



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 30 stp
Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap

Effekt av fôrproteinnivå (17%, 18% og 19% protein) på IgY-utbytte fra eggeplomme

Effect of feedprotein-level (17%, 18% and 19%
protein) on IgY-yield from egg yolk

Lina Klara Matilda Tveit
Husdyrvitenskap

Sammendrag

Av konkurransehensyn til de involverte bedrifter er denne oppgaven lagt under 5 års klausulering, da produksjonsmetoden er forretningsmessig konfidensiell informasjon.

Målet for denne studien var å undersøke om proteinnivå i hønsefôr (17%, 18% og 19% protein) kan påvirke mengden generell og spesifikk immunoglobulin Y (IgY) i eggeplomme. IgY er en type antistoff som blir overført fra serum til eggeplomme under dannelse av eggeplomme i ovariet hos høns, for å gi avkommet passiv immunisering de første levedager. I human medisin brukes IgY til blant annet immunisering mot sykdommer og ved laboratoriske tester.

Et forsøk ble utført der 45 verpehøns av typen Lohmann LSL hvit ble brukt. Hønene var fra før av injisert med fire ulike immunprofylaks som er hemlige for de involverte bedrifter, som ble kalt for vaksine A, B, C og D eller ingen vaksinerings (PRIOR). De enkelte injiseringsgruppene (A, B, C, D og PRIOR), som hver bestod av 9 høner, ble fordelt på tre bur med tre høner per bur. Etter tre ukers tilvenningsperiode hvor alle høner fikk standardfôr, fikk de i åtte uker tildelt kraftfôr med 18% eller 19% råprotein, eller fortsette med standardfôr med 17% råprotein. I begge perioder ble de føret *ab libitum*. Uttak av prøver ved innsamling av egg ble utført ved forsøksstart, etter 2, 4, 6 og 8 uker. Spesifikk og generell IgY ble målt ved ELISA-analyse respektive spektrofotometri.

Forsøksresultatene viste at generell IgY-nivå i eggeplomme ikke var påvirket av fôrtype ($P=0,193$). Det ble heller ikke vist effekt av fôrtype på spesifikk IgY-nivå. Det var imidlertid signifikant forskjell i IgY-nivå i eggeplomme mellom injiseringsgruppene ($P=1,307 \times 10^{-5}$), uavhengig av fôrtype. Konklusjonen i dette forsøket var at ulike mengder protein i fôr (17% protein, 18% protein og 19%) ikke førte til endrede IgY-nivåer i eggeplomme. Det er trolig at standard proteininnhold (17% protein) i hønsefôr er adekvat for IgY-produksjon i eggeplomme. Et sikrere resultat kan kanskje oppnås ved visse forbedringer av metodikken.

Nøkkelord: Immunoglobulin Y, eggeplomme, verpehøns, fôrprotein, spektrofotometri, ELISA

Abstract

For reasons of competition for the companies involved, this task is subject to a 5-year embargo, as the production method is business confidential information.

The purpose of this study was to look at whether protein levels in chicken feed (17%, 18% and 19% protein) could affect the amount of general and specific immunoglobulin Y (IgY) in egg yolk. IgY is a type of antibody that is transferred from serum to egg yolk when forming of egg yolk in the chicken ovary, to give offspring passive immunity the first days after hatching. In human medicine, IgY is used for immunization and in laboratory tests.

A study was conducted where 45 laying hens of the type Lohmann LSL white were used. The hens were previously injected with four different immune prophylaxis that are secret to the involved companies, which were referred to as vaccines A, B, C and D or no vaccination (PRIOR). The individual injection groups (A, B, C, D and PRIOR), each consisting of 9 hens, were divided into three cages with three hens per cage. After three weeks of acclimation when all hens received standard feed, for eight weeks, they received 18% or 19% crude feed, or continued with standard feed with 17% crude protein. In both periods they were fed *ad libitum*. Sampling when collecting eggs was performed at trial start, after 2, 4, 6 and 8 weeks. Specific and general IgY was measured by ELISA analysis and spectrophotometry respectively.

The study results showed that overall IgY level in egg yolk was not influenced by feed type ($P = 0.193$). There was also no effect of feed type at specific IgY levels. However, there was a significant difference in IgY level in egg yolk between the injection groups ($P = 1,307e-05$), regardless of the type of feed. The conclusion in this study was that different amounts of protein in feed (17% protein, 18% protein and 19%) did not lead to altered IgY levels in egg yolk. It is likely that standard protein content (17% protein) in chicken feed is adequate for IgY production in egg yolk. A safer result may be achieved by certain improvements in methodology.

Key words: Immunoglobuline Y, egg yolk, laying hens, feedprotein, spectrophotometry, ELISA

Forkortelser

BSA	Bovint serumalbumin
CP	Crude Protein, råprotein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
IgY	Immunglobulin Y
PBS	Phosphatebuffered saline, fosfatbufret saltløsning
TMB	Tetramethylbenzidine

Forord

Masteroppgaven ble utført i samarbeid med Felleskjøpet Fôrutvikling AS, Norwegian Antibodies AS, Norichick AS samt Gentian AS.

I arbeidet med oppgaven lærte jeg utrolig mye, fra både praktisk arbeid og fra de involverte personene. Oppgaven ble til virkelighet på grunn av velvilligheten hos disse personene.

Derfor –

Takk til Gorm Sanson på Felleskjøpet Fôrutvikling, for at du kom opp med selve idéen til masteroppgaven og for oppfølging av prosjektet underveis. Dette ga meg sjansen til å være med på en for meg veldig spennende og interessant mulighet.

Takk til min hovedveileder, Anna Haug, for hjelp fra start til slutt. Jeg kunne alltid komme innom for faglig veiledning eller en oppmuntrende prat, og gå framåt med påfyll av kunnskap og fornyet optimisme. Det satte jeg enorm pris på.

En stor takk retter jeg også til min medveileder Lasse Evensen på Norichick AS, for tålmodig veiledning og praktisk gjennomførelse av labarbeidet i tillegg til faglig støtte. Takk også til de øvrige ansatte på Moer gård, for hjelp og for gemyttlig og hyggelig arbeidsstemning. En spesiell takk også til hovedansvarlig på hønsehuset, Tor Bernhard Eriksen. Hjelpen har vært uvurderlig.

Sist men absolutt ikke minst ønsker jeg å takke venner, familie og fremfor alt min ektemann, for utrettelig støtte.

Ås, mai 2017

Lina Klara Matilda Tveit

Innholdsfortegnelse

SAMMENDRAG

ABSTRACT

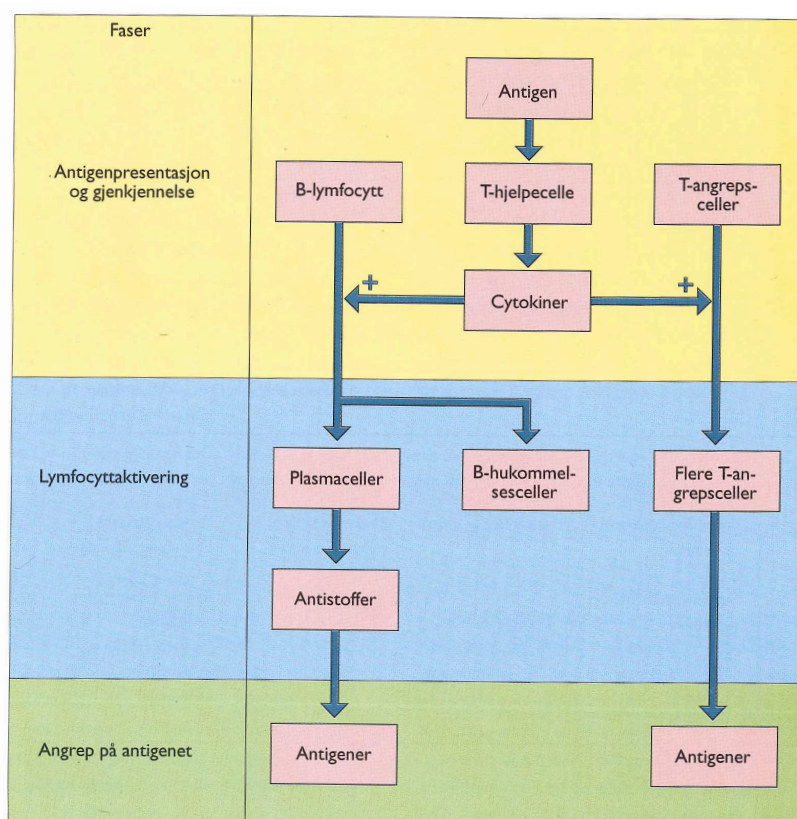
FORKORTELSER

FORORD

1.0 INNLEDNING.....	1
2.0 MATERIALER OG METODER.....	7
2.1 LITTERATUR.....	7
2.2 FORSØKSDESIGN.....	7
2.3 FUGLER OG VAKSINER.....	7
2.4 MILJØ OG OPPSETT.....	9
2.5 FØR.....	11
2.5.1 Registrering av fôropptak.....	12
2.6 KJEMISKE ANALYSER AV FØRET.....	12
2.7 INNSAMLING OG MERKING AV EGG.....	14
2.8 INNHENTING AV KVALITETSPARAMETERER EGG.....	15
2.9 IGY-ANALYSE.....	16
2.9.1 Forandring av prøvevolum ved dialyse.....	16
2.9.2 Spektrofotometer-analyse for måling av generell IgY-konsentrasjon.....	16
2.9.3 ELISA-analyse for måling av spesifikk IgY-konsentrasjon.....	17
2.10 STATISTISKE ANALYSER.....	19
3.0 RESULTAT	19
3.1 FUGLER.....	19
3.2 FØROPPTAK.....	20
3.3 EGGPRODUKSJON	21
3.4 IGY.....	25
3.4.1 Forandring av prøvevolum etter dialyse.....	25
3.4.2 Generell IgY-nivå i eggeplomme.....	26
3.4.3 Spesifikk IgY-nivå i eggeplomme.....	27
3.5 STATISTISKE ANALYSER	32
4.0 DISKUSJON.....	36
4.1 GENERELL IGY-NIVÅ I EGGEPLOMME.....	36
<i>Usikkerheter ved metoden.....</i>	<i>36</i>
4.2 SPESIFIKK IGY-NIVÅ I EGGEPLOMME.....	37
4.3 FØRSAMMENSETNING OG FØRFORBRUK.....	38
4.4 EGGPRODUKSJON	39
<i>Begrensinger.....</i>	<i>40</i>
5.0 KONKLUSJON	40
REFERANSER.....	41
VEDLEGG	

1.0 Innledning

Immunforsvaret har uspesifikke og spesifikke forsvarsmekanismer, hos både dyr og mennesker. Det uspesifikke immunforsvaret er celler som hjelper kroppen å beskytte seg mot at fremmede organismer trenger inn i kroppen, eller begrenser spredningen av de hvis de likevel finner en vei inn. Dette systemet trigges ikke til en kraftigere reaksjon ved gjentatte eksponeringer med de fremmede organismene og kalles derfor også for det nonadaptative systemet. Dette systemet er medfødt, men for at kroppen skal være beskyttet mot vanskeligere angrep trengs også det spesifikke immunforsvaret som utvikles etter fødselen. Figur 1 illustrerer hvordan en immunreaksjon forløper inne i kroppen.



