Chek Prep Inc.	Elysian, MN, USA	J10-X
GLC standard 16-0A	Nu-Chek Prep Inc.	Elysian, MN, USA	F6-Z
FAlc standard 10 mg/ml	-	-	-
Kobberløsning (Kobbersulfat 10% + 8% fosforsyre)	-	-	-

3.6 Vanninnhold

Vanninnholdet ble bestemt gravimetrisk, ved hjelp av en modifisert metode av 950.46b under AOAC (Association of Official Analytical Collaboration) (AOAC International., 1995). Både filet uten melanin og filet med melanin ble analysert. Tre paralleller med to gram oppmalt prøve ble overført til aluminiumsbeger og plassert i Heratherm varmeskap (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) på 105 °C i ca. 84 timer. Deretter ble prøvene veid før et prosentvis anslag på vanninnhold ble beregnet etter **formel 1**. Formel 1 gir vanninnhold i prosent ved at vekt av prøve etter tørking subtraheres fra vekt av prøve før tørking, før det divideres på vekt av prøve før tørking. Dette gir andel vann i prøven og ved å multiplisere med 100 gir det prosentandel vann i innveid prøven.

Formel 1
$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt prøve (før tørking)} - \text{Vekt prøve (etter tørking)}}{\text{Vekt prøve (før tørking)}} \times 100$$

3.7 Fettinnhold

3.7.1 Fettekstraksjon med Folchs med sentrifugering

Fettekstraksjon på prøvematerialet ble gjennomført med Folchs med sentrifugering metoden (Folch et al., 1957). Prøvematerialet ble malt opp, før det ble veid opp 0,5 g prøvemateriale ble veid ut i merkede 15-ml sentrifugerør. Til prøvene ble 9,5 ml diklormetan:metanol (DCM:MeOH) (2:1, v/v) og 0,5 ml internstandard (IS) løst i DCM:MeOH tilsatt. Sentrifugerørene ble ristet i en Heidolph Multi Reax ristehomogenisator (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Tyskland) i 25 minutter. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 15.000 x g i 10 minutter ved 20 °C i en Eppendorf sentrifuge, type 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). Væskefasen ble overført til nye sentrifugerør og det ble deretter tilsatt 2 ml 0,9 % natriumklorid (NaCl) til rørene. Rørene ble vendt noen ganger før de ble sentrifugert på 4500 x g i 10 minutter ved 20 °C. Vandig fase ble pipettert ut og avhendet, før diklormetan/lipid-fasen ble overført til forhåndsveide- og merkede 8-ml glassrør med kork. Deretter ble prøvene dampet inn under nitrogengass i en Sample Concentrator SBHCONC/1 inndamper (Stuart Scientific, Staffordshire, England), til vekten var stabil og fettinnholdet beregnet etter **formel 2**. Formel 2 gir fettinnhold i prosent ved at man finner fettvekt ved å

subtrahere glassrør uten innhold fra glassrør med innhold, og dividerer dette på mengde innveid prøve. Dette gir en andel fett i prøven, og ved å multiplisere med 100 gir det prosentandel fett i innveid prøve.

$$\text{Formel 2} \quad \text{Fettinnhold (\%)} = \frac{(\text{Glassrør med innhold} - \text{Glassrør uten innhold})}{\text{gram innveid prøve}} \times 100$$

3.7.2 Fettekstraksjon med etylacetat

Fettekstraksjonen på hovedmateriale ble gjennomført med en nedskalert og modifisert versjon av ekstraksjonsmetoden med etylacetat (NS9402, 1994). Prøvemateriale ble tint opp før paralleller på ett gram ble veid ut i veieskip og tilsatt to gram vannfri natriumsulfat blandet inn med spatel. Deretter ble prøvene overført til 15-ml Falcon-rør og noen paralleller tilsatt 5 ml etylacetat og noen paralleller 3,8 ml etylacetat + 1,2 ml internstandard (IS) til en sluttkonsentrasjon på ca. 10 mg/ml for videre analyse av fettsyrer. Rørene ble vortexet på full styrke i 10 sekunder, før de ble satt til resting i en Heidolph Multi Reax ristehomogenisator (Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Tyskland), på steg 8 i 60 minutter. Rørene ble deretter sentrifugert ved 10.000 x g i 10 minutter i en Eppendorf sentrifuge, type 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Tyskland). En 2-ml alikvot fra hvert rør ble overført til forhåndsveide- og merkede 8-ml glassrør med kork. Deretter ble prøvene dampet inn under nitrogengass i en Sample Concentrator SBHCONC/1 inndamper (Stuart Scientific, Staffordshire, England), til vekten var stabil og fettinnholdet beregnet etter **formel 3**. Formel 3 gir fettinnhold i prosent ved at man finner fettvekt ved å subtrahere glassrør uten innhold fra glassrør med innhold, som igjen multipliseres med forholdet mellom tilsatt etylacetat og alikvoten som tas ut, for å kunne sikre at alikvoten er presentabel for hele prøven. Dette divideres på innveid prøve og multipliseres med 100 for å kunne gi prosentandel fett i prøven.

$$\text{Formel 3} \quad \text{Fettinnhold (\%)} = \frac{(\text{Glassrør med innhold} - \text{Glassrør uten innhold}) \times \left(\frac{5}{2}\right)}{\text{gram innveid prøve}} \times 100$$

3.7.3 Fettsyresammensetning

3.7.3.1 Metylering

Metylering ble utført etter en modifisert metode for metylering (W. W. Christie, 2010). Det tidligere ekstraherte fett med IS ble løst i etylacetat til en konsentrasjon på 10 mg/ml, før 100 µl av hver prøve ble tilsatt Duran-18 rør med kork. Deretter ble 0,9 ml diklormetan og 2 ml 2% H₂SO₄ i metanol tilsatt til hvert rør. Prøvene ble inkubert i en Drybath Stdrd varmeblokk (Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) på 100 °C i en time i avtrekkskap. Etterpå ble 3,5 ml n-heptan og 3,5 ml 5 % NaCl tilsatt og blandet ved å vende på rørene. Den øverste fasen, lipid og heptan-fasen, ble pipettert over i nye 8-ml rør, og dampet tørr ved bruk av en Sample Concentrator SBHCONC/1 inndamper (Stuart Scientific, Staffordshire, England). Til slutt ble prøvene løst ut i 100 µl n-heptan og overført til GC-rør med innsats og kork.

3.7.3.2 Gasskromatografi med flammeionisasjonsdetektor (GC-FID)

De metylerte prøvene ble satt i en Agilent 6890N gasskromatograf (GC) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for analysing av fettsyresammensetning. Denne var utstyrt med en 7683B autoinjektor og en flammeionisasjonsdetektor (FID). Helium ble brukt som bæregass, og fettsyrene ble separert ved hjelp av sine ulike vandringshastigheter gjennom en kapillærkolonne type Varian CP7419 (50 m x 250 µm x 0,25 µm nominal) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Temperaturer var henholdsvis 250 °C i detektor, og 240 °C i injektor. Temperaturprogrammet i kolonneovnen ble deretter brukt. Fettsyrestandard GLC 502 ble brukt som standard for å identifisere de ulike fettsyrene. Kromatogrammet som ble laget ga grunnlag for å beregne mengde fettsyre (FA) per 100 gram prøve og arealprosent for de ulike fettsyrene. Arealprosenten for en fettsyre beregnes automatisk som areal av fettsyretoppen i kromatogrammet, dividert på det totale arealet av alle fettsyretoppene. Mengde fettsyre (g/100 g) beregnes ut fra tilsatt internstandard (IS), etter **formel 4**. Fra kromatogrammet lages det en tabell som gir de ulike arealtoppene i formel 4, hvor det også brukes vekt av internstandard og prøve. Dette multipliseres med 100 for å kunne gi mengde fettsyre (g/100 g) per prøve.

Formel 4 *Mengde fettsyre (g) per 100 gram prøve* $\left(\frac{\text{Areal topp FA}}{\text{Areal topp IS}} \times \frac{\text{Tilsatt IS (g)}}{\text{Vekt prøve (g)}} \right) \times 100$

3.7.4 Fettklassesammensetning

3.7.4.1 Høytrykks væskkromatografi (HPLC)

For analysering av fettklassesammensetning ble det brukt en høytrykks væskkromatografi-metode beskrevet i Abreu (Abreu et al., 2017). Det tidligere ekstraherte fettene ble løst i en mobilfase A: kloroform (4:1) til konsentrasjoner på 0,9 mg/ml og 0,1 mg/ml for den første prøven, og 0,5 mg/ml og 0,25 mg/ml for resten av prøvene, før de ble satt i HPLC-glassvialer. Deretter satte overingeniør Tone Friis Aune prøvene på en Waters e2795 separasjonsmodul (Waters, Milford, MA, USA) med Supelcosil LC-SI μm (25 cm x 4,6 mm) kolonne (Supelco, Bellefonte, PA, USA), med en arbeidstemperatur på 40 °C og injeksjonsvolum på 40 μl . Fettklassene ble identifisert i en Waters 2424 ELS-detektor (Waters, Milford, MA, USA) på følgende innstillinger: forsterkning 100, nebulizer 30 % oppvarmingseffekt, drivrør 45 °C og trykk på 40 PSI. Kjøretime var på 41 minutter. Gradientprofilen for programmet vises i «Vedlegg 4».

3.7.4.2 Tynnsjikt-kromatografi

For en visuell fremkalling av de ulike fettklassene ble det foretatt tynnsjikt-kromatografi på en parallell fra hvert uttaks-punkt, i en kontrollfilet og en melaninfilet. Prøvene var løst i mobilfase A: kloroform (4:1) til konsentrasjoner mellom 14,9 mg/ml og 19,8 mg/ml og 1 μl av hver prøve ble satt på en silica-plate med 1 cm mellomrom, sammen med følgende standarder: 18-5A (PL, kolesterol, FFA, TAG, kolesterylester) (25 mg/ml), 16-0A (MAG, DAG, TAG, metylester) (25 mg/ml) og FAlc (10 mg/ml). Platen ble satt oppreist i et elueringskar med elueringsløsning (heptan:dietyleter:eddiksyre, 70:30:1) som dekket bunnen. Platen sto i karet til løsningen var trukket opp til ca. 1 cm unna toppen før den ble tatt ut og tørket. Platen ble så sprayet med kobberløsning (10% kobbersulfat, 8% fosforsyre), deretter lufttørket i 10 minutter, før de til slutt ble satt i et kaldt Heratherm varmeskap (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) som ble varmet opp til 180 °C. Platen ble tatt ut når ovnen rakk 180 °C, noe som tok ca. 20 minutter.