Figur 1: Forløpet i immunreaksjonen med presentasjon av antigen, aktivering av lymfocytter og angrep. Kilde: Menneskets fysiologi (Haug et al. 1992).

Lymfocytter er immunceller som hører til det spesifikke immunforsvaret og har hukommelse som gjør at de produserer mer antistoffer, i en raskere reaksjon, ved gjentatt kontakt med mikroorganismer eller andre fremmede substanser (også kalt antigen). Det angripende

antigenet blir gjenkjent og bundet av en type lymfocytt. Hvilken type lymfocytt som reagerer på antigenet er avhengig av hvilken type antigen det er. Lymfocytten deler seg så og danner en subgruppe av like lymfocytter som kan binde til flere antigen og ødelegge antigenet. Bindingen til antigen og økt gjenkjennelse av antigenet (for både lymfocytter og for det uspesifikke immunforsvaret) skjer ved hjelp av antistoffer. Ved den første infeksjonen tar det ca en uke for immunforsvaret å komme i gang, men ved fornyet kontakt tar det kun et par dager. Triggingen gjør at kroppen får en adaptiv immunitet mot forskjellige sykdommer og virus (Haug et al. 1992).

Immunoglobulin Y (IgY) er en type antistoff som forekommer i fugler og reptiler. Denne utgjør ca 75% av serum-antistoffene hos høns og tilsvarer IgG hos pattedyr (Leslie & Martin 1973). Alle antistoffer er bygget opp av til sammen omtrent 1500 aminosyrer, i to lette og to tunge peptid-kjeder som mellom seg har fleksible disulfidbindinger. De tunge kjedene utgjører stammen (Haug et al. 1992). IgY lages av plasmaceller i beinmarg, i lever hos embryos og i eggeplommesekken. Plasmacellene i plommen er aktiverte B-lymfocytter. Ved gjentatte vaksinasjoner trigges hukommelseeffekten hos disse cellene og produksjonen av spesifikke IgY øker (Chalghoumi et al. 2008). Grunnen til at IgY lagres i eggeplommen er for å gi passiv immunitet til avkommet/kyllingen som utnytter plommen som næringskilde mens den fortsatt er inne i egget. På samme måte har man funnet at IgY kan brukes til et vidt spekter av områder hos både dyr og mennesker. De fremste bruksområder er immunisering mot spesifikke sykdommer og ved laboratoriske tester (Schade et al. 2005). Et eksempel er oral bruk mot forskjellige patogener i tarm (Xu et al. 2008). Fordelene ved å bruke IgY fra høns foran IgG fra andre dyr er blant annet at det er mer kostnadseffektivt og lettere praktisk utvunnet (fra egg) enn fra serum direkte fra dyr, samt at høns gir større mengder antistoff enn andre dyr (Diraviyam et al. 2014).

I Norge blir verpehøns vaksinert hos oppdretteren med en standard verpehønevaksine mot Mareks sjukdom. I tillegg er det noen få andre sykdommer det vaksineres mot, og det lave antallet vaksinasjoner er unikt for Norge. Dette kan gjøre hønene til mer effektive produsenter av spesifikke IgY enn verpehøns i mange andre land (Norwegian Antibodies AS, personlig kommunikasjon). På Moer gård i Kroer, hvor Norwegian Antibodies AS har lokaler og forsøket til denne oppgaven fant sted, holdes høner til konsumeggproduksjon og til antistoffproduksjon. Noen av de aktuelle antistoffene som blir produsert er antistoffer mot immunprofylaks som i denne oppgaven blir kalt A, B, C og D.. Vaksine A og B er parasitt-

vaksine C og D er så kalte humane rekombinante proteiner. Disse fire immunprofylaks blir heretter kalt vaksiner i denne oppgaven. Utdypende informasjon om hvordan de nevnte vaksinene virker er utenfor denne mastergradsoppgavens område.

I figur 2 er praksisen hvor man immuniserer hønen for å få ønsket IgY forklart visuelt, hvor ”step 3” og ”step 4” er de mest aktuelle i denne oppgaven. Et antigen blir injisert i hønen og den vil da produsere et spesifikt antistoff som svar på immunprofylaksen. Antistoffet kan i sin tur utvinnes ut av egget og brukes til foretrukket formål.

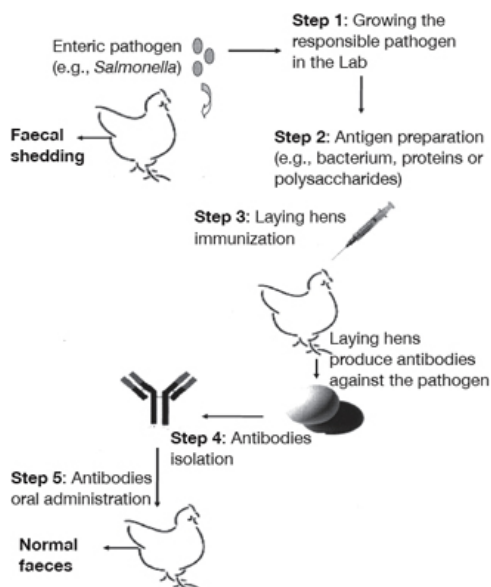


Figure 2. Summary of the egg yolk antibodies utilization for passive immunization in poultry — *Sommaire de l'utilisation des anticorps du jaune d'œuf en immunisation passive chez la volaille.*

Figur 2: Sammendrag av utnyttelse av eggeplomme-antistoffer til passiv immunisering av høner.

Figuren ble hentet 29. april 2017 fra <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=4136>.

Opprettholdelse av god helse hos fjørfe er avhengig av en kombinasjon av blant annet godt miljø, gener og riktig fôring (Furnes Bagley 2002). Det er kjent at innholdet i fôret i stor grad speiles i sammensetningen av næringsstoffer i kyllingkjøtt (Bou et al. 2005) og egg (Leskanich & Noble 1997). Energiinnholdet i fôr kan gi kvalitativ og kvantitativ effekt på blant annet eggproduksjon. I en studie fra 2011 så man at et lavere energinivå i fôr ga flere, men mindre egg (Li et al. 2011).

Nok aminosyrer er en annen viktig komponent i et balansert fôr. For eksempel så man ved et eldre forsøk med forskjellig lysininnhold i fôr, med ellers likt innhold, at vekten hos

kyllingene økte med større andel lysin i fôret (Figur 3) (McDonald et al. 2011a). I tillegg til grunnleggende behov for protein så trenger verpehøns aminosyrer til dannelsen av protein i eggeplomme og eggehvite. For eksempel inneholder et egg (57 g) i gjennomsnitt 6,7 g protein; inkludert alle aminosyrer (McDonald et al. 2011b). Det er særlig viktig at høna får nok av de essensielle aminosyrene metionin, glycin og fenylalanin, for å kunne danne semiessensielle aminosyrer (Furnes Bagley 2002). Metionin regnes som den første begrensende aminosyren. Vedlikeholdsbehov (for både energi og protein) for verpehøner inkluderer normalt også produksjonsbehov (McDonald et al. 2011a). Verpehøner trenger $0,55W^{0,75}$ MJ/dag til vedlikehold. For en høne som veier 2 kg tilsvarer dette 0,92455 MJ, eller 221 kcal. For å beregne proteinbehovet kan det tas det utgangspunkt i gram egg produsert/dag og effektivitet (0,83) i overført protein fra fôr til egg. Et eksempel med lysin (7,9 mg/g egg):

$$\text{Lysin mg/dag} = 9,5 \times \text{gram egg/dag} + 60 \times \text{kg hønevekt}$$

Det er imidlertid vanskelig å sette et *fast* nivå for behov for de forskjellige aminosyrene, da det er sterke og kompliserte interaksjoner mellom både total protein, essensielle aminosyrer, ikke-essensielle aminosyrer og andre næringsstoffer (McDonald et al. 2011a). Høner blir per i dag fôret etter appetitt, derfor er fôrsammensetningen ikke satt etter total mengde men etter proporsjoner mellom de ulike næringsstoffene eller i prosent etter mengde fôr de spiser per dag. National Research Council (National Research Council Committee on Animal Nutrition 1994) mener at høner som spiser 100 g eller 120 g fôr per dag trenger 15% respektive 12,5% protein i fôret (Tabell 1). De vil spise mer av et energifattig fôr og mindre av et energirikt fôr. Dette betyr at de vil kunne få proteinmangel av fôr med for høyt energiinnhold (McDonald et al. 2011b).