4 Resultater

4.1 Metodeutprøving

Tabell 2 viser fettinnhold i prosent, med tilhørende standardavvik (SD), for kontrollfilet og melaninfilet, ekstrahert med etylacetat og Folchs under metodeutprøving. Fettprosent var ett prosentpoeng høyere for etylacetatmetode, både for melaninfilet og kontrollfilet. Her vises også en høyere fettprosent i melaninfilet, med henholdsvis 17,6 % og 15,2 %, og 16,6 % og 14,1 %.

Tabell 2: Fettinnhold (%) for kontrollfilet og melaninfilet, inklusivt standardavvik, etter metodeutprøving av fettekstraksjon med etylacetat og fettekstraksjon med Folchs (med sentrifugering) (n=1, triplikat).

	Kontrollfilet	Melaninfilet
Fettinnhold (%) etylacetat	15,2 ± 0,1	17,6 ± 0,2
Fettinnhold (%) Folchs	14,1 ± 0,1	16,6 ± 0,4

4.2 Vanninnhold

Tabell 3 viser vanninnhold i prosent, med tilhørende standardavvik (SD), for melaninflekk-område i kontrollfilet og melaninfilet. Vanninnholdet var høyere i kontrollfilet enn i melaninfilet med henholdsvis 65,2 % og 63,8 %.

Tabell 3: Vanninnhold (%) for kontrollfilet og melaninfilet, inklusivt standardavvik (n=1, triplikat).

	Kontrollfilet	Melaninfilet
Vanninnhold (%)	65,2 ± 0,2	63,8 ± 0,3

4.3 Fettinnhold

Gjennomsnittlig prosentvist fettinnhold for kontrollfileter og melaninfileter inkludert SD er vist i Tabell 4. Gjennomsnittlig fettinnhold varierte etter hvor prøvene var tatt (melaninflekk-område, 5 cm, eller 13 cm) og for kontrollfiletene var fettinnhold på henholdsvis $15,3 \pm 1,8$ %, $16,4 \pm 2,7$ % og $14,8 \pm 2,8$ %. Tilsvarende variasjon ble observert i melaninfiletene der fettinnhold var på henholdsvis $14,5 \pm 2,8$ %, $13,8 \pm 2,1$ % og $12,7 \pm 2,4$ % for melaninflekk-område, 5 cm og 13 cm bak.

Tabell 4: Gjennomsnittlig fettinnhold (%) for kontrollfileter og melaninfileter, i de respektive uttaks-punktene, inklusivt standardavvik. (Kontrollfileter $n=3$) (Melaninfileter $n=5$)

	Kontrollfileter			Melaninfileter		
	Melaninflekk-område	5 cm bak	13 cm bak	Melaninflekk-område	5 cm bak	13 cm bak
Fettinnhold (%)	$15,3 \pm 1,8$	$16,4 \pm 2,7$	$14,8 \pm 2,8$	$14,5 \pm 2,8$	$13,8 \pm 2,1$	$12,7 \pm 2,4$

4.4 Fettsyresammensetning

4.4.1 Mengde fettsyre pr. 100 g fett

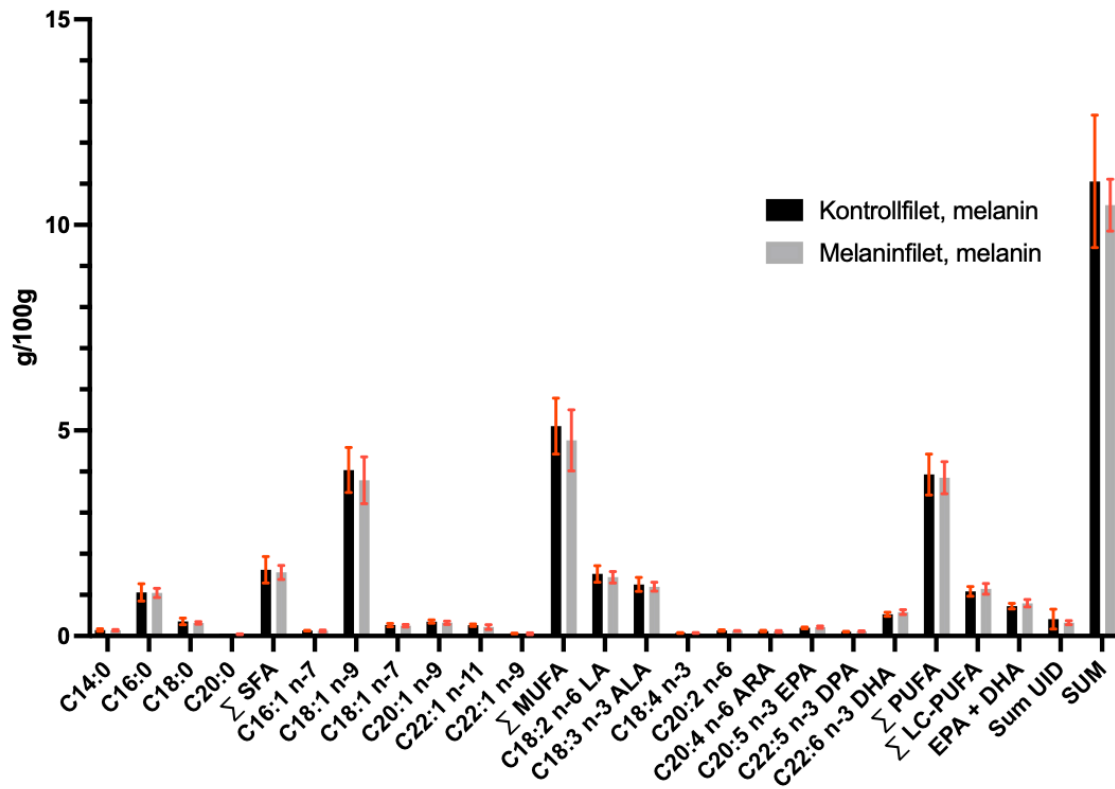
Tabell 5 viser gjennomsnittlig mengde fettsyre (g/100 g fett) tilhørende SD for henholdsvis kontrollfileter og melaninfileter. For kontrollfileter og melaninfileter var det samme fettsyremengde i de forskjellige uttaks-punktene innad filetene. Kontrollfiletene hadde en gjennomsnittlig verdi på omtrent 1,4 g SFA/100 g fett, 4,6 g MUFA/100 g fett og 3,7 g PUFA/100 g fett. Det var totalt ca. 1 g LC-PUFA/100 g fett, og ca. 0,65 g EPA + DHA/100 g fett. Det var for kontrollfileter omtrent 0,3 g uidentifiserte FA/100 g fett og totalt omtrent 10 g FA/100 g fett. Tilsvarende for melaninfileter var det gjennomsnittlig omtrent 1,5 g SFA/100 g fett, 4,7 g MUFA/100 g fett og 3,8 g PUFA/100 g fett. Det var totalt ca. 1 g LC-PUFA/100 g fett, og ca. 0,7 g EPA + DHA/100 g fett. Det var for melaninfiletene omtrent 0,35 g uidentifiserte FA/100 g fett og totalt omtrent 10 g FA/100 g fett. Ratio for n-6/n-3 lå på rundt 1,2 for både kontrollfileter og melaninfileter. Arealprosent for hver fettsyre i kontroll- og melaninfileter foreligger i Vedlegg 1. Forskjeller mellom kontrollfilet og melaninfilet i melaninflekk-området, med røde områder for SD, vises i Figur 7.

Tabell 5: Gjennomsnittlig mengde av hver fettsyre (g/100 g fett), inklusive standardavvik (SD). Fettsyrer som tilhører SFA, MUFA og PUFA er summert, samt LC-PUFA og EPA + DHA. Ratio for n-6/n-3 vises også. (Kontrollfileter n=3) (Melaninfileter n=5).

	Kontrollfileter			Melaninfileter		
	Melaninflekk- område	5 cm bak	13 cm bak	Melaninflekk	5 cm bak	13 cm bak
C14:0	0,15 ± 0,03	0,11 ± 0,08	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,02
C16:0	1,06 ± 0,21	0,81 ± 0,56	1,01 ± 0,15	1,05 ± 0,11	1,04 ± 0,08	0,89 ± 0,14
C18:0	0,35 ± 0,08	0,27 ± 0,19	0,34 ± 0,08	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,06
C20:0	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,01
∑ SFA	1,61 ± 0,32	1,23 ± 0,84	1,54 ± 0,26	1,55 ± 0,17	1,56 ± 0,16	1,34 ± 0,23
C16:1 n-7	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,07	0,14 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01
C18:1 n-9	4,04 ± 0,55	3,32 ± 2,26	4,14 ± 0,71	3,79 ± 0,57	4,09 ± 0,45	3,37 ± 0,28
C18:1 n-7	0,27 ± 0,04	0,21 ± 0,15	0,26 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,22 ± 0,02
C20:1 n-9	0,35 ± 0,04	0,29 ± 0,19	0,35 ± 0,06	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,04	0,28 ± 0,03
C22:1 n-11	0,26 ± 0,03	0,33 ± 0,05	0,27 ± 0,08	0,22 ± 0,06	0,23 ± 0,04	0,22 ± 0,04
C22:1 n-9	0,06 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,08	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,03
∑ MUFA	5,11 ± 0,68	4,37 ± 2,74	5,25 ± 1,00	4,76 ± 0,74	5,13 ± 0,59	4,25 ± 0,41
C18:2 n-6 LA	1,51 ± 0,20	1,27 ± 0,85	1,58 ± 0,30	1,43 ± 0,14	1,54 ± 0,19	1,26 ± 0,09
C18:3 n-3 ALA	1,26 ± 0,17	1,08 ± 0,72	1,34 ± 0,27	1,20 ± 0,11	1,28 ± 0,17	1,04 ± 0,06
C18:4 n-3	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,04	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01
C20:2 n-6	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,07	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01
C20:4 n-6 ARA	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,07	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01
C20:5 n-3 EPA	0,20 ± 0,02	0,17 ± 0,11	0,21 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,17 ± 0,01
C22:5 n-3 DPA	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,06	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,01
C22:6 n-3 DHA	0,53 ± 0,05	0,44 ± 0,28	0,49 ± 0,07	0,58 ± 0,06	0,49 ± 0,14	0,44 ± 0,02
∑ PUFA	3,93 ± 0,50	3,32 ± 2,20	4,05 ± 0,75	3,85 ± 0,39	3,95 ± 0,57	3,27 ± 0,22
∑ LC-PUFA	1,09 ± 0,12	0,91 ± 0,59	1,06 ± 0,17	1,15 ± 0,13	1,06 ± 0,20	0,90 ± 0,06
n-6/n-3 ratio	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2
EPA + DHA	0,73 ± 0,07	0,61 ± 0,39	0,70 ± 0,11	0,80 ± 0,09	0,70 ± 0,17	0,61 ± 0,03
Sum UID	0,41 ± 0,24	0,21 ± 0,16	0,34 ± 0,11	0,32 ± 0,05	0,37 ± 0,11	0,38 ± 0,20
SUM	11,06 ± 1,61	9,13 ± 1,40	11,19 ± 1,93	10,48 ± 0,63	11,01 ± 1,11	9,23 ± 0,89

SFA = mettede fettsyrer. MUFA = monoumettede fettsyrer. PUFA = flerumettede fettsyrer. LC-PUFA = langkjedede flerumettede fettsyrer. EPA = eikosapentaensyre. DHA = dokosaheksaensyre. LA = linolsyre. ALA = alfa-linolensyre. ARA = arakidonsyre. DPA = dokosapentaensyre. UID = uidentifisert. n-6 = omega-6. n-3 = omega-3.