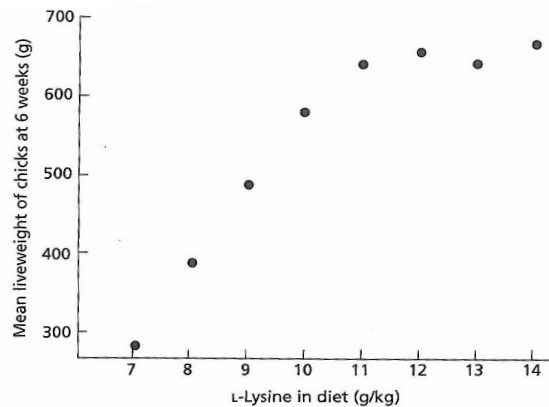


Fig. 14.4 Growth of chicks given diets containing different levels of lysine.

Plotted from the data of Edwards H M, Norris L C and Heuser G F 1956 *Poultry Science* 35: 385.

Figur 3. Effekt av lysininhold i fôr på levendevekt hos kyllinger. Kilde McDonald et al. 2011a.

Tabell 1. Næringsstoffbehov for verpehøns (type Leghorn). Kilde National Research Council Committee on Animal Nutrition 1994).

TABLE 2-3 Nutrient Requirements of Leghorn-Type Laying Hens as Percentages or Units per Kilogram of Diet (90 percent dry matter)

Nutrient	Unit	Dietary Concentrations Required by White-Egg Layers at Different Feed Intakes			Amounts Required per Hen Daily (mg or IU)		
		80 ^{a,b}	100 ^{a,b}	120 ^{a,b}	White-Egg Breeders at 100 g of Feed per Hen Daily ^b	White-Egg Layers at 100 g of Feed per Hen Daily	Brown-Egg Layers at 110 g of Feed per Hen Daily ^c
Protein and amino acids							
Crude protein ^d	%	18.8	15.0	12.5	15,000	15,000	16,500
Arginine ^e	%	0.88	0.70	0.58	700	700	770
Histidine	%	0.21	0.17	0.14	170	170	190
Isoleucine	%	0.81	0.65	0.54	650	650	715
Leucine	%	1.03	0.82	0.68	820	820	900
Lysine	%	0.86	0.69	0.58	690	690	760
Methionine	%	0.38	0.30	0.25	300	300	330
Methionine + cystine	%	0.73	0.58	0.48	580	580	645
Phenylalanine	%	0.59	0.47	0.39	470	470	520
Phenylalanine + tyrosine	%	1.04	0.83	0.69	830	830	910
Threonine	%	0.59	0.47	0.39	470	470	520
Tryptophan	%	0.20	0.16	0.13	160	160	175
Valine	%	0.88	0.70	0.58	700	700	770
Fat							
Linoleic acid	%	1.25	1.0	0.83	1,000	1,000	1,100
Macrominerals							
Calcium ^f	%	4.06	3.25	2.71	3,250	3,250	3,600
Chloride	%	0.16	0.13	0.11	130	130	145
Magnesium	mg	625	500	420	50	50	55
Nonphytate phosphorus ^g	%	0.31	0.25	0.21	250	250	275
Potassium	%	0.19	0.15	0.13	150	150	165
Sodium	%	0.19	0.15	0.13	150	150	165
Trace minerals							
Copper	mg	?	?	?	?	?	?
Iodine	mg	0.044	0.035	0.029	0.010	0.004	0.004
Iron	mg	56	45	38	6.0	4.5	5.0
Manganese	mg	25	20	17	2.0	2.0	2.2
Selenium	mg	0.08	0.06	0.05	0.006	0.006	0.006
Zinc	mg	44	35	29	4.5	3.5	3.9
Fat soluble vitamins							
A	IU	3,750	3,000	2,500	300	300	330
D ₃	IU	375	300	250	30	30	33
E	IU	6	5	4	1.0	0.5	0.55

^a Grams feed intake per hen daily.

^b Based on dietary ME_n concentrations of approximately 2,900 kcal/kg and an assumed rate of egg production of 90 percent (90 eggs per 100 hens daily).

^c Italicized values are based on those from white-egg layers but were increased 10 percent because of larger body weight and possibly more egg mass per day.

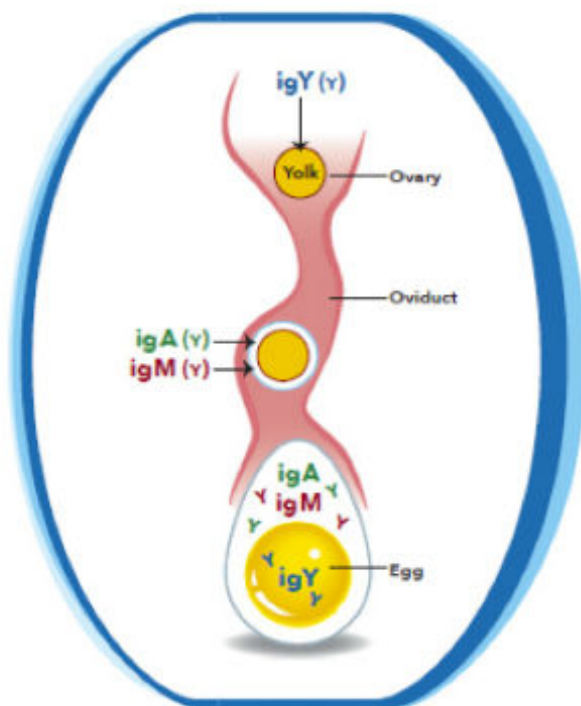
^d Laying hens do not have a requirement for crude protein per se. However, there should be sufficient crude protein to ensure an adequate supply of nonessential amino acids. Suggested requirements for crude protein are typical of those derived with corn-soybean meal diets, and levels can be reduced somewhat when synthetic amino acids are used.

^e Italicized amino acid values for white-egg-laying chickens were estimated by using Model B (Hurwitz and Bornstein, 1973), assuming a body weight of 1,800 g and 47 g of egg mass per day.

^f The requirement may be higher for maximum eggshell thickness.

^g The requirement may be higher in very hot temperatures.

Våre moderne verpehøns (*Gallus gallus domesticus*) legger egg med ca 24 timers mellomrom. På ett år blir det ca 350 egg per høne, til sammenligning med hønens stamfar *Gallus gallus* som legger ca 30 egg i året. Hele reproduksjonsorganet hos høna kalles for ovidukt og eggene produseres kun i den venstre eggstokken. Det tar til sammen mellom 9 til 11 dager for et egg å utvikles fra follikkel til å være klar for eggløsning. På den tiden går egget fra å være en enkel oocytt omgitt av granuloceller og thecaceller, til å få tilført vann, lipider, protein, vitaminer og mineraler, til dannelse av eggeplommen. Proteindannelsen skjer i lever under østrogenpåvirkning og blir transportert til eggstokken, hvor det blir avleiret i follikkelen (Sjaastad et al. 2010). Også IgY blir transportert over til eggeplommen, via blodet, ved dette stadiet (figur 4) (Rose & Orlans 1981). Det tar så ytterligere 25 timer for transport gjennom egglederen ut mot kloakken. Under denne transporten blir også eggehviten og skallet dannet (Sjaastad et al. 2010).



Figur 4. Oversikt over hvor IgY blir avleiret i plomme (eggstokk) og andre immunoglobuliner (IgA og IgM) blir overført i egglederen til eggehvitten. Figuren er hentet 29. april 2017 fra <http://www.ingredients-insight.com/contractors/other-ingredients/igy-nutrition/>

Ved litteratursøk ser det ut å være lite forskning på eventuell effekt av fôrproteininnhold på IgY-nivå hos verpehøns. Å øke proteininnholdet i fôret med noen prosent er en relativt liten kostnad og en økning av IgY i eggeplomme vil kunne redusere antall høner som er nødvendig

for å produsere egg til antistoffproduksjon. Oppstalling av høner er en stor utgift. Formålet med denne studien var derfor å undersøke om proteinnivået i fôr kan påvirke IgY-utbyttet fra eggeplomme. Ved å gi verpehøner tre kraftfôr med forskjellig nivå av råprotein, forholdsvis 17%, 18% og 19% råprotein men med ellers likt innhold og lik fordøyelighet, var hypotesen at det ville vises en oppgang av total IgY. Høner som ble injisert med A, B, C og D ble tatt med for å undersøke om proteininnholdet i fôr også kunne påvirke nivået av spesifikke IgY.

2.0 Materialer og metoder

2.1 Litteratur

Litteratur ble funnet på nettstedene Oria.no og scholar.google.no, ved bruk av søkeordene chicken antibodies, poultry, immunoglobulin Y, IgY, IgY-technology, egg yolk, protein, egg quality, feed composition, effect from fat/protein in feed composition on meat/eggs.

Lærebøkene Fjørfeboka, Animal Nutrition, Physiology of Domestic Animals, Menneskets fysiologi, How the Immune System Works samt Nutrient requirements of poultry ble også brukt.

2.2 Forsøksdesign

Forsøket ble satt opp som en longitudinell prospektiv observasjonsstudie over 8 uker. Metoden ble utarbeidet av Lina Klara Matilda Tveit (mastergradsstudent, NMBU) i samarbeid med Gorm Sanson (utviklingssjef fjørfefôr, Felleskjøpet Fôrutvikling AS), Lasse Evensen (prosjektleder, Norichick AS), Johan Biørnstad (CEO, Norwegian Antibodies AS) og Tor Bernhard Eriksen (fjørferøker, Moer gård AS), med innspill av Ole Egge (eier, Moer gård AS).

2.3 Fugler og vaksiner

I forsøket ble 45 verpehøns av typen Lohmann LSL hvit brukt. Hønenen kom fra Oraug kyllingoppdrett i Askim og ble levert til Moer gård ved 9-10 ukers alder. De var mellom 49 til

56 uker gamle ved forsøksstart. Hønene ble veid hengende i beina med én stikkprøve per bur ved forsøkets slutt.

Høner som ble vaksinert med A, B, C eller D ble tatt med for å undersøke om proteininnholdet i fôr kunne påvirke nivået av spesifikke IgY og generell IgY. De ble vaksinert av veterinær hver 4.e uke (Tabell 2) for å opprettholde et adekvat antistoff-nivå i egg. Høner som ikke inngikk i disse vaksineringsprogram ble i dette forsøket kalt PRIOR, grunnet at eggene til vanlig ble levert til Nortura SA og solgt under merkenavnet Prior. Da PRIOR-hønene ikke er vaksinert produserer de ikke spesifikke IgY. Disse hønene ble inkludert i forsøket for å ha en null-kontroll for spesifikke IgY.