Fettsyremengde (g/100g) i melaninområde



Figur 7: Graf som viser fettsyremengde (g/100 g) i melaninområde for kontrollfileter (n=3) og melaninfileter (n=5), med tilhørende røde områder for standardavvik. SFA = mettede fettsyrer. MUFA = monumettede fettsyrer. PUFA = flerumettede fettsyrer. LC-PUFA = langkjedede flerumettede fettsyrer. EPA = eikosapentaensyre. DHA = dokosaheksaensyre. LA = linolsyre. ALA = alfa-linolensyre. ARA = arakidonsyre. DPA = dokosapentaensyre. UID = uidentifisert. n-6 = omega-6. n-3 = omega-3.

4.5 Fettklasser påvist ved HPLC

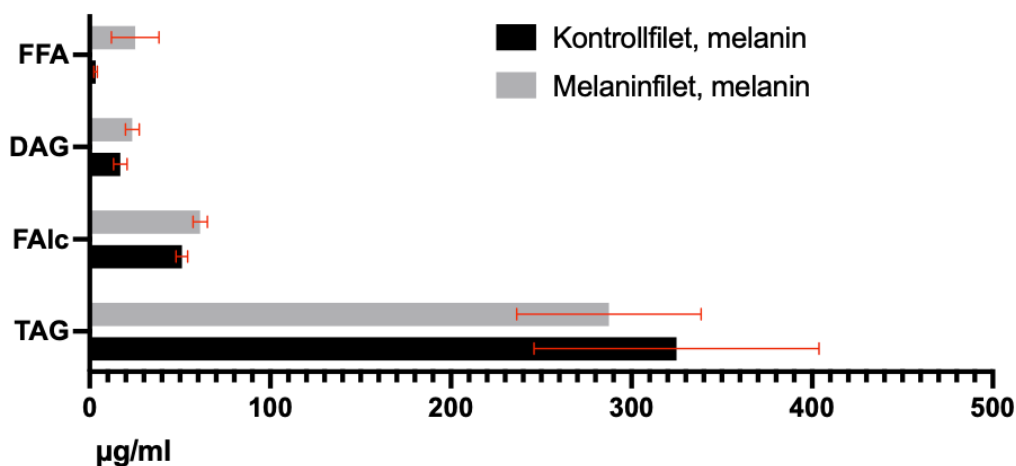
Tabell 6 viser gjennomsnittlig fettclassesammensetning ($\mu\text{g/ml}$) for de respektive fettclassene opplistet, tilhørende standardavvik, for henholdsvis kontrollfileter og melaninfileter. For melaninfileter ble fire fileter (ikke fem) kjørt på HPLC, da maskinen ikke har vært i drift siste del av kvartalet. Innhold av TAG i melaninflekk-området er høyere for kontrollfilet enn melaninfilet, med verdier på henholdsvis $324,9 \pm 78,9 \mu\text{g/ml}$ og $287,5 \pm 51,0 \mu\text{g/ml}$ (Figur 8). For de to andre uttaks-punktene er forskjellene lave. Høyere innhold av FAlc vises hos melaninfileter i melaninflekk-området, der verdiene er på henholdsvis $51,1 \pm 3,2 \mu\text{g/ml}$ for kontrollfilet og $61,2 \pm 4,0 \mu\text{g/ml}$ for melaninfilet. For 5 cm lenger bak og 13 cm lenger bak er det rundt $5 \mu\text{g/ml}$ høyere konsentrasjon av FAlc i melaninfiletene. Innhold av DAG er også høyere i melaninflekk-området i melaninfileter enn i kontrollfileter, med verdier på henholdsvis $23,6 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$ for melaninfileter og $17,0 \pm 3,8 \mu\text{g/ml}$ for kontrollfileter. For de to andre uttaks-punktene var innholdet henholdsvis $1,8 \mu\text{g/ml}$ og $4 \mu\text{g/ml}$ høyere i melaninfileter. Innhold av FFA er i melaninflekk-område høyere for melaninfileter, med henholdsvis $25,2 \pm 13,2 \mu\text{g/ml}$ for melaninfileter, og $3,3 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$ i kontrollfileter. Uttaks-punkt 5 cm lengre bak hadde et innhold på $13,6 \pm 9,6 \mu\text{g/ml}$ i melaninfiletene, og $4,4 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$ i kontrollfiletene, samtidig som uttaks-punkt 13 cm lengre bak hadde et innhold på $19,0 \pm 12,6 \mu\text{g/ml}$ i melaninfiletene, og $6,3 \pm 3,3 \mu\text{g/ml}$ i kontrollfiletene. Forskjellen mellom en vilkårlig kontrollfilet og melaninfilet vises i kromatogram i Vedlegg 2, med spesielt hensyn på forskjellen mellom arealene av FFA. Et ukjent areal dukket opp mellom DAG og FFA, og det var et høyere areal i melaninflekk-område i melaninfiletene, enn i kontrollfiletene, for denne toppen, se Vedlegg 3.

Tabell 6: Gjennomsnittlig fettklassesammensetning ($\mu\text{g/ml}$) for TAG, FAlc, DAG og FFA, for kontrollfileter ($n=3$) og melaninfileter ($n=4$) med tilhørende standardavvik etter analyse med HPLC.

	Kontrollfileter			Melaninfileter		
	Melaninflekk-område	5 cm bak	13 cm bak	Melaninflekk-område	5 cm bak	13 cm bak
TAG ($\mu\text{g/ml}$)	$324,9 \pm 78,9$	$313,8 \pm 69,4$	$326,7 \pm 74,7$	$287,5 \pm 51,0$	$301,0 \pm 77,9$	$324,1 \pm 64,7$
FAlc ($\mu\text{g/ml}$)	$51,1 \pm 3,2$	$48,9 \pm 1,8$	$49,5 \pm 1,9$	$61,2 \pm 4,0$	$54,2 \pm 5,1$	$56,1 \pm 5,4$
DAG ($\mu\text{g/ml}$)	$17,0 \pm 3,8$	$15,0 \pm 3,2$	$16,6 \pm 2,9$	$23,6 \pm 3,8$	$16,8 \pm 4,0$	$19,5 \pm 4,9$
FFA ($\mu\text{g/ml}$)	$3,3 \pm 1,0$	$4,4 \pm 2,2$	$6,3 \pm 3,3$	$25,2 \pm 13,2$	$13,6 \pm 9,6$	$19,0 \pm 12,6$

HPLC = høypresisjonskromatografi. TAG = triacylglyserol. FAlc = fettalkoholer. DAG = diacylglyserol. FFA = frie fettsyrer.

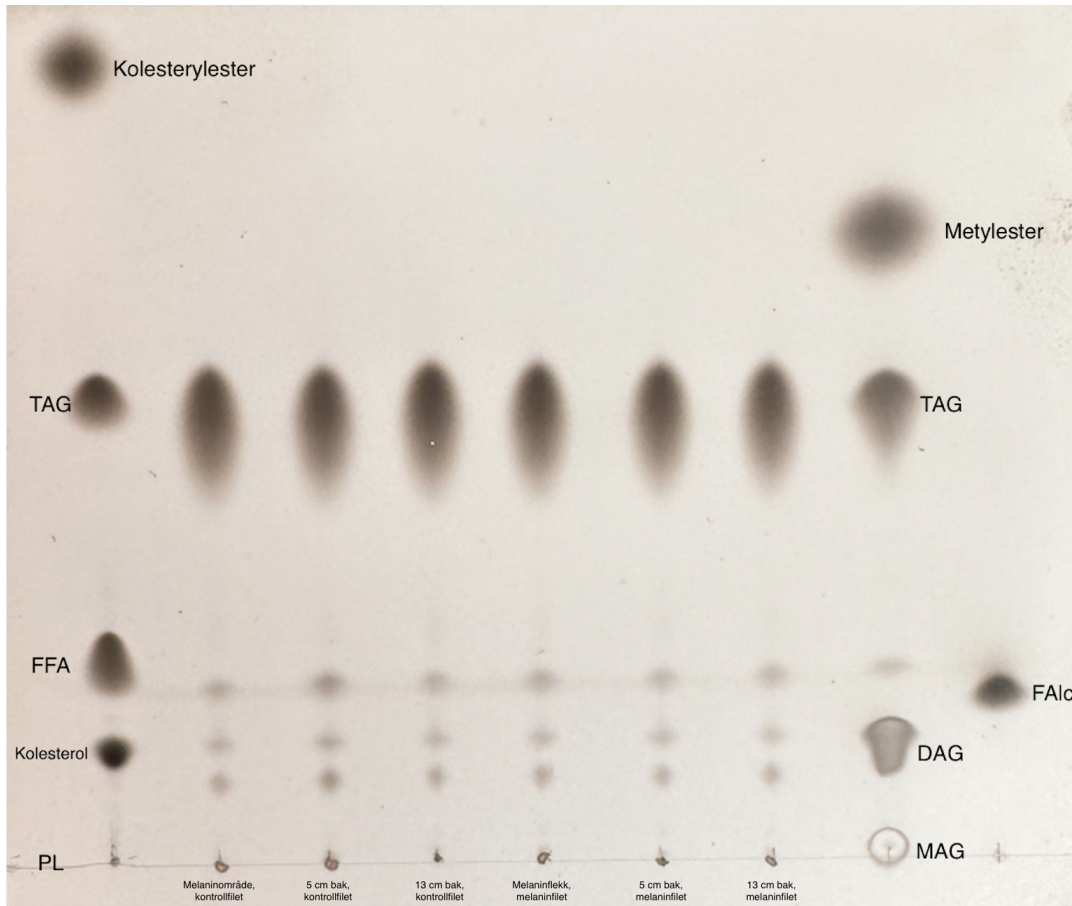
Fettklassesmengde ($\mu\text{g/ml}$) i melaninområde



Figur 8: Graf som viser fettklassesmengde ($\mu\text{g/ml}$) i melaninområde for kontrollfileter ($n=3$) og melaninfileter ($n=4$), med tilhørende røde områder for standardavvik. FFA = frie fettsyrer, DAG = diacylglyserol, FAlc = fettalkoholer, TAG = triacylglyserol.

4.6 Fettklasser påvist ved tynnsjiktchromatografi

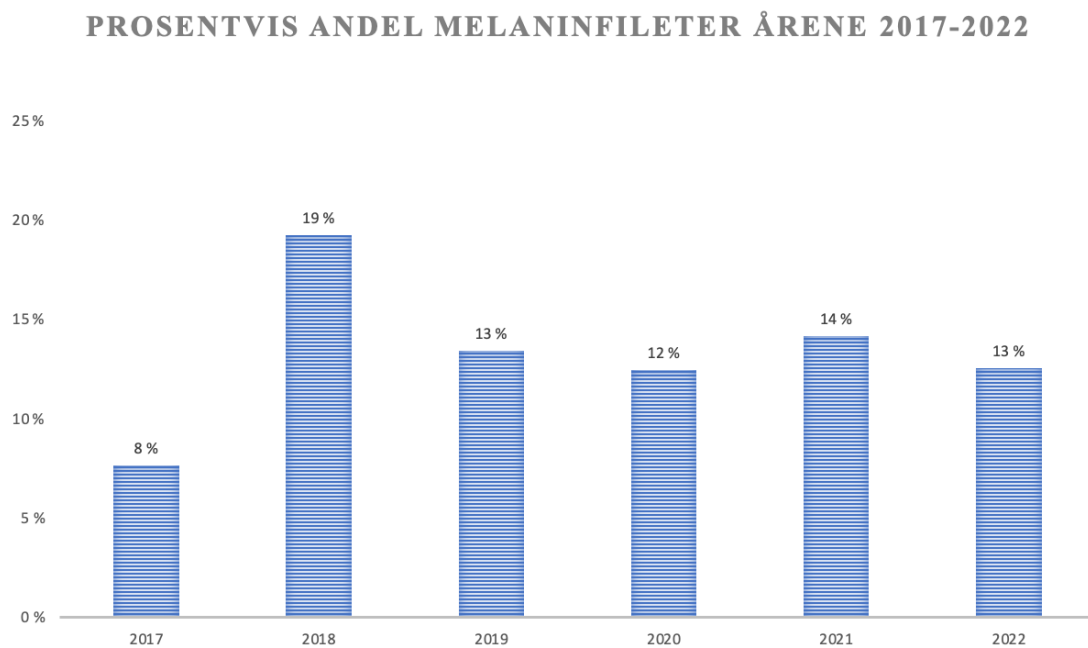
Figur 9 viser resultater fra påvisning av fettklasser for kontrollfilet og melaninfilet, med tynnsjiktchromatografi. Det er i prøvene påvist TAG, FFA, DAG, kolesterol og MAG og/eller PL.



Figur 9: Resultat fra påvisning av fettklasser i de ekstraherte prøvene fra en kontrollfilet og en melaninfilet, på tynnsjiktplate. Påvisning av TAG, FFA, DAG, kolesterol og MAG/PL er synlig. TAG = triacylglycerol. DAG = diacylglycerol. FAlc = fettalkoholer. FFA = frie fettsyrer. PL = fosfolipider. MAG = monoacylglycerol.

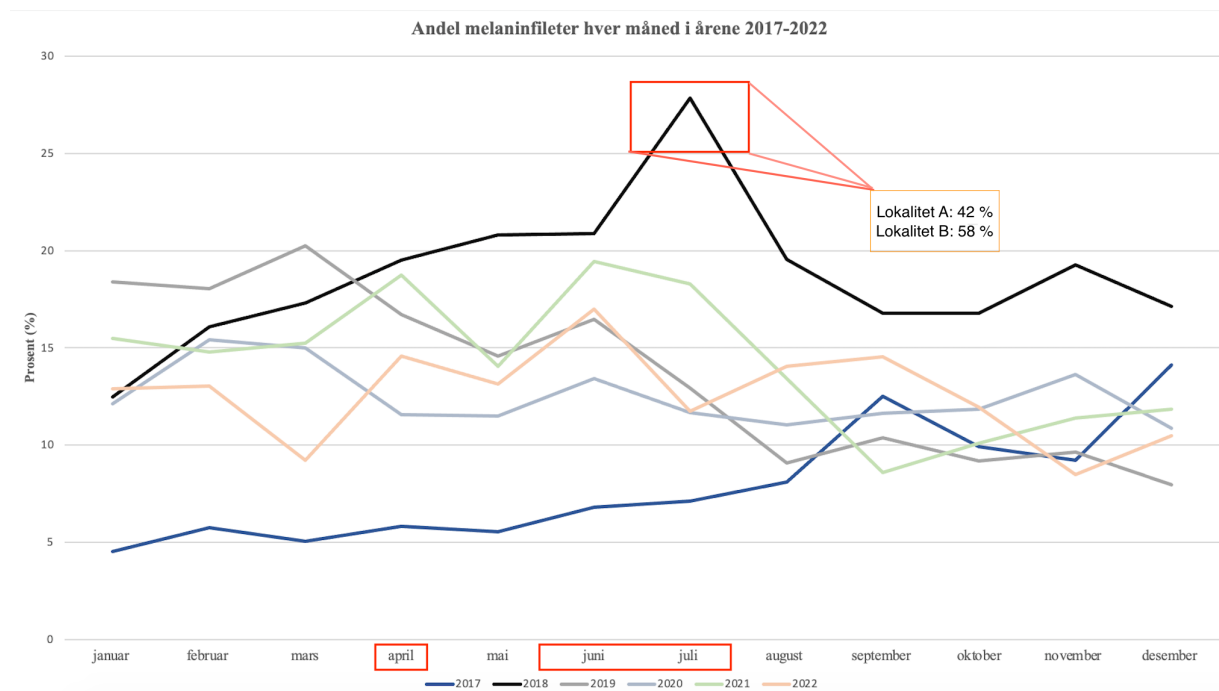
4.7 Forekomst av melaninflekker

Figur 10 viser prosentvis andel (%) av fileter med melanin fra år 2017 til 2022, registrert under kontrolltelling hver produksjonsdag gjennom årene for det aktuelle slakteriet. For årene 2017 til 2022 var lavest forekomst av fileter med melanin i 2017, mens det var høyest forekomst av fileter med melanin i 2018. Årene 2019-2022 viser en jevn forekomst på rundt 13 %.



Figur 10: Prosentvis andel (%) av melaninfileter årene 2017-2022, beregnet ut ifra data fra registreringer hver produksjonsdag gjennom årene, for det aktuelle slakteriet. Y-akse viser prosentandel, tallene over stolpene er det aktuelle årets prosentvise andel og x-aksen viser årstall.

Figur 11 viser prosentvis andel (%) melaninfileter for hver måned i hvert år, i alle årene 2017 til 2022, for alle produksjonsdager på det aktuelle slakteriet. Månedene der forekomsten toppet seg er vår- og sommermånedene, spesielt april, juni og juli, med forekomster fra 12-28 %. Senvinter- og vårmånedene (februar-mai) har også noe høyere forekomst, 10-20 %, mens det er jevnt rundt 10-12 % fra august til januar for de fleste årene. Årene med lavest og høyest forekomst, 2017 og 2018, er ulike i forekomsten gjennom sesongene. I 2017 økte forekomst høstmånedene og toppet seg i desember, mens i 2018 økte den i vår- og sommermånedene og toppet seg i juli. For året 2018 var forekomsten over 15 % i alle andre måneder enn januar. Figuren viser en utheving i juli-toppen i 2018, og slaktinger gjennomført denne måneden stammet fra to lokaliteter, lokalitet A og lokalitet B. Lokalitet A hadde en forekomst på 42 % og lokalitet B hadde en forekomst på 58 %. Lokalitetene er ikke i geografisk nærhet.



Figur 11: Prosentvis andel (%) av melaninfileter for hver måned over årene 2017-2022, beregnet ut fra registreringer gjort hver produksjonsdag gjennom årene, for det aktuelle slakteriet. Rød utheving øverst i figuren viser den høyeste toppen, denne er i juli 2018 og slaktinger denne måneden ble gjort fra to lokaliteter, lokalitet A og lokalitet B, der lokalitet B har høyere forekomst av melaninfileter. Røde uthevinger nede i figuren viser de månedene med høyest økning i melaninfileter hos det aktuelle slakteriet.

5 Diskusjon

Formålet med denne oppgaven var å undersøke næringsinnhold i form av fett i fileter med melaninflekker, herunder fettinnhold, fettsyresammensetning og fettklasseoppbygging. Forekomsten av melaninfileter ble også undersøkt, utfra et datasett med registreringer av laks slaktet i Nord-Norge. Det ble undersøkt tre kontrollfileter og fem melaninfileter (for HPLC-analyse: n=4), der det var tre korresponderende uttaks-punkt: Et punkt i forparten av fileten hvor melaninflekkene befant seg, samt to punkter 5 cm og 13 cm lengre bak.

5.1 Metodeutprøving

For bestemmelse av ekstraksjonsmetode ble det utført en metodeutprøving av gullstandardens Folchs metode mot etylacetatmetoden (Folch et al., 1957; NS9402, 1994). Begge ekstraksjonsmetodene er godt innarbeidet i forskningslaboratoriet som masteroppgaven ble gjennomført hos. Etylacetatmetoden benytter seg av etylacetat som løsemiddel, mens i den modifiserte Folchs-metoden, blir det klorerte organiske løsemidlet diklormetan (DCM) brukt. Det er ønskelig å utfase klorerte løsemidler fra metoder ved forskningslaben, da løsemidlene er klassifisert som CMR-substans (karsinogene, mutagene, eller reproduktive toksiske forbindelser) (Cayot et al., 2016). Høsten 2023 innførte HMS-ansvarlige ved UiT et krav om bruk av hansker godkjent for klorerte løsemidler, i henhold til sikkerhetsdatabladet til DCM (Merck Life Science AS, 2023). Dette representerte en utfordring, ettersom de aktuelle hanskene er betydelig tykkere og mindre egnet for arbeid som krever finmotorikk i forskningslaboratoriet. Metodeutprøving ble i tillegg gjennomført for å undersøke om fettekstraksjonsmetodene ga reproducerbare resultat på selve melaninflekkene, da metodene er standardiserte for normal laksefilet (uten melanin). Begge ekstraksjonsmetodene ga reproducerbare fettprosent som tilsvarte fettekstraksjon av kontrollfilet (laksefilet uten melanin). Etylacetat ga også ett prosentpoeng høyere fettinnhold for både melaninfileter og kontrollfileter sammenlignet med Folchs, i motsetning til tidligere studier der ekstraksjon med DCM og ekstraksjon med etylacetat/etanol og etylacetat/heksan ble sammenlignet, og DCM ga et høyere prosentutbytte sammenlignet med begge etylacetat-kombinasjonene (Cayot et al., 2016; Mitra & Mishra, 2019). Vanninnhold på melaninflekk og kontrollfilet var begge tilsvarende tidligere studier (Jensen et al., 2020; Jensen et al., 2012). Basert på dette kunne etylacetat, som fortrenger vannet i prøven, anvendes uten nødvendige modifikasjoner med tanke på justering av kjemikalieinnholdet i forhold til vanninnholdet (NS9402, 1994).