Tabell 2. Vaksine og respektive vaksinasjonsdatoer i tiden rundt forsøket.

Vaksine	Injeksjonsdatoer				
A	25/11	21/12	18/1	15/2	16/3
B	24/11	21/12	18/1	15/2	16/3
C	29/11	22/12	19/1	17/2	16/3
D	Uke 47	21/12	18/1	15/2	22/3



Bilde: Fjørferøker Tor Bernhard Erikssen veier en D-høne. Denne hønen hadde fått en diett med 18% råprotein og veide 1,94 kg ved forsøkets slutt. Foto: Lina Tveit.

2.4 Miljø og oppsett

Rommet som ble brukt var tømt for andre høner og hadde plass for innsett med maksimalt 440 høner, i et to-etasjesystem med T10-bur. T10-bur har redet plassert i burets bakkant, og eggene ruller derfor først gjennom buret og så ned i eggrennen.

I dette forsøket ble kun den nedre etasjen brukt, for å ha bedre oppsikt over fôringen. Fôring ble av praktiske årsaker gjort manuelt. Vannsystemet ble sjekket daglig, og en dagbok med instruksjoner var tilgjengelig. Der kunne det noteres ned diverse merknader og avvik. Hønene fulgte en lysdag fra 04.00 til 17.00. Temperaturen i rommet var 19,7-20,3 grader Celsius og ble regulert med termostat, varmevifte og ventilasjonssystem i taket.

Fra fem bur som hadde PRIOR-høner eller høner injisert med A, B, C eller D ble 9 høner tilfeldig valgt ut fra hvert bur. De ble heretter omtalt etter hvilken vaksine de hadde fått og kontrollgruppen (ikke vaksinerte høner) ble omtalt som PRIOR. De ble så satt i forsøksrommet i nye bur med tre høner av samme type i hvert bur (Tabell 3), i til sammen 15 bur. Burene ble merket (Tabell 4) med fargekode, vaksintype, burnummer og proteininnhold i fôr (17, 18 eller 19%).

Tabell 3. Forsøksoppsett med antall høner per bur samt injiseringsgruppe og planlagt fôrtype.

Injiseringsgruppe	Fôr med 17% protein	Fôr med 18% protein	Fôr med 19% protein
A	3	3	3
B	3	3	3
C	3	3	3
D	3	3	3
PRIOR	3	3	3

Tabell 4. Oversikt over bur i forsøksrommet. Merking av bur, med fargekodet vaksinetype, bur I-III (i tilvenningsperioden) og fargekodet fôrtype (Fôr 17%, Fôr 18% eller Fôr 19%) (i forsøksperioden).

Venstre og høyre side sett fra inngang. De tomme feltene var tomme bur.

PRIOR II Fôr 18%	
D II Fôr 18%	
C II Fôr 18%	
B II Fôr 18%	
A II Fôr 18%	
PRIOR I Fôr 17%	PRIOR III Fôr 19%
D I Fôr 17%	D III Fôr 19%
C I Fôr 17%	C III Fôr 19%
B I Fôr 17%	B III Fôr 19%
A I Fôr 17%	A III Fôr 19%

Venstre side

Høyre side

En forsøksplan over tilvenningsperiode og forsøksperiode ble fulgt, med blant annet uttak av prøver og veiing av egg. Fullstendig forsøksplan er vist i Tabell 5.

Tabell 5. Samlet forsøksplan over tilvenningsperiode og forsøksperiode.

Dato	Aktivitet	Type
17/12 2016	Flytting av høner, fôring med kun Fôr 17%	Start tilvenningsperiode
23-24/12 2016	Egg tas ut til veiing	Egg- og plummevekt
3-4/1 2017	Egg tas ut til veiing	Egg- og plummevekt
8-10/1 2017	Egg tas ut til IgY-måling	Prøveuttak 0
10/1 2017	Ny fôringsregime med Fôr 18% og Fôr 19%	Start forsøksperiode
17-18/1 2017	Egg tas ut til veiing	Egg- og plummevekt
24-26/1 2017	Egg tas ut til IgY-måling	Prøveuttak 1
31/1-1/2 2017	Egg tas ut til veiing	Egg- og plummevekt
7-9/2 2017	Egg tas ut til IgY-måling	Prøveuttak 2
14-15/2 2017	Egg tas ut til veiing	Egg- og plummevekt
21-23/2 2017	Egg tas ut til IgY-måling	Prøveuttak 3
3-4/3 2017	Egg tas ut til veiing	Egg- og plummevekt
7-9/3 2017	Egg tas ut til IgY-måling	Prøveuttak 4
9/3 2017	Veiing av høner og fôrrester	Slutt forsøksperiode

2.5 Fôr

Kraftfôr ble produsert og levert av Felleskjøpet AS på Kambo. I både tilvenningsperioden og forsøksperioden fikk hønene vann og kraftfôr *ab libitum*. I tilvenningsperioden (3 uker) fikk alle høner en kraftfôrtype som kommersielt kalles ”Verp 2S”. Dette kraftfôret hadde de fått tildelt fra 15. desember 2016. I dette forsøket ble Verp 2S kalt for Fôr 17%.

Etter tilvenningsperioden ble hønene delt inn i tre grupper med fem bur i hver fôrgruppe (Tabell 3 og 4). En gruppe fikk fortsette med Fôr 17% og to grupper fikk tildelt kraftfôr med 18% (Fôr 18%) respektive 19% (Fôr 19%) råprotein, i 8 uker. Tre 10-liters plastbøtter ble merket med fôrtype og plassert ved respektive fôrgruppe, med en øse per bøtte.



Bilde til venstre: Forsøkshønene venter tålmodig på å bli fôret. Fôringsskjeden ble tatt ut fra fôrrennen direkte etter flytting, da fôringen skulle skje manuelt. Uten fôringsskjeden ble det lettere for hønene å få tak i fôret. **Bilde til høyre:** Plastbøtte med øse og Fôr 19%. Foto: Lina Tveit.

2.5.1 Registrering av fôropptak

Fôropptaket ble i tilvenningsperioden estimert av røkter å være ca 1725 g per fem bur. En strøken øse med fôr inneholdt ca 1725 g fôr og øse-målet ble brukt til å måle fôropptaket i forsøksperioden. Daglig fôrtildeling til hvert bur ble registrert i forsøksperioden på eget skjema (vedlegg 1). Restene ble veid ved forsøkets slutt for å beregne det totale fôropptaket for hvert bur.

Vannopptaket ble målt automatisk for hele forsøksrommet, men grunnet tekniske begrensninger var det ikke mulig å dele opp målingene for hvert bur eller hver fôrgruppe.

2.6 Kjemiske analyser av fôret

I Tabell 5 vises energi- og næringsinnholdet i de tre fôrtypene. Kraftfôret ble analysert av Eurofins, Moss. Energiinnholdet ble beregnet i kcal per 100 g ved å ta utgangspunkt i 9 kcal/g for fett, 4 kcal/g for protein, 4 kcal/g for karbohydrat og 2 kcal/g for kostfiber. For originale analyser og analysemetoder, se Vedlegg 4. I Tabell 6 er samlede analyser for fettinnhold presentert.



Bilde: Stikkprøver av de tre fôrtypene som ble brukt i forsøket. Fra venstre: Fôr 17%, Fôr 18% og Fôr 19%. Foto: Lina Tveit.

Tabell 5. Nærings- og aminosyreinnhold i de tre fôrtypene i g eller mg per 100 g fôr. Analyser utført av Eurofins, Moss.

	Fôr 17%	Fôr 18%	Fôr 19%
Energi, kcal/100 g*	336	347	339
Vanninnhold, g/100 g	10.9	8.70	9.07
Fett, g/100 g	7.03	7.36	7.19
Råfiber, g	4.7 g	5.9	5.8
Aske, g	12.3	11.4	12.9
Protein, g	16.5	17.8	18.7
Asparaginsyre, g	1.32	1.47	1.58
Serin, g	0.760	0.880	0.917
Glutaminsyre, g	3.18	3.68	3.93
Prolin, g	1.04	1.23	1.32
Glysin, g	0.647	0.740	0.774
Alanin, g	0.804	0.838	0.958
Valin, g	0.716	0.796	0.843
Isoleucin, g	0.601	0.679	0.712
Leucin, g	1.41	1.50	1.69
Tyrosin, g	0.557	0.622	0.677
Fenylalanin, g	0.796	0.877	0.958
Histidin, g	0.380	0.418	0.443
Lysin, g	0.846	0.886	0.892
Arginin, g	0.900	0.992	1.05
Tryptofan, g	0.184	0.215	0.215
Cystein + cystin, g	0.305	0.325	0.341
Metionin, g	0.424	0.427	0.421
Treonin, g	0.622	0.684	0.699
Svovel, mg	240	270	260
Fosfor, mg	450	440	436
Jern, mg	23,3	18,6	21,2
Kalium, mg	581	594	607
Kalsium, mg	4550	3350	4110
Kobber, mg	1,89	1,62	1,85
Magnesium, mg	160	155	158
Mangan, mg	14,9	11,4	11,8
Natrium, mg	180	142	154
Sink, mg	10,4	9,36	9,28

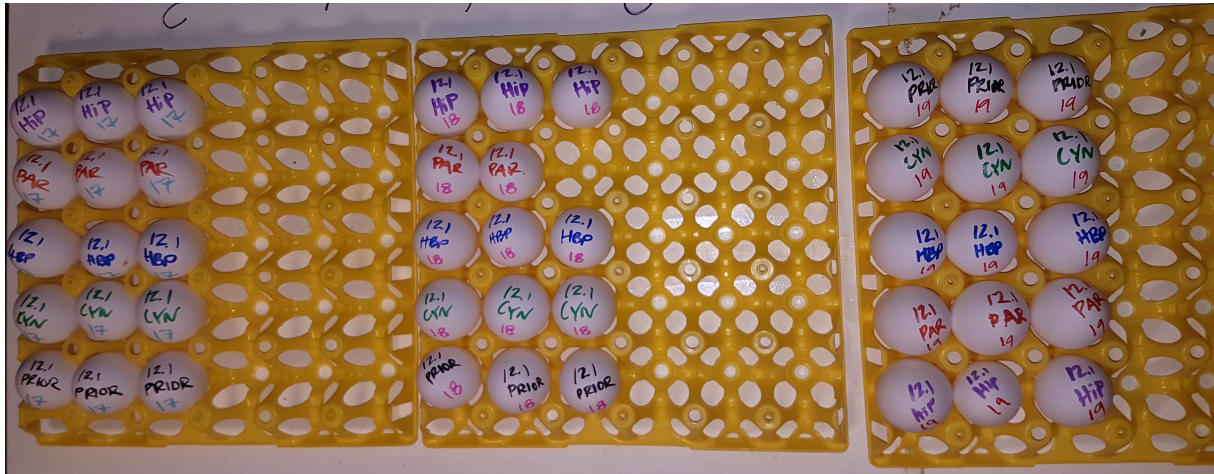
*Energi i kcal/100 g er beregnet med utgangspunkt i 9 kcal/g for fett, 4 kcal/g for protein, 4 kcal/g for karbohydrat og 2 kcal/g for kostfiber i fôr.