5.2 Fettinnhold

Prosentvist fettinnhold i tre korresponderende uttaks-punkt i melaninfileter og kontrollfileter ble bestemt ved fett ekstraksjon med etylacetat. En marginalt lavere fettprosent ble vist i melaninfiletene sammenlignet med kontrollfiletene. Høye SD indikerer imidlertid at de individuelle variasjonene kan være en mulig årsak, noe som også er støttet av tidligere studier hvis individuelle variasjoner var store (Fengle et al., 2014; Mørkøre et al., 2001). En tidligere studie viste en høyere fettprosent i tydelig mørke melaninflekker (opp mot 28 %) sammenlignet med kontroll, samtidig som flekker omtalt som grålig og mindre, hadde samme fettinnhold som kontrollfiletene (Mørkøre et al., 2022). Dette antyder at melaninflekker analysert i denne oppgaven ikke påvirket fettprosent, men det må også tas hensyn til uttaks-punkt, da det er en generell utfordring at fettprosent i laksefilet har en stor forskjell fra området med minst fettinnhold til området med mest, noe som ble dokumentert allerede i 2001. Det ble i studien vist et fettinnhold i ryggområdet på 4-12 %, og i bukområdet 16-20 % (Katikou et al., 2001). Siden da har fettinnholdet endret seg ettersom nye fôrressurser har tilkommet fôret (Moxness Reksten et al., 2022), men distribusjonen av fettinnhold er til dels uforandret, med bukområdet som det mest fettrike (Mørkøre et al., 2022). Det var derfor et fokus å sikre at de områder som ble analysert i denne masteroppgaven, korresponderte med hverandre, og avstand fra melaninflekk til uttaks-punkt lengre bak ble målt opp og fastsatt på forhånd. Melaninflekker befinner seg vanligvis i bukområdet av fileten (Mørkøre et al., 2022), men det vil være variasjoner i hvor melaninflekken konkret befinner seg fra filet til filet. Denne variasjonen vil føre til at prøvetakingen av melaninflekk og de to påfølgende uttaks-punktene kan være forskjellig mellom filetene, og uttak nærmere buk vil ha høyere fettprosent da dette som tidligere nevnt er det mest fettrike området. I tillegg vil selv relativt små vektforskjeller hos fiskene medføre store variasjoner i fettprosent, også mellom samme områder i ulike individer. Parameteren for helvekt har ikke vært mulig å kontrollere i denne masteroppgaven, ettersom tilgjengelig råmateriale allerede var ferdig filetert.

5.3 Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetning i det ekstraherte fett fra de tre korresponderende uttaks-punktene ble analysert ved hjelp av GC-FID. Det var ingen store forskjeller i fettsyresammensetning i de forskjellige uttaks-punktene for kontrollfiletene og melaninfiletene, og for selve melaninflekkene var funnene marginale. Dette antyder at melaninflekkene ikke innehar en ulik fettsyresammensetning sammenlignet med kontrollfileter. En tidligere studie fra 2022 analyserte fettsyresammensetning i fettklassene TAG og PL i melaninflekker, og de observerte

lite til ingen forskjell mellom melaninflekker og kontroll, uavhengig av melaninflekkenes fargeintensitet (Mørkøre et al., 2022). I tillegg har en tidligere studie vist at melaninflekker inneholder nekrotiske muskelceller i muskelvevet (Brandshaug, 2016), samt at en annen studie viste at flekkene inneholder økt mengde bindevev, spesielt i de større flekkene (Mørkøre et al., 2022). Dette kan antyde at påvirkningen fra melaninflekkene i større grad innvirker på muskelfibrene enn på fettsyresammensetningen i fettvevet. En sammenlignbar fettsyresammensetning mellom kontrollfiletene og melaninfiletene tyder derfor på at 100 g laksefilet, uavhengig av melanininhold, gir tilsvarende mengde fettsyrer. Dette gjelder også for de langkjedede flerumettede fettsyrene. Anbefalt forhold mellom n-6 og n-3 fettsyrer har tidligere vært fastsatt til 5:1 i studier som har undersøkt den vestlige dietten med dens høye n-6/n-3 ratio på 20:1 (Simopoulos, 2002, 2016). Til tross for en økning i planteoljer og derav n-6 i dagens laksefôr, opprettholder laks et nivå av n-6/n-3 ratio som er godt innenfor anbefalte verdier, med tidligere studier som rapporterer et forhold på 0,7-1:1 (Jensen et al., 2020; Aas et al., 2019). Melaninfiletene viste samme n-6/n-3 ratio som kontrollfiletene, hvor verdiene var i samsvar med både anbefalt kostholds-ratio og tidligere studier på n-6/n-3 ratio i laksefilet. Det materialet som skjæres vekk på fileteringslinja og representerer et økonomisk tap, har derfor en fettsyreprofil som er sammenlignbar med fileter uten flekker. Imidlertid kan det være utfordrende for et kresent forbrukermarked å akseptere misfarging i laksefileten selv om fettsyresammensetning ser ut for å være sammenlignbar, og det ville være mer fordelaktig å fastslå årsakssammenhenger for å kunne begrense forekomsten melaninflekkene.

5.4 Fettklassesammensetning

Tilstedeværelse av fettklasser ($\mu\text{g/ml}$) i melaninfiletene og kontrollfiletene ble undersøkt med HPLC-analyse og for visuell påvisning, tynnsjikt-kromatografi. HPLC-analysen gav et redusert innhold av TAG og økt innhold av DAG, FAlc og FFA i melaninfiletene sammenlignet med kontrollfiletene. Resultatene viste også her store SD, noe som indikerer betydelige individuelle forskjeller. Ved å øke antall analyserte individer (n) kunne man potensielt ha fått et mer presist estimat for å avgjøre om de observerte forskjellene er statistisk signifikante. Tynnsjikt-kromatografi påviste også TAG, FFA, DAG i både melaninfiletene og kontrollfiletene. I tillegg ble det også påvist kolesterol og MAG eller PL i begge råmaterialene, og dette hadde man ikke standarder for å påvise i HPLC-analysen. Tynnsjikt-kromatografi kan ikke angi hvorvidt det er MAG eller PL som er påvist på tynnsjikt-plata. Det er forventet at PL påvises i disse råmaterialene ettersom denne klassen er en integrert del av alle cellemembraner, sammen med kolesterol (Olsen, 2023). Følgelig vil disse komponentene

kunne detekteres i laksefilet. I laks fungerer TAG som lagringsfettet og representerer dermed den mest dominerende fettklassen i laksefilet (Olsen, 2023). Fettklassene DAG, MAG og FFA er produkter av hydrolyse av TAG (Erickson et al., 2022), og i tillegg til TAG og PL, er disse naturlig å detektere i små mengder i fileten (Jin et al., 2021). Det er viktig å påpeke at påvisningen av fettklassene i tynnsljikt-kromatografi ikke er kvantitative, men kun angir tilstedeværelse. Alle omtalte fettklasser er detektert i både kontrollfileter og melaninfileter, og dette er i overensstemmelse med litteratur (Jin et al., 2021). I HPLC-analysen ble det påvist FAlc, men denne fettklassen ble ikke detektert på tynnsljikt-plata. En mulig forklaring på dette kan være egenskapene til FAlc og dets løselighet i mobilfase A i HPLC-analysen, sammenlignet med elueringsløsning som brukes i tynnsljikt-kromatograf. Dette forblir imidlertid spekulativt, gitt mangelen på eksisterende litteratur på området.

Økt andel FFA i melaninfileter antyder en økt hydrolyseaktivitet, noe som er uønsket i næringsmiddelindustrien. Frie fettsyrer oksiderer lettere enn fettsyrer bundet i et triglyserid, noe som kan føre til dannelse av uønskede oksidasjonsprodukter som forringer kvaliteten og kan forårsake dårlig lukt eller smak (Olsen, 2023). En høyere forekomst av FFA kan også påvirke proteinet i fileten ved å forårsake denaturering, noe som resulterer i dårligere proteinkvalitet og negativt påvirker proteinets funksjoner, blant annet evne til å binde vann (Olsen, 2023). En tidligere histologisk studie av melaninflekker har bekreftet økt oksidasjon, ved at det ble påvist en akkumulering av 4-HNE (en indikator på fettoksidasjon) i flekkene, men ikke i kontrollfilet (Mørkøre et al., 2022). Langkjedede umettede fettsyrer er særlig utsatt for oksidasjon, og det kunne vært forventet at en reduksjon i disse fettsyrene ville vært synlig i en analyse av fettsyresammensetningen. Dette har imidlertid ikke blitt bekreftet i denne oppgaven, og det er mulig at oksidasjonen i melaninflekkene som ble analysert i denne masteroppgaven ikke var omfattende nok til å endre forekomsten av fettsyrer, eller at vevsendringene i melaninflekkene ikke hadde utviklet seg tilstrekkelig. Forskjeller i konsentrasjon av FFA ble også observert i to uttaks-punktene lengre bak, noe som antyder at melanisering kan påvirke på fileten utenfor området med melaninflekker. Det kan ikke fullstendig utelukkes at det ikke finnes melanin i punktene de bakre punktene som kan forårsake denne effekten.

Den ukjente toppen som angir arealet vist i tabellen i Vedlegg 3 viser en forskjell i melaninflekk-området mellom melaninfiletene og kontrollfiletene. Siden det ikke finnes noen standard for denne toppen i kromatogrammet, er det begrenset hva som kan kommenteres om det ukjente arealet. Likevel, med tanke på forskjellene i innholdet av TAG, DAG og FFA, kan det antydes at det er et degraderingsprodukt som danner denne toppen i kromatogrammet.

5.5 Forekomst

For å undersøke forekomst av melaninfileter hos et slakteri, ble et datasett med registreringer fra kontrolltellingene på slakteriets fileteringslinje analysert. Forekomsten var lavest i 2017 og høyest i 2018, og jevn årene 2019-2022. Et dypdykk i fiskehelse rapporter for de aktuelle årene viser at fiskehelseproblemer i 2017 og 2018 består av lakselus-behandlinger, vintersår og virussykdommer, da spesielt HSMB i Nord-Norge (Hjeltnes et al., 2018; Hjeltnes et al., 2019). Forekomst av sykdommene, samt lakselus-behandlinger var ca. på samme nivå disse to årene, og det er vanskelig å se noen fiskehelse relatert sammenheng i forskjellen mellom forekomsten av melaninfileter i disse to årene. Lakselus-behandlinger, vintersår og virussykdommer er de tre største fiskehelseproblemer for alle de seks analyserte årene, med små forskjeller fra år til år, i henhold til fiskehelse rapporten 2023 (Sommerset et al., 2024). Dette antyder at forekomster registrert på slakteriet ikke er sammenlignbart med fiskehelseproblemer oppnevnt på landsbasis, eller for Nord-Norge. På landsbasis var det i 2017 rapportert inn en forekomst på 17 % fra januar til august, av registreringer som baserer seg på samme type kontrolltellingene som analysert i denne masteroppgaven (Mørkøre, 2017). Noe senere eksisterer det per dags dato ikke noe data på. Dette styrker antagelsen om at det analyserte datasettet gir for lite grunnlag for videre diskusjon om grunner til forekomst. Den lave forekomsten i 2017, og den høye forekomsten i 2018 kan ikke knyttes opp mot noe som kan nevnes spesifikt. Med hensyn på årsakssammenhenger for melaninflekker som til nå er foreslått, ville det vært fordelaktig med et dypdykk i fiskehelse rapporter og håndtering av fisken på lokalitetsnivå gjennom år og måneder, for å dermed kunne si noe om grunner til de aktuelle forekomstene. Slike analyser vil potensielt kunne være med på å forklare årsakssammenhenger, og kanskje føre til kunnskap som kan bidra til reduksjon av melaninflekker og det økonomiske tapet som medføres.

I juli måned 2018 ble det registrert høyest forekomst, og denne måneden ble det slaktet ut fra to lokaliteter ble det for det aktuelle slakteriet. Lokalitetene hadde begge en høy forekomst av melaninfileter, og lokalitetene er ikke i geografisk nærhet, men i samme produksjonsområde. På månedsbasis over de seks årene var det gjennomsnittlig jevnt, med et større innslag av

melaninfileter i vår- og sommermånedene mars til juli, hovedsakelig april, juni og juli, og et lavere innslag på høsten og vinteren. Et høyere innhold av EPA og DHA i fôr, og dermed i filet, har vist å redusere forekomst av melaninflekker (Sissener et al., 2016). I relasjon til at melaninflekker forekommer mest på laks slaktet på vår/sommer, i dette tilfellet, kan fiskens appetitt og sesongvariasjoner i filetens innhold ha noe å si, da laksen gjerne har dårligere appetitt ved kaldere temperaturer (Smith et al., 1993). Det ble også sett en sammenheng med økningen av melaninflekker rundt den tiden det ble mer innhold av omega-6 og mindre innhold av omega-3 i fôr, grunnet bruk av mindre marine oljer og mer planteoljer som råstoff i fôr (Jensen et al., 2020). Dette foreslår at fôret og sesongbaserte variasjoner i appetitt kan ha noe å si for en høyere forekomst av melaninflekker i enkelte sesonger, i kombinasjon med sykdommer og miljøfaktorer. Denne teorien er derimot avhengig av mer kunnskap om når melaninflekkene oppstår, og flekkdannelsens tidsforløp. Litteraturen forteller om melaninflekkdannelse etter fisken har kommet i sjø (Mørkøre et al., 2022), men mer enn dette er utfordrende å si noe om og derfor blir sesongvariasjoner i melaninflekker relatert til appetitt spekulativt.

5.6 Forslag til videre arbeid

I denne masteroppgaven ble det sett på vann- og fettinnhold, samt fettsyre- og fettklasesammensetning i totalt åtte fileter av atlantiske laks slaktet samme uke. Et mer storskala forsøk med flere individer kunne vært interessant å undersøke, for å ha mer data til sammenlikning av melaninfilet og kontrollfilet. Her kan det også med fordel sammenlignes bare melaninflekk-område i filetgruppene. Da kan man også si noe mer om signifikans i forsøket som følge av høyere n. Det kunne vært spesielt interessant å gjøre en HPLC-analyse, med flere standarder, eksempelvis standard for PL, da en akkumulering av melanomakrofager tilfører mer celler i området og vil potensielt øke konsentrasjonen av PL. I tillegg til analyse av filet, vil det være hensiktsmessig å analysere fôret den aktuelle fiskegruppen har fått, da fôrets fettsammensetning vil gjenspeiles i filet. For et helhetlig forsøk vil vekt av filet også være hensiktsmessig å ha med.

I oppgaven var alle melaninflekkene av samme karakter med hensyn til farge, dybde i filet og plassering. Det kunne vært interessant å analysere et utvalg av flekker med ulik karakter (men på samme plassering i fileten), for eksempel ulik fargeintensitet.

Det ble bare foretatt analyse av et datasett fra ett enkelt slakteri. Det ville vært interessant å sammenligne samme type data fra flere slakteri i ulike områder i landet, for å kunne knytte sammen årstider med høye forekomster, og sette det i sammenheng med informasjon om fiskehelse m.m. på landsbasis. Det ville vært spesielt interessant å se på forekomst ned på merdnivå på ulike anlegg, og kanskje kunne ha sporet det tilbake til settefiskanlegg og historien til den aktuelle fiskegruppen.

6 Konklusjon

Formålet med denne oppgaven var å sammenligne næringsinnhold i form av fettinnhold, fettsyresammensetning og fettklassesammensetning i melaninfileter og kontrollfileter, samt å analysere et datasett med registreringer av melaninflekker fra et slakteri med fileteringslinje, som slakter for lokaliteter i Nord-Norge. Det var lite forskjell i fettinnhold mellom filetene med og uten melaninflekker, og datasettet inneholdt store individforskjeller. Det er derfor lite trolig at melaninflekkene analysert i denne masteroppgaven påvirker fettinnholdet i laksefileten sammenlignet med kontrollfilet. Fettsyresammensetning i filetene var også tilnærmet like. Melaninfiletene hadde et høyere innhold av fettklassene DAG, FAlc og FFA, samt et lavere innhold av TAG i filetene. Det er likevel viktig å fremheve at økt mengde FFA i melaninfileter sammenlignet med kontrollfileter antyder en større hydrolyseaktivitet og potensiale for oksidering av fettsyrer. Store standardavvik antyder individuelle forskjeller innad i gruppene med råmateriale og viser at de vil være hensiktsmessig å øke individ-antallet (n) for å undersøke om forskjellene er statistisk signifikant. Forekomsten av melaninfileter hos det aktuelle slakteriet viste seg å være jevn fra 2019-2022, mens det hadde et år med høy forekomst i 2018 og lav forekomst i 2017. Det ble ikke funnet noen sammenhenger med forekomstene registrert på dette slakteriet og informasjon om fiskehelse m.m. fra de aktuelle årene. Melaninflekker består som et kvalitetsproblem og videre undersøkelser på årsakene til flekkene vil kanskje kunne føre til løsninger som kan være med på å redusere forekomsten og det økonomiske tapet.

Referanseliste

- Abreu, S., Solgadi, A. & Chaminade, P. (2017). Optimization of normal phase chromatographic conditions for lipid analysis and comparison of associated detection techniques. *J Chromatogr A*, 1514, 54-71. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.063>
- Agius, C. & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J Fish Dis*, 26(9), 499-509. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x>
- AOAC International. (1995). Official methods of analysis of AOAC International. I. AOAC International.
- Apovian, C. M. (2016). Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*, 22(7), 176-185.
- Béné, C., Barange, M., Subasinghe, R., Pinstруп-Andersen, P., Merino, G., Hemre, G.-I. & Williams, M. (2015). Feeding 9 billion by 2050 – Putting fish back on the menu. *Food Security*, 7(2), 261-274. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0427-z>
- Bjørgen, H. (2022). *Melanised focal changes in Atlantic salmon : interactions between infection and immunity* [Norwegian University of Life Sciences, Ås].
- Bjørgen, H., Haldorsen, R., Oaland, Ø., Kvellestad, A., Kannimuthu, D., Rimstad, E. & Koppang, E. O. (2019). Melanized focal changes in skeletal muscle in farmed Atlantic salmon after natural infection with Piscine orthoreovirus (PRV). *J Fish Dis*, 42(6), 935-945. <https://doi.org/10.1111/jfd.12995>
- Bjørgen, H. & Koppang, E. O. (2024). The melano-macrophage: The black leukocyte of fish immunity. *Fish Shellfish Immunol*, 148, 109523. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109523>
- Brandshaug, O. K. (2016). *Påvisning av melaninflekker i filet hos slakteklar Atlantisk laks (Salmo salar L.)* [UiT The Arctic University of Norway].
- Brattgjerd, S. & Evensen, O. (1996). A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Vet Pathol*, 33(1), 55-65. <https://doi.org/10.1177/030098589603300106>
- Brenna, J. T. & Lapillonne, A. (2009). Background paper on fat and fatty acid requirements during pregnancy and lactation. *Ann Nutr Metab*, 55(1-3), 97-122. <https://doi.org/10.1159/000228998>
- Brimsholm, M., Fjelldal, P. G., Hansen, T., Fraser, W., Solberg, M., Glover, K., Koppang, E. O. & Bjorgen, H. (2023). Red and melanized focal changes in white skeletal muscle in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Comparative analysis of farmed, wild and hybrid fish reared under identical conditions. *J Fish Dis*, 46(12), 1377-1389. <https://doi.org/10.1111/jfd.13856>
- Calder, P. C. (2011). Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. *Eur J Pharmacol*, 668(1), 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.085>
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 39(1), 18-32. <https://doi.org/10.1177/0148607115595980>