Tabell 6. Fettinnhold i g per 100 g fôr og fettsyrer i prosent av totalfett i de tre fôrtypene. Analyser utført av Eurofins, Moss.

	Fôr 17%	Fôr 18%	Fôr 19%
Fett, g/100 g	7,03	7,36	7,19
Sum av mettede fettsyrer, %	26,0	29,8	28,0
Enumettede fettsyrer totalt, %	36,8	37,0	37,3
Flerumettede fettsyrer totalt, %	35,1	31,2	32,8
Totale fettsyrer, %	98,0	98,0	98,1
Uidentifiserte komponenter, %	2,0	2,0	1,9
Summen av Omega-6 fettsyrer (kalkulert), %	31,4	28,1	29,5
Summen av Omega-3 fettsyrer (kalkulert), %	3,7	3,1	3,2
Fatty Acids, Omega6/Omega3 Ratio	8,56	9,09	9,10
C14:0 Myristinsyre (Tetradekansyre), %	0,5	0,9	0,7
C 15:0 (Pentadecanic acid), %	0,1	0,2	0,1
C16:0 Palmitinsyre, %	14,2	18,9	16,8
C 16:1 n-7 (Palmitoleinsyre), %	0,8	1,2	1,0
C17:0 Margarinsyre, %	0,4	0,4	0,4
C18:0 Stearinsyre (Oktadekansyre), %	10,3	9,0	9,4
C 18:1 n-9 (Oljesyre), %	35,4	35,1	35,6
C18:2n-6 (Linolsyre), %	31,2	27,7	29,1
C 18:3n-3 (α-Linolensyre), %	3,4	2,8	2,9
C 20:0 (Arakinsyre), %	0,3	0,2	0,2
C 20:1 n-9 (Gadoleinsyre), %	0,6	0,6	0,6
C 20:2n-6 (Eikosadiensyre), %	0,1	0,2	0,2
C 22:0 (Behensyre), %	0,2	0,1	0,2

2.7 Innsamling og merking av egg

Egg ble samlet inn daglig. Antall plukkede egg, antall kastede egg (inklusive årsak) og helsekontroll av hønene ble registrert på ”Kontrollskjema for egginnsamling” (Vedlegg 2). Eggene ble merket med farget tusj ved plukking med plukkedato, injiseringsgruppe og fôrtype og så oppbevart på kjølelager i 8-12 grader Celsius. Nedenfor vises to bilder; et på egg fra en dags egginnsamling (før sortering på kjølelager) og et bilde fra kjølelageret.



Bilde: Eksempel på egginnsamling. Dette er egg innsamlede 12. januar 2017, merket med riktig fargekode, dato, injiseringsgruppe og fôrproteinprosent. Foto: Lina Tveit



Bilde: Lagring av egg på kjølelageret. I forkant sees en stabel med egg fra de første dagene etter flytting av hønene, som ikke var merket med bur eller fôrprosent og som derfor ikke ble tatt med i forsøket. Foto: Lina Tveit.

2.8 Innhentning av kvalitetsparametere egg

For å kontrollere forandringer i egg- og plommevekt, ble egg tatt ut fra to sammenhengende dager, hver 14. dag gjennom hele forsøket. Hele egg ble veid og deretter knekket for å veie eggeplommen. Dette ble registrert for hver av gruppene. Total eggvekt for tilvenningsperiode og forsøksperiode ble også registrert, ved å veie alle egg fra alle grupper ved forsøkets slutt.

Andre parametere, som skallkvalitet og verpeprosent, ble beregnet ved å bruke registrerte data fra egginnsamling.

2.9 IgY-analyse

For å måle forandringer i IgY-nivå i eggeplomme ble det tatt ut egg fra fem perioder på tre sammenhengende dager, i til sammen fem prøvedatoer kalt Prøveuttak 0-4 (Tabell 5). Ved hvert prøveuttak ble alle egg fra de tre sammenhengende dager brukt, gjennomsnittlig 8 egg per bur. De første prøvene ble tatt ut fra de tre siste dagene i tilvenningsperioden (prøveuttak 0) og deretter ble det tatt ut egg hver 14. dag fram til forsøksslutt (prøveuttak 1-4).

Protokollen (vedlegg 3A) for laboratoriemetoden var en nedskalert versjon av metoden som brukes til daglig av Norwegian Antibodies AS og Norichick AS. Metoden beskriver IP-belagt metode som eies av Norwegian Antibodies AS og kan derfor ikke offentliggjøres og beskrives i denne masteroppgaven.

De ferdige prøvene ble lagret på kjølelager ved ca 4 grader Celsius for å brukes til måling i spektrofotometer og i Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA).

2.9.1 Forandring av prøvevolum ved dialyse

For å kontrollere forandringer i volum ble alle prøver i Prøveuttaksdato 4 veid før og etter dialyse; i trinn 22 og trinn 27 (vedlegg 3A. Vedlegg 3A beskriver IP-belagt metode som eies av Norwegian Antibodies AS og kan derfor ikke offentliggjøres og er ikke lagt ved denne versjonen av masteroppgaven).

2.9.2 Spektrofotometer-analyse for måling av generell IgY-konsentrasjon

For å bestemme generell IgY-konsentrasjon i eggeplomme ble prøvene, som stammet fra egg høstet ved ulike tidspunkt gjennom hele forsøksperioden, målt spektrofotometrisk. Etter hvert ble det også gjort en kontrollmåling med stikkprøver fra de forskjellige målepunktene, for å kontrollere eventuell varians mellom målingsdatoene for samme prøve.

Før spektrofotometrisk avlesing ble prøvene fortynnet ved at det ble tilført 25 µl prøve til 975 µl fosfatbufret saltløsning (PBS) med Azid en kyvette. I spektrofotometeret ble blandingen målt opp mot en annen kyvette med 1000 µl PBS med Azid. Absorpsjons-resultatet ble ganget med 40 grunnet fortynningen. Summen ble delt på 1,32 som er en konstant som brukes for å

regne ut konsentrasjon til antistoff i løsning (opplysning gitt av Lasse Evensen, Norichick AS), for å få mg IgY/ml plumme. Se protokoll for spektrofotometer-måling (vedlegg 3B) for detaljert fremgangsmåte.

Resultatene fra spektrofotometermålingene ble i etterkant korrigert for mengde eggeplomme som ble tilsatt i første del av prøveuttakene. Det ble samtidig tatt med i beregningene at 53% av den tilsatte eggeplommen, gjennom alle trinn, endte opp i den endelige prøven.

2.9.3 ELISA-analyse for måling av spesifikk IgY-konsentrasjon

Konsentrasjonen målt spektrofotometrisk ga grunnlag for å fortynne alle antistoff til identisk konsentrasjon for sammenlignbare ELISA-analyser. Da prøvene hadde blitt fortynnet med PBS blandet med en såpeløsning (Tween) kunne det utføres ELISA-målinger ved å utføre en rekke trinn med gjentatte innkuberinger og vaskinger av ELISA-plater (vedlegg 3C). Kort beskrevet startet prosedyren ved ”coating” av en ELISA-plate med riktig vaksine eller antigen, for å danne et første ”lag” i bunnen av de 96 brønnene i platen. Det måtte brukes kun en type vaksine per plate grunnet risiko for kontaminering. Konsentrasjonen som skulle brukes ble beregnet ved å bruke fortynningsregelen $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

For å være sikker på å dekke hele bunnen av hver brønn, ble brønnene blokkert med bovint serumalbumin (BSA). De fortynnete IgY-prøvene tilsattes i et bestemt oppsett som ble gjentatt for alle prøver (**Tabell 7**). Disse ble tilsatt i lik mengde (150 µl) i rad A og E, men ble igjen fortynnet med en tredjedel for hver rad ned over platen ved multi-channel-pipettering.

Etter at platen hadde blitt inkubert med IgY-prøvene, var det blitt dannet forankringspunkter for tilsetting av sekundærantistoffet Goat Anti-Chicken IgY H&L. Ved å til sist tilsette en ferdig løsning med Tetramethylbenzidine (TMB) ble så platen avlest flere ganger i en ELISA-maskin i et intervall á ca 2-5 minutter mellom hver avlesing. TMB reagerer på pepperrotsperoksydase(HRP)-aktivitet ved å felle ut blå farge, hvor fargeintensiteten på platene er avhengig av mengde antistoff. ELISA-maskinen regner om absorptansen til relative verdier som gjør resultatet mulig å bruke i for eksempel Excel.

I et forsøk å trekke fra bakgrunnen (støy) fra resultatet ble det i fire av målingene (alle stoffer 27. mars) ikke tilsatt prøve i rad D og H. Dette ble imidlertid ikke tatt med i beregningene av resultatet, da det ikke var gjort i de andre målingene og derfor ville ha gitt forskjellige forutsetninger.