- Cayot, N., Lafarge, C., Bou-Maroun, E. & Cayot, P. (2016). Substitution of carcinogenic solvent dichloromethane for the extraction of volatile compounds in a fat-free model food system. *J Chromatogr A*, 1456, 77-88. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.015>
- ChemSynthesis. (2022, 07.02.2024). Alpha-Linolenic Acid I. <https://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-14166.html>
- Cordero, R. J. B. & Casadevall, A. (2020). Melanin. *Curr Biol*, 30(4), 142-143. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.042>
- Djuricic, I. & Calder, P. C. (2021). Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/nu13072421>
- Epanand, R. M. (2015). Introduction to membrane lipids. *Methods Mol Biol*, 1232, 1-6. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1752-5_1
- Erickson, M., Yevtushenko, D. & Lu, Z.-X. (2022). Oxidation and Thermal Degradation of Oil during Frying: A Review of Natural Antioxidant Use. *Food Reviews International*, 39, 1-32. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2039689>
- Fengle, Z., Peng, J., Gao, J., Yanru, Z., Keqiang, Y. & Yong, H. (2014). Determination and visualization of fat contents in salmon fillets based on visible and near-infrared hyperspectral imagery. *TCSAE* 30. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-6819.2014.23.040>
- Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781>
- Färber, F. (2017). *Melanin spots in Atlantic salmon fillets : an investigation of the general problem, the frequency and the economic implication based on an online survey* [Norwegian University of Life Sciences, Ås].
- Gjedrem, T., Gjøen, H. M. & Gjerde, B. (1991). Genetic origin of Norwegian farmed Atlantic salmon. *Aquaculture*, 98(1), 41-50. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(91\)90369-I](https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90369-I)
- Graeve, M. & Janssen, D. (2009). Improved separation and quantification of neutral and polar lipid classes by HPLC-ELSD using a monolithic silica phase: application to exceptional marine lipids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(20-21), 1815-1819. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.004>
- Havforskningsinstituttet. (2019). *Tema: Laks*. Hentet 10.03.2024 fra <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/laks>
- Helsedirektoratet. (2018, 05.10.18). *Kosthold ved overvekt og fedme* Hentet 05.04.24 fra <https://www.helsedirektoratet.no/faglige-rad/kosthold-ved-diagnoser-og-sykdomstilstander/rad-om-kosthold-ved-ulike-diagnoser-og-sykdomstilstander/kosthold-ved-overvekt-og-fedme#referere>
- Hjeltnes, B., Bang, B. J., Bornø, G., Haukaas, A. & Walde, C. S. (2018). *Fiskehelserapporten 2017*. Veterinærinstituttet.
- Hjeltnes, B., Bang, B. J., Bornø, G., Haukaas, A. & Walde, C. S. (2019). *Fiskehelserapporten 2018*. Veterinærinstituttet.

- Jensen, I. J., Eilertsen, K. E., Otnæs, C. H. A., Mæhre, H. K. & Elvevoll, E. O. (2020). An Update on the Content of Fatty Acids, Dioxins, PCBs and Heavy Metals in Farmed, Escaped and Wild Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *Foods*, 9(12), 1901. <https://doi.org/10.3390/foods9121901>
- Jensen, I. J., Mæhre, H. K., Tømmerås, S., Eilertsen, K. E., Olsen, R. L. & Elvevoll, E. O. (2012). Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is a good source of long chain omega-3 fatty acids. *Nutr Bull* 37, 25-29. <https://doi.org/10.1111/j.1467-3010.2011.01941.x>
- Jiménez-Guerrero, R., Baeverfjord, G., Evensen, Ø., Hamre, K., Larsson, T., Dessen, J.-E., Gannestad, K. H. & Mørkøre, T. (2022). Rib abnormalities and their association with focal dark spots in Atlantic salmon fillets. *Aquaculture*, 561, 738697. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738697>
- Jin, Y., Harvey, T. N., Bartosova, Z., Hassani, S., Bruheim, P., Sandve, S. R. & Vik, J. O. (2021). Diet and Life Stage-Associated Lipidome Remodeling in Atlantic Salmon. *J Agric Food Chem*, 69(12), 3787-3796. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07281>
- Katikou, P., Hughes, S. I. & Robb, D. H. F. (2001). Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Aquaculture*, 202(1), 89-99. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00562-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00562-2)
- Koppang, E. O., Haugarvoll, E., Hordvik, I., Aune, L. & Poppe, T. T. (2005). Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle. *J Fish Dis*, 28(1), 13-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00583.x>
- Kottler, V. A., Künstner, A. & Schartl, M. (2015). Pheomelanin in fish? *Pigment Cell Melanoma Res*, 28(3), 355-356. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12359>
- Krasnov, A., Moghadam, H., Larsson, T., Afanasyev, S. & Mørkøre, T. (2016). Gene expression profiling in melanised sites of Atlantic salmon fillets. *Fish Shellfish Immunol*, 55, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.012>
- Kromann, N. & Green, A. (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand*, 208(5), 401-406. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7457208>
- Larsen, H. A., Austbø, L., Mørkøre, T., Thorsen, J., Hordvik, I., Fischer, U., Jirillo, E., Rimstad, E. & Koppang, E. O. (2012). Pigment-producing granulomatous myopathy in Atlantic salmon: a novel inflammatory response. *Fish Shellfish Immunol*, 33(2), 277-285. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.012>
- Larsen, H. A., Austbø, L., Nødtvedt, A., Fraser, T. W., Rimstad, E., Fjellidal, P. G., Hansen, T. & Koppang, E. O. (2014). The effect of vaccination, ploidy and smolt production regime on pathological melanin depositions in muscle tissue of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis*, 37(4), 327-340. <https://doi.org/10.1111/jfd.12106>
- Li, Y., Zhao, T., Li, J., Xia, M., Li, Y., Wang, X., Liu, C., Zheng, T., Chen, R., Kan, D., Xie, Y., Song, J., Feng, Y., Yu, T. & Sun, P. (2022). Oxidative Stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the Pathogenesis and Treatment of Aging-related Diseases. *J Immunol Res*, 2022, 2233906. <https://doi.org/10.1155/2022/2233906>
- Malik, M. S., Bjørgen, H., Nyman, I. B., Wessel, Ø., Koppang, E. O., Dahle, M. K. & Rimstad, E. (2021). PRV-1 Infected Macrophages in Melanized Focal Changes in White Muscle of

- Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Correlates With a Pro-Inflammatory Environment. *Front Immunol*, 12, 664624. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.664624>
- Merck Life Science AS. (2023). *Sikkerhetsdatablad Diklormetan*. Hentet 10.05.2024 fra <https://www.sigmaaldrich.com/NO/no/sds/sial/270997?userType=anonymous>
- Mitra, M. & Mishra, S. (2019). A comparative analysis of different extraction solvent systems on the extractability of eicosapentaenoic acid from the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica*. *Algal Research*, 38, 101387. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101387>
- Moxness Reksten, A., Ho, Q. T., Nostbakken, O. J., Wik Markhus, M., Kjellevold, M., Bokevold, A., Hannisdal, R., Froyland, L., Madsen, L. & Dahl, L. (2022). Temporal variations in the nutrient content of Norwegian farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), 2005-2020. *Food Chem*, 373(B), 131445. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131445>
- Mozaffarian, D. & Rimm, E. B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Jama*, 296(15), 1885-1899. <https://doi.org/10.1001/jama.296.15.1885>
- Mørkøre, T. (2012). *Filet av oppdrettslaks: Kvalitetsavvik og årsakssammenhenger* (17/2012). Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering. <https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/bitstream/handle/11250/2504618/Rapport+17-2012.pdf?sequence=2>
- Mørkøre, T. (2017). *Mørke flekker i laksefilet - kunnskapsstatus* Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering. https://www.researchgate.net/publication/321315512_Morke_flekker_i_laksefilet_-_kunnskapsstatus
- Mørkøre, T., Larsson, T., Jiménez-Guerrero, R., Moreno, H. M., Borderias, A. J., Ruyter, B., Standal, I. B., Samo, A., Evensen, Ø., Dessen, J.-E., Rørvik, K.-A., Hamre, K., Andersen, Ø., Wakamatsu, K., Ito, S., Gannestad, K. H., Xu, C., Østbye, T.-K., Hillestad, B., Torgersen, J. S. & Bæverfjord, G. (2022). *EX-spot: Mørke flekker i laksefilet. Årsak til dannelse og tiltak som hemmer utvikling* (27/2022). Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering. Nofima. https://www.researchgate.net/profile/Turid-Morkore/publication/366685907_EX-spot_Morke_flekker_i_laksefilet_Arsak_til_dannelse_og_tiltak_som_hemmer_utvikling_Dark_spots_in_salmon_fillets_Causes_and_measures_that_inhibit_development/links/63aecdaf097c7832ca7980cb/EX-spot-Morke-flekker-i-laksefilet-Arsak-til-dannelse-og-tiltak-som-hemmer-utvikling-Dark-spots-in-salmon-fillets-Causes-and-measures-that-inhibit-development.pdf
- Mørkøre, T., Vallet, J., Cardinal, M., Gomez-Guillen, M. C., Montero, P., Torrissen, O. J., Nortvedt, R., Sigurgisladdottir, S. & Thomassen, M. S. (2001). Fat Content and Fillet Shape of Atlantic Salmon: Relevance for Processing Yield and Quality of Raw and Smoked Products. *J. Food Sci.*, 66 (9), 1348-1354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15213.x>
- Norges Sjømatråd. (2023, 22.09.23). *Ny undersøkelse: Hvilken vei svømmer laksen?* . Hentet 02.02.24 fra <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/ny-undersokelse-hvilken-vei-svømmer-laksen/>
- Norges Sjømatråd. (2024a, 19.01.2024). *Nøkkeltall*. Hentet 05.01.2024 fra <https://nokkeltall.seafood.no/>
- Norges Sjømatråd. (2024b, 04.01.2024). *Prisvekst og svak krone ga eksportrekord for norsk sjømat i 2023*. Hentet 05.01.2024 fra <https://seafood.no/aktuelt/nyheter/prisvekst-og-svak-krone-ga-eksportrekord-for-norsk-sjomat-i-2023/>

- NS9402. (1994). Atlantic Salmon - measurement of colour and fat
- Nærings- og fiskeridepartementet. (2021). *Et hav av muligheter - regjeringens havbruksstrategi* regjeringen.no Hentet 07.02.2024 fra <https://www.regjeringen.no/contentassets/e430ad7a314e4039a90829fcd84c012a/no/pdfs/et-hav-av-muligheter.pdf>
- Olsen, R. L. (2023). *Lipidkjemi - med vekt på fisk* Universitetet i Tromsø.
- Rimm, E. B., Appel, L. J., Chiuve, S. E., Djoussé, L., Engler, M. B., Kris-Etherton, P. M., Mozaffarian, D., Siscovick, D. S. & Lichtenstein, A. H. (2018). Seafood Long-Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: A Science Advisory From the American Heart Association. *Circulation*, 138(1), 35-47. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000574>
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, 56(8), 365-379. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00253-6)
- Simopoulos, A. P. (2016). An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity. *Nutrients*, 8(3), 128. <https://doi.org/10.3390/nu8030128>
- Sissener, N. H., Waagbø, R., Rosenlund, G., Tvenning, L., Susort, S., Lea, T. B., Oaland, Ø., Chen, L. & Breck, O. (2016). Reduced n-3 long chain fatty acid levels in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) do not reduce growth, robustness or product quality through an entire full scale commercial production cycle in seawater. *Aquaculture*, 464, 236-245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.034>.
- Smith, P., Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A. & Kadri, S. (1993). Daily and seasonal patterns in the feeding behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in a sea cage. *Aquaculture*, 117(1-2), 165-178. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90133-J](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90133-J)
- Sommerset, I., Wiik-Nielsen, J., Moldal, T., Oliviera, V. H. S., Svendsen, J. C., Haukaas, A. & Brun, E. (2024). *Fiskehelse rapporten 2023* (8a/2024).
- Song, W., Yang, H., Liu, S., Yu, H., Li, D., Li, P. & Xing, R. (2023). Melanin: insights into structure, analysis, and biological activities for future development. *J Mater Chem B*, 11(32), 7528-7543. <https://doi.org/10.1039/d3tb01132a>
- Steinel, N. C. & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage Centers As a Histological Indicator of Immune Function in Fish and Other Poikilotherms. *Front Immunol*, 8, 827. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00827>
- Swanson, D. B., R.; Shaker A Mousa 20. (2012). Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. 3, (1), 3-7. <https://doi.org/10.3945/an.111.000893>
- United Nations. (2015). «TRANSFORMING OUR WORLD: THE 2030 AGENDA FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT». Hentet 04.02.2024 fra <https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/21252030%20Agenda%20for%20Sustainable%20Development%20web.pdf>
- United Nations. (2019). *World Population Prospects 2019 - Highlights* Department of Economic and Social Affairs Population Division. Hentet 04.02.2024 fra https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf
- W. W. Christie, X. H. (2010). The preparation of methyl and other esters of fatty acids. I *Lipid Analysis* (4. utg., s. 146-152). Oily Press.

- Wakamatsu, K., Dijkstra, J. M., Morkore, T. & Ito, S. (2023). Eumelanin Detection in Melanized Focal Changes but Not in Red Focal Changes on Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Fillets. *Int J Mol Sci*, (23). <https://doi.org/10.3390/ijms242316797>
- Willett, W. C., Koplan, J. P., Nugent, R., Dusenbury, C., Puska, P. & Gaziano, T. A. (2006). Prevention of Chronic Disease by Means of Diet and Lifestyle Changes. I D. T. Jamison, J. G. Breman, A. R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D. B. Evans, P. Jha, A. Mills & P. Musgrove (Red.), *Disease Control Priorities in Developing Countries*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.
- World Health Organization. (2024). *Obesity and overweight*. Hentet 26.03.2024 fra <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Aas, T. S., Ytrestøyl, T. & Åsgård, T. (2019). Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquac. Rep.*, 15, 100216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100216>

Vedlegg

Vedlegg 1

Fettsyresammensetning i arealprosent (%)

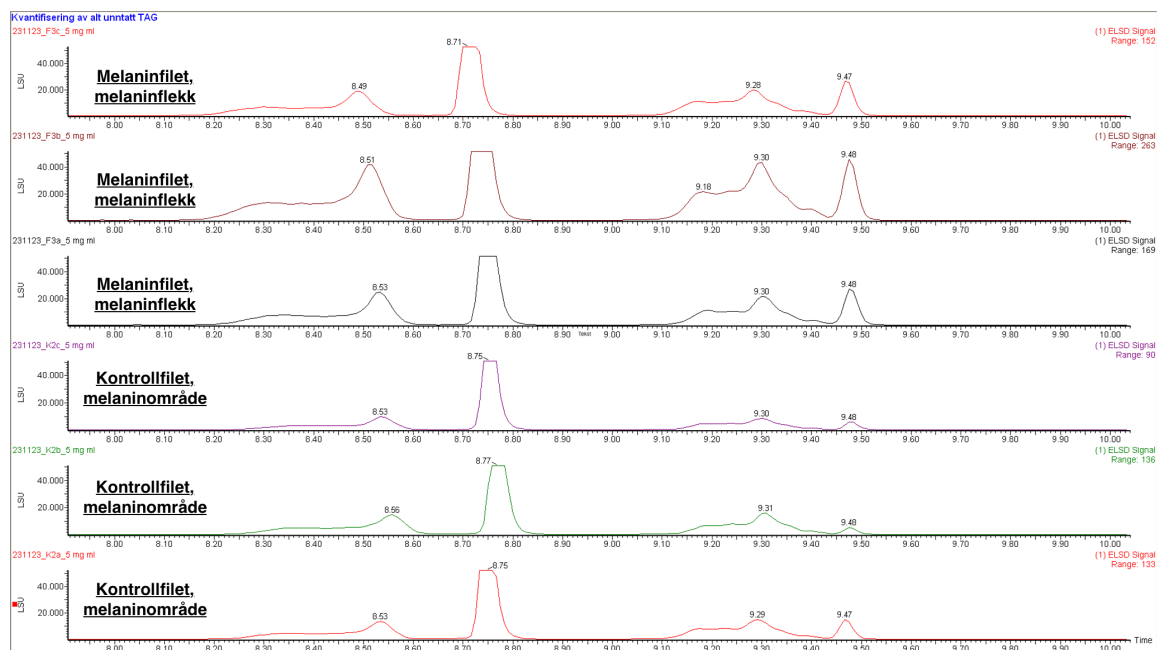
Gjennomsnittlig arealprosent (%), inklusive standardavvik. Mettede fettsyrer, monoumettede fettsyrer og flerumettede fettsyrer er summert, samt langkjedede flerumettede fettsyrer og EPA + DHA.

	Kontrollfileter			Melaninfileter		
	Melaninflekk-område	5 cm bak	13 cm bak	Melaninflekk	5 cm bak	13 cm bak
C14:0	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1
C16:0	9,5 ± 0,7	9,1 ± 0,7	9,1 ± 0,7	10,0 ± 0,3	8,9 ± 1,2	9,6 ± 0,7
C18:0	3,2 ± 0,4	3,0 ± 0,4	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,4	3,0 ± 0,4
C20:0	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2
∑ SFA	14,5 ± 1,3	13,9 ± 1,5	13,8 ± 1,2	14,8 ± 0,5	13,7 ± 1,9	14,5 ± 1,3
C16:1 n-7	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0
C18:1 n-9	36,6 ± 0,7	36,7 ± 0,4	36,9 ± 0,7	36,0 ± 1,3	36,9 ± 0,8	36,5 ± 0,9
C18:1 n-7	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,0	2,4 ± 0,1
C20:1 n-9	3,2 ± 0,1	3,2 ± 0,0	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1
C22:1 n-11	2,4 ± 0,1	3,2 ± 0,7	2,3 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,4
C22:1 n-9	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,4	0,8 ± 0,5	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,3
∑ MUFA	46,3 ± 1,3	47,6 ± 1,7	46,6 ± 1,8	45,3 ± 2,0	46,3 ± 1,5	46,0 ± 1,8
C18:2 n-6 LA	13,7 ± 0,6	13,9 ± 0,4	14,0 ± 0,6	13,7 ± 0,4	13,9 ± 0,6	13,7 ± 0,6
C18:3 n-3 ALA	11,4 ± 0,7	11,6 ± 0,4	11,8 ± 0,5	11,5 ± 0,5	11,5 ± 0,7	11,3 ± 0,7
C18:4 n-3	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C20:2 n-6	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0
C20:4 n-6 ARA	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0
C20:5 n-3 EPA	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1
C22:5 n-3 DPA	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0
C22:6 n-3 DHA	4,8 ± 0,4	4,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	5,5 ± 0,2	4,9 ± 0,3	4,8 ± 0,3
∑ PUFA	35,6 ± 2,1	36,0 ± 1,2	36,4 ± 1,5	36,8 ± 1,3	36,1 ± 1,9	35,5 ± 1,9
∑ LC-PUFA	9,9 ± 0,8	9,8 ± 0,4	9,9 ± 0,5	10,8 ± 0,4	10,0 ± 0,6	9,8 ± 0,5
EPA + DHA	6,6 ± 0,5	6,5 ± 0,2	6,6 ± 0,3	7,6 ± 0,3	6,8 ± 0,4	6,6 ± 0,4
Sum UID	3,6 ± 1,9	2,1 ± 0,5	3,2 ± 1,3	3,1 ± 0,5	3,4 ± 1,2	4,0 ± 1,8
SUM	100,0 ± 6,5	99,6 ± 4,9	100,0 ± 5,9	99,9 ± 4,3	99,5 ± 6,5	100,1 ± 6,7

Vedlegg 2

Kromatogram fra HPLC

Kromatogram fra HPLC, med en konsentrasjon for kvantifisering av fettalkoholer, DAG og FFA. Et ukjent areal oppstår rundt 9.30, og er betydelig høyere i melaninflekk enn i samme område på kontrollfilet. Toppen på FFA er også betydelig høyere i melaninflekk enn i samme område på kontrollfilet.



Vedlegg 3

Tabell for ukjent areal

Gjennomsnittlig areal for kontrollfileter og melaninfileter tilhørende standardavvik. Det eksisteres ikke standarder for å gjøre utregninger for disse ukjente toppene, som opptrer mellom DAG og FFA, med tid ca. 9.30.

		Melaninflekk- område ¹	5 cm bak	13 cm bak
Ukjent Melaninfilet	areal	5373,5 ± 2213,7	2960,8 ± 1483,2	4338,3,0 ± 2760,5
Ukjent Kontrollfilet	areal	1829,3 ± 970,9	1385,3 ± 717,6	1763,0 ± 872,2

Vedlegg 4

Gradientprofil for HPLC-program

Gradientprofil for HPLC-programmet under fettklasseanalysen. Mobilfase

A: Isooktan/etylacetat (99,8:0,2), mobilfase B: Aceton/etylacetat (2:1) 0,15% eddiksyre og mobilfase C: Isopropanol/H₂O(85:15) (Graeve & Janssen, 2009).

Tid (min)	Mobilfase A	Mobilfase B	Mobilfase C	Flow (ml/min)	Kurve
0,0	100	0	0	1,5	1
1,5	100	0	0	1,5	6
1,6	97	3	0	1,5	6
6,0	94	6	0	1,5	6
8,0	50	50	0	1,5	6
8,1	46	39	15	1,5	6
14,0	43	30	27	1,5	6
14,1	43	30	27	1,5	6
18,0	40	0	60	1,5	6
23,0	40	0	60	1,5	6
24,0	0	100	0	1,5	6
25,0	0	100	0	2,0	6
27,0	0	100	0	2,0	6
27,1	100	0	0	2,0	6
36,0	100	0	0	2,0	6
36,1	100	0	0	1,5	6