Det ble brukt en annen fortynningsrekke i målingene for injiseringsgruppe C og D den 27. mars, hvor fortynningsrad A og E tilsvarte konsentrasjonen i rad B respektive F i tidligere målinger. Det vil si at i rad A og E var det 50 µg/ml og således 17 µg/ml i rad B og F. Dette ble gjort da det viste seg at 100 µg var for høy konsentrasjon for å enkelt kunne måle forskjellene i fortynningsrekkene.

Tabell 7. Oppsett for tilsetning av IgY-prøver i ELISA-platene. Kolonne 1-6 var prøver fra injiseringsgruppe A, B, C eller D. Kolonne 7-12 var prøver fra PRIOR-høner. 0. = Prøveuttaksdato 0. 3/4. = Prøveuttaksdato 3 eller 4. 17%, 18% og 19% = Fôr 17%, Fôr 18% respektive Fôr 19%.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%
B	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%
C	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%
D	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%	0. 17%	0. 17%	0. 18%	0. 18%	0. 19%	0. 19%
E	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%
F	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%
G	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%
H	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%	3/4. 17%	3/4. 17%	3/4. 18%	3/4. 18%	3/4. 19%	3/4. 19%

2.9.3.1 Valg av representative målinger og plater

Grunnet begrensede muligheter til laboratoriearbeid i forhold til tidsbruk ble ikke prøveuttaksdato 1 og prøveuttaksdato 2 målt med ELISA. Det ble tatt utgangspunkt i at

prøveuttaksdato 0, prøveuttaksdato 3 og prøveuttaksdato 4 skulle gi representative resultat da formålet med oppgaven var å undersøke utviklingen i IgY-nivå over tid. Disse prøvene var tatt respektive like før forsøksstart, etter 6 uker og etter 8 uker.

Av til sammen 19 målinger med ELISA-plater ble 8 plater valgt ut for å vise resultatet; én plate per injiseringsgruppe (A, B, C og D) i måling med prøveuttaksdato 0 mot prøveuttaksdato 3 og én plate per injiseringsgruppe (A, B, C og D) i måling med prøveuttaksdato 0 mot prøveuttaksdato 4. PRIOR var med på hver av platene, for kontroll. Avlesningen ble valgt der verdiene var stabile og mettningsgraden for minst én brønn var nærme 1,0. Plater med minst ”støy”, det vil si lavest verdi i brønner der verdien skulle være så nærme 0 som mulig og uten metodefeil ble ansett for å gi sikrest resultat. For å være sikker på å være inne i det lineære området ble til sist to paralleller i rad B og i rad F valgt, på anbefaling fra Lasse Evensen. Denne konsentrasjonen sikret et godt signal og var lav nok til å redusere uspesifikt signal, basert på erfaring fra hans tidligere eksperimenter.

2.10 Statistiske analyser

For å måle statistiske forskjeller i spektrofotometri-målinger av IgY-konsentrasjon ble R Commander og XQuartz brukt, ved en lineær ANOVA-modell.

På grunn av at ELISA-målingene i dette forsøket ble gjort kvalitativt og ikke kvantitativt, var det ikke mulig å gjøre statistiske analyser av ELISA-resultatene i et avansert statistikkprogram. Det ble beregnet gjennomsnitt og standardavvik i Excel for hver av de valgte 8 platene.

3.0 Resultat

3.1 Fugler

Hønene ble inspisert daglig ved egginnsamling og helsestatus ble registrert på ”Kontrollskjema for egginnsamling”. Gjennom hele forsøket var det ingen som viste tegn til sykdom eller dårlig helse.

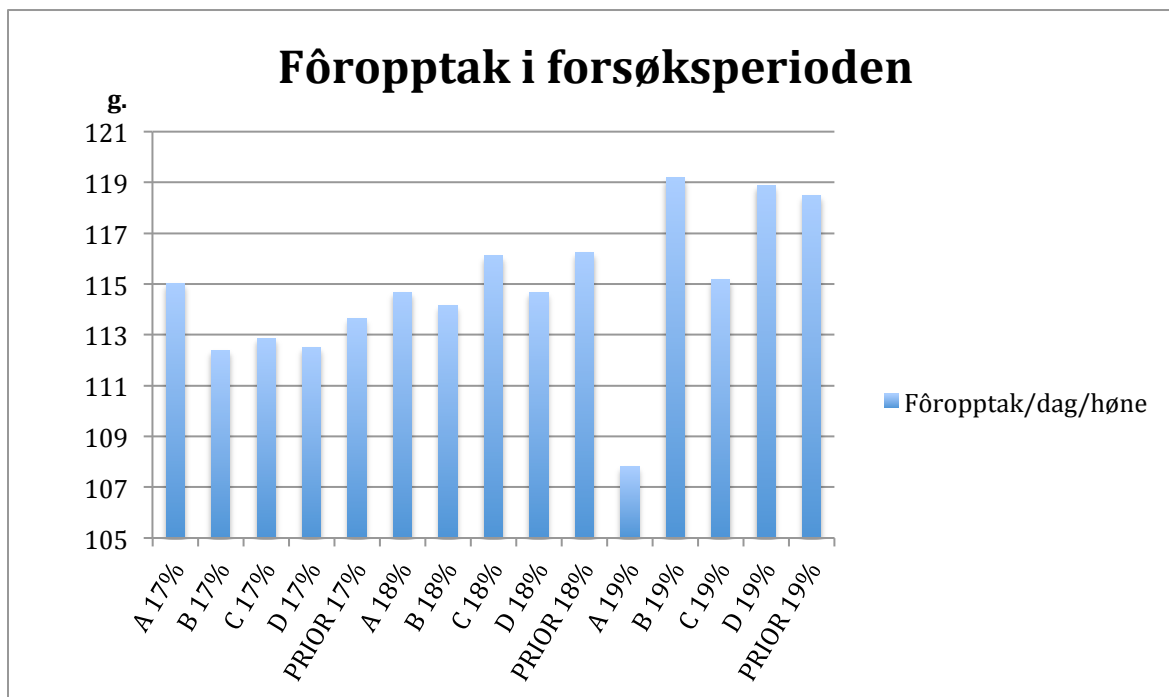
Ved forsøkets slutt ble én høne fra hvert bur veid og vekten ble brukt til å beregne gjennomsnitt for de tre fôrgruppene (Tabell 8). Gjennomsnittsvekten varierte lite mellom fôrgruppene; høner som fikk Fôr 17% veide i gjennomsnitt 1,99 kg (SD \pm 0,23 kg), Fôr 18% 1,97 kg (SD \pm 0,14 kg) og Fôr 19% 1,99 kg (SD \pm 0,18 kg). I samme tabell er også alderen ved forsøksperiodens slutt vist. Gjennomsnittsalderen var lik hos alle fôrgruppene, med 61,2 uker (SD 3,8 uker).

Tabell 8. Gjennomsnittlig vekt (kg) for de høner i de tre fôrtypegruppene (Fôr 17%, Fôr 18% og Fôr 19%) ved forsøkets slutt, og tilsvarende hønens alder (uker) ved samme tidspunkt.

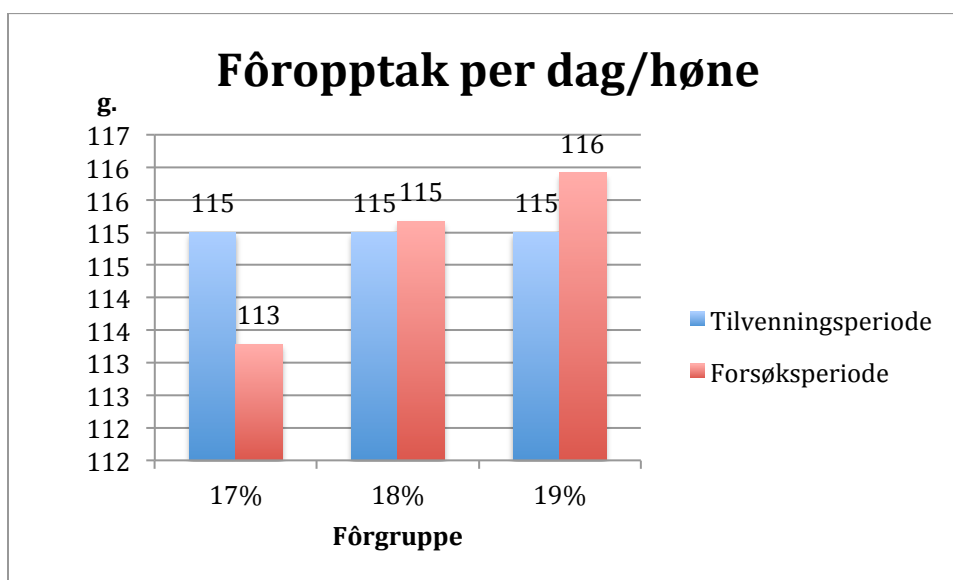
	Gjennom- snittsvekt, kg.	Standardavvik, kg.	Gjennomsnittsalder ved forsøksslutt, uker	Standardavvik, uker
Fôr 17%	1,99	0,23	61,2	3,8
Fôr 18%	1,97	0,14	61,2	3,8
Fôr 19%	1,99	0,18	61,2	3,8

3.2 Fôropptak

Høner som fikk Fôr 17% i forsøksperioden var å anses som kontroller. Høner som fikk Fôr 18% og Fôr 19% kunne derfor sammenlignes mot disse. I følge registreringene så trenden som er vist i Figur 5 ut til å være at gruppene som spiste Fôr 19% spiste mest, med unntak av HIP 19% som hadde det laveste fôrforbruket av alle de 15 gruppene. Når injeksjonsgruppene ble slått sammen i sine respektive fôrgrupper (Figur 6) så trenden litt svakere ut, med Fôr 17% med ett gjennomsnittlig fôrinntak på 113 g kraftfôr per dag/høne, Fôr 18% med ett gjennomsnittlig fôrinntak på 115 g kraftfôr per dag/høne og Fôr 19% med ett gjennomsnittlig fôrinntak på 116 g kraftfôr per dag/høne. Standardavvik ble ikke beregnet for fôropptaket grunnet at rester ikke ble veid daglig men kun ved forsøkets slutt.



Figur 5. Gjennomsnittlig fôropptak (g) for hver av injiseringsgruppene i forsøksperioden.

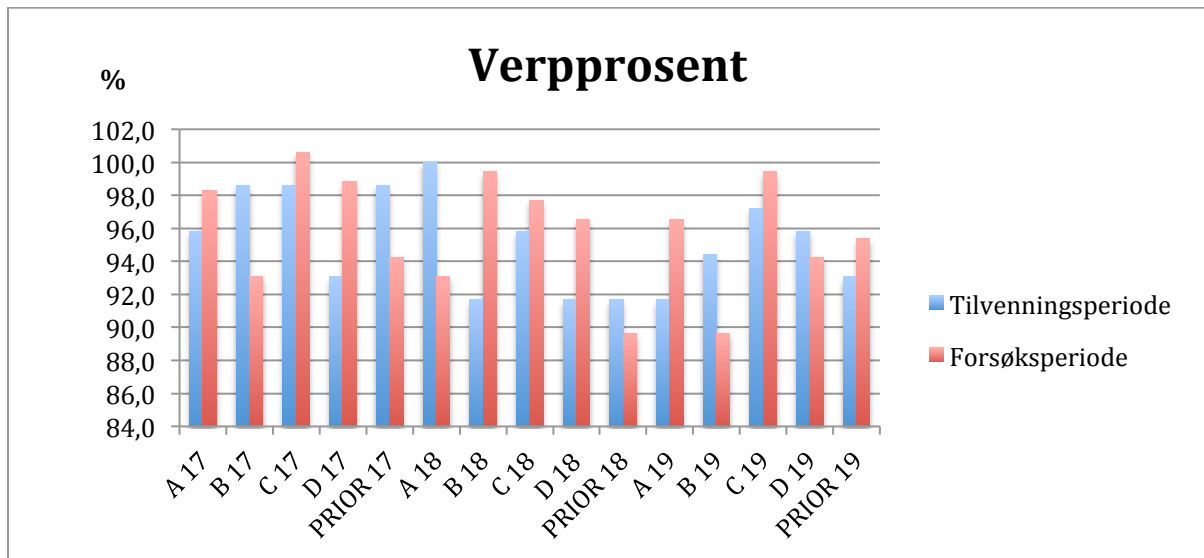


Figur 6. Gjennomsnittlig fôropptak per dag/høne (g) samlet for fôrgruppene i respektive tilvennings- og forsøksperiode.

3.3 Eggproduksjon

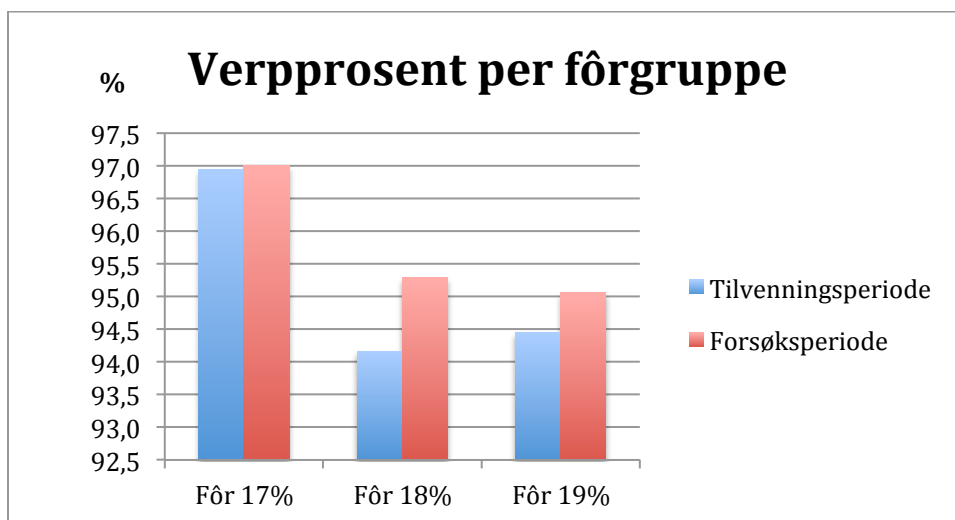
Verpeprosenten hos de forskjellige gruppene varierte mellom tilvenningsperioden og forsøksperioden, men det var ingen klar trend for opp-/nedgang (Figur 7). Muligens tenderte grupper med høyest verpeprosent i tilvenningsperioden å ha lavest verpeprosent i

forsøksperioden, og motsatt. Gruppene som verpet best i tilvenningsperioden gjorde det middels dårlig i forsøksperioden.



Figur 7. Verpeprosent i tilvennings- og forsøksperioden.

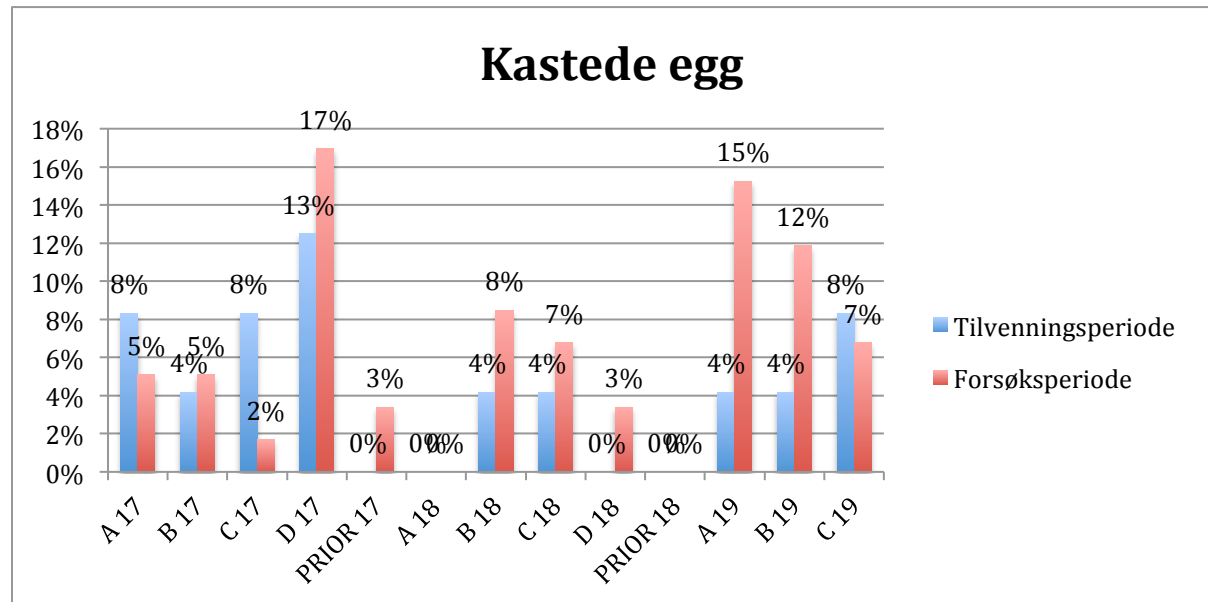
Når en ser på gjennomsnittlig verpprosent per fôrgruppe (Figur 8) ser man at Fôr 17% hadde nesten lik verpeprosent i tilvennings- og forsøksperioden (96,9% respektive 97,0%) og den høyeste verpeprosenten av alle fôrgruppene i begge perioder. Fôr 18% hadde den laveste verpeprosenten i tilvenningsperioden med 94,2%, men den økte i forsøksperioden til 95,3%. Fôr 19% hadde en verpeprosent på 94,4% i tilvenningsperioden men økte noe, likt Fôr 18%, til 95,1% i forsøksperioden.



Figur 8. Verpeprosent per fôrgruppe (Fôr 17%, Fôr 18% og Fôr 19%) i tilvennings- og forsøksperioden.

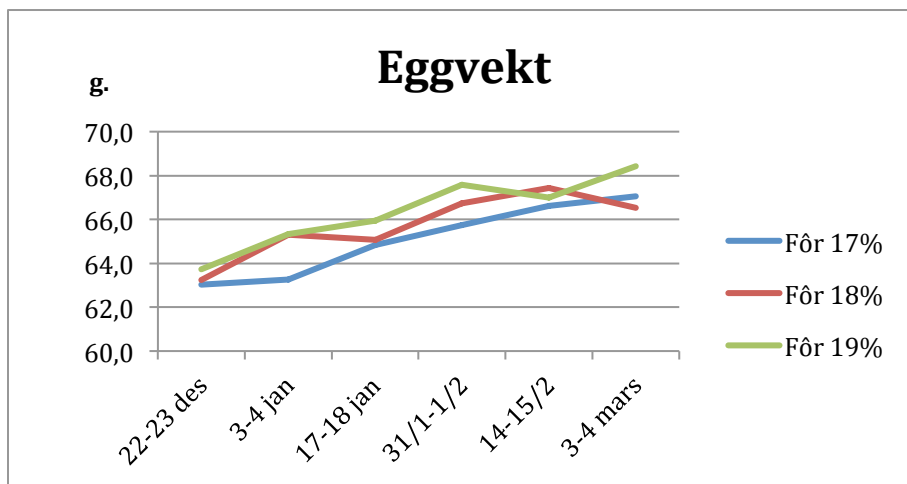
Prosentandelen kastede egg viste ikke en spesifikk trend for gruppene (Figur 9).

Injiseringsgruppe B 19%, A 19% og D 17% skilte seg imidlertid ut med flest antall kastede egg i forsøksperioden med respektive 12%, 15% og 17% kastede egg. Injiseringsgruppe A 18% og PRIOR 18% hadde færrest kastede egg i forsøksperioden, begge 0%.

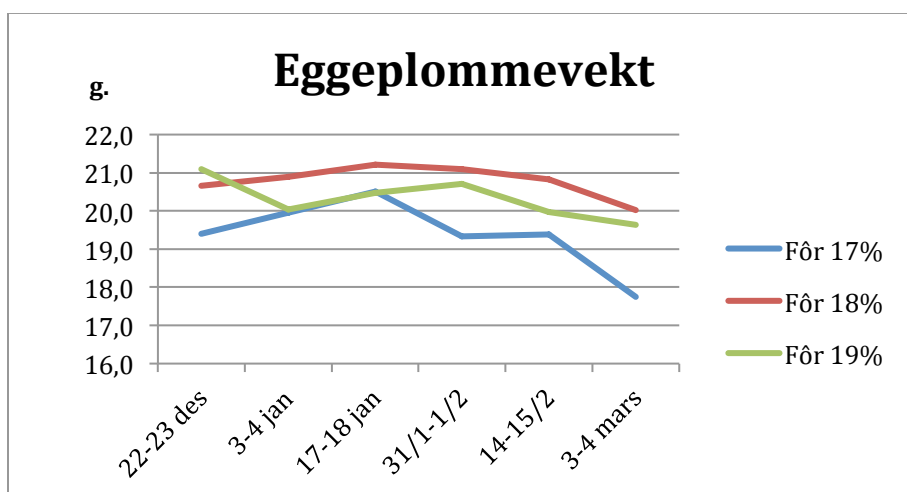


Figur 9. Prosent kastede egg i tilvennings- og forsøksperioden for alle gruppene.

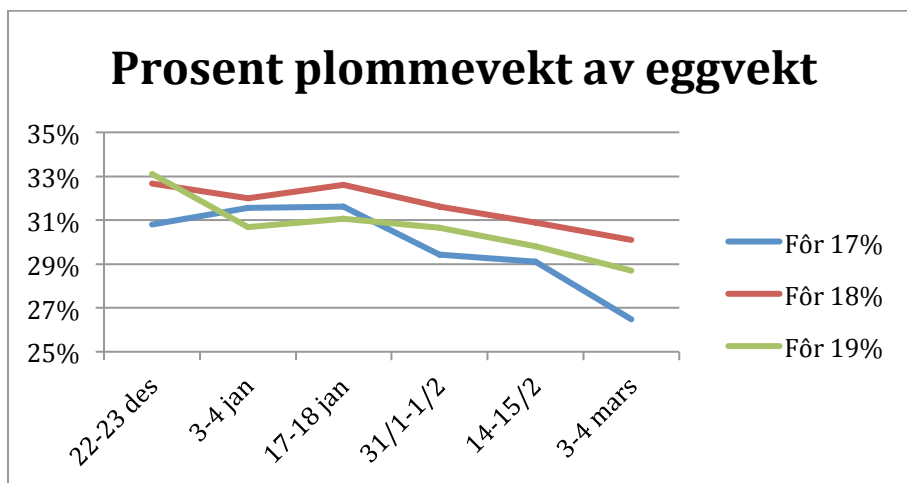
Eggvekt fra stikkprøver (til sammen 490 egg) viser utviklingen i eggvekt gjennom forsøket (Figur 10). 19% viste størst økning, 18% startet på nesten lik vekt som 17% men endte med minst økning. Eggeplommevekten viste imidlertid motsatt trend, med tilsvarende nedgang i vekt (Figur 11). 18% var den gruppen som gikk ned minst i plommevekt. Prosentuell forandring i plommevekt av eggvekt vises i Figur 12. Høner som fikk Fôr 17% hadde den laveste plommevektprosenten (26%) ved siste måling, mens de som fikk Fôr 19% viste den høyeste plommevektprosenten (30%) ved samme måletidspunkt.



Figur 10. Utvikling av gjennomsnittlig eggvekt fra stikkprøver fra de tre fôrgruppene (Fôr 17%, Fôr 18% og Fôr 19%) fra prøveuttak fra 22 desember til 4 mars. Eventuelle forandringer i eggvekt grunnet diffundering av væske gjennom skallet under lagring er ikke er kjent.

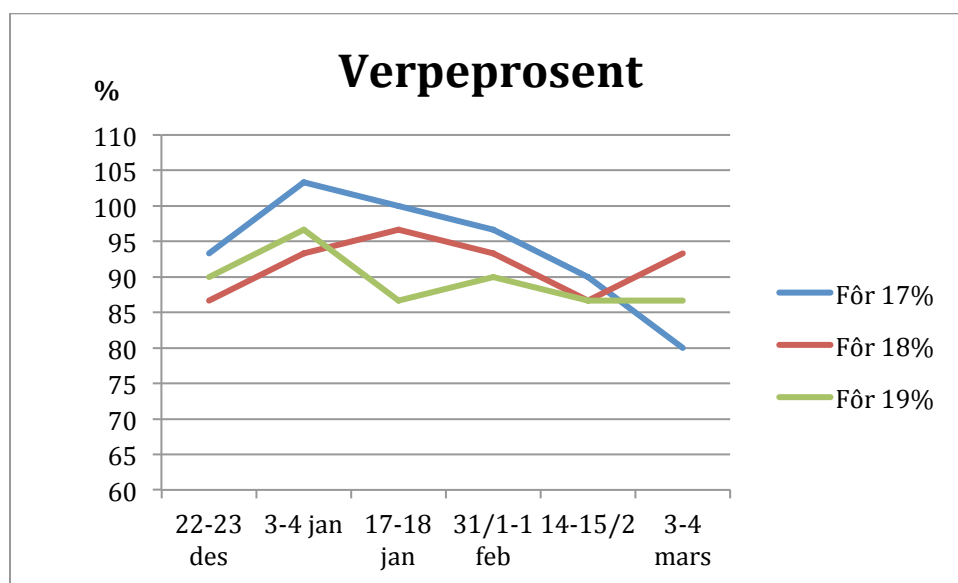


Figur 11. Eggeplommevekt over tid hos de ulike fôrgruppene.



Figur 12. Prosent plommevekt av eggvekt over tid.

Utviklingen av verpeprosenten hos fôrgruppene gjennom forsøket (Figur 13) viste at nivået etter flytting (22-23 desember) lå mellom 86,7% og 93,3%. Det ble vist en oppgang for alle injiseringsgrupper ved neste måling (3-4 januar), som fortsatte til 17-18 januar for hønene som spiste Fôr18%. Deretter gikk nivået ned for Fôr 17% og Fôr 18% frem til 14-15 februar. Fôr 17% fortsatte å minke ved siste måling (3-4 mars), mens Fôr 18% viste en liten oppgang. Likt Fôr 17% og Fôr 18% gikk Fôr 19% for så vidt ned fra 17-18 mars men planet ut resten av forsøksperioden.



Figur 13. Verpprosent for de forskjellige fôrgruppene fra 22 desember til 4 mars.

3.4 IgY

3.4.1 Forandring av prøvevolum etter dialyse

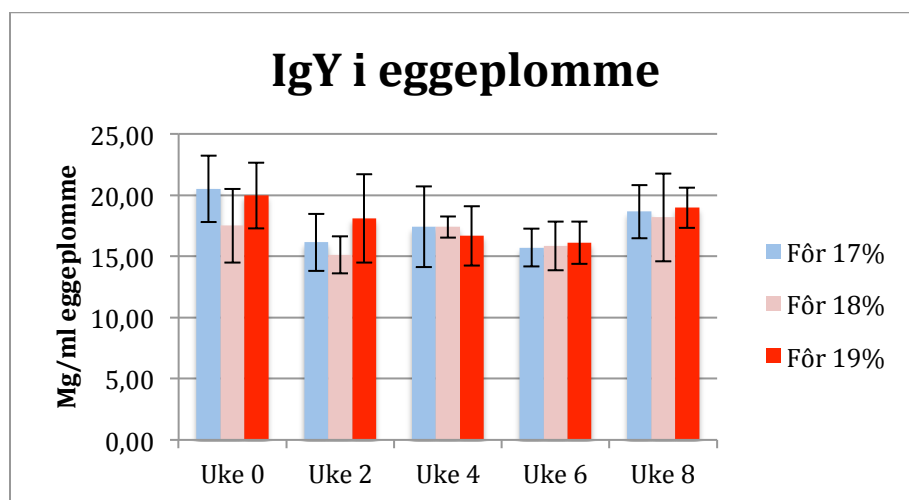
Med unntak av injiseringsgruppe A Fôr 17% (2,74%), så varierte vektforandringen etter dialyse mellom 14,42 til 19,71% høyere vekt enn før dialyse (Tabell 9). Gjennomsnittet (uten A Fôr 17%) var 16,62%. Resultatet fra veiingen ble ikke tatt med i videre beregninger.

Tabell 9. Vektforandring av prøver ved dialyse, prøvedato 4.

	Vekt før dialyse, g.	Vekt etter dialyse, g.	Differanse, %
A Fôr 17%	10,60	10,89	+2,7
B Fôr 17%	10,80	12,59	+16,6
C Fôr 17%	10,50	12,57	+19,7
D Fôr 17%	10,50	12,25	+16,7
PRIOR Fôr 17%	10,30	12,02	+16,7
A Fôr 18%	10,10	11,64	+15,3
B Fôr 18%	10,40	11,99	+15,3
C Fôr 18%	10,50	12,16	+15,8
D Fôr 18%	10,40	12,11	+16,4
PRIOR Fôr 18%	10,40	11,90	+14,4
A Fôr 19%	10,40	12,39	+19,1
B Fôr 19%	10,50	12,08	+15,1
C Fôr 19%	10,60	12,40	+17,0
D Fôr 19%	10,60	12,31	+16,13
PRIOR Fôr 19%	10,10	11,97	+18,51

3.4.2 Generell IgY-nivå i eggeplomme

Beregninger viste at det ikke kunne trekkes konklusjoner om forskjell i gjennomsnittskonsentrasjon av mg IgY/ml eggeplomme (Figur 14). Hver stolpe representerer 5 injeksjonsgrupper á ca 8 egg fra tre sammenhengende innsamlingsdager. Kontrollmålinger der én prøve fra hvert uttaksdato ble målt på nytt viste at det var lite dag-til-dagvariasjon; gjennomsnittlig 3,6%.



Figur 14. Målt IgY i eggeplomme (mg/ml) fra uke 0 til uke 8 hos alle fôrgrupper.

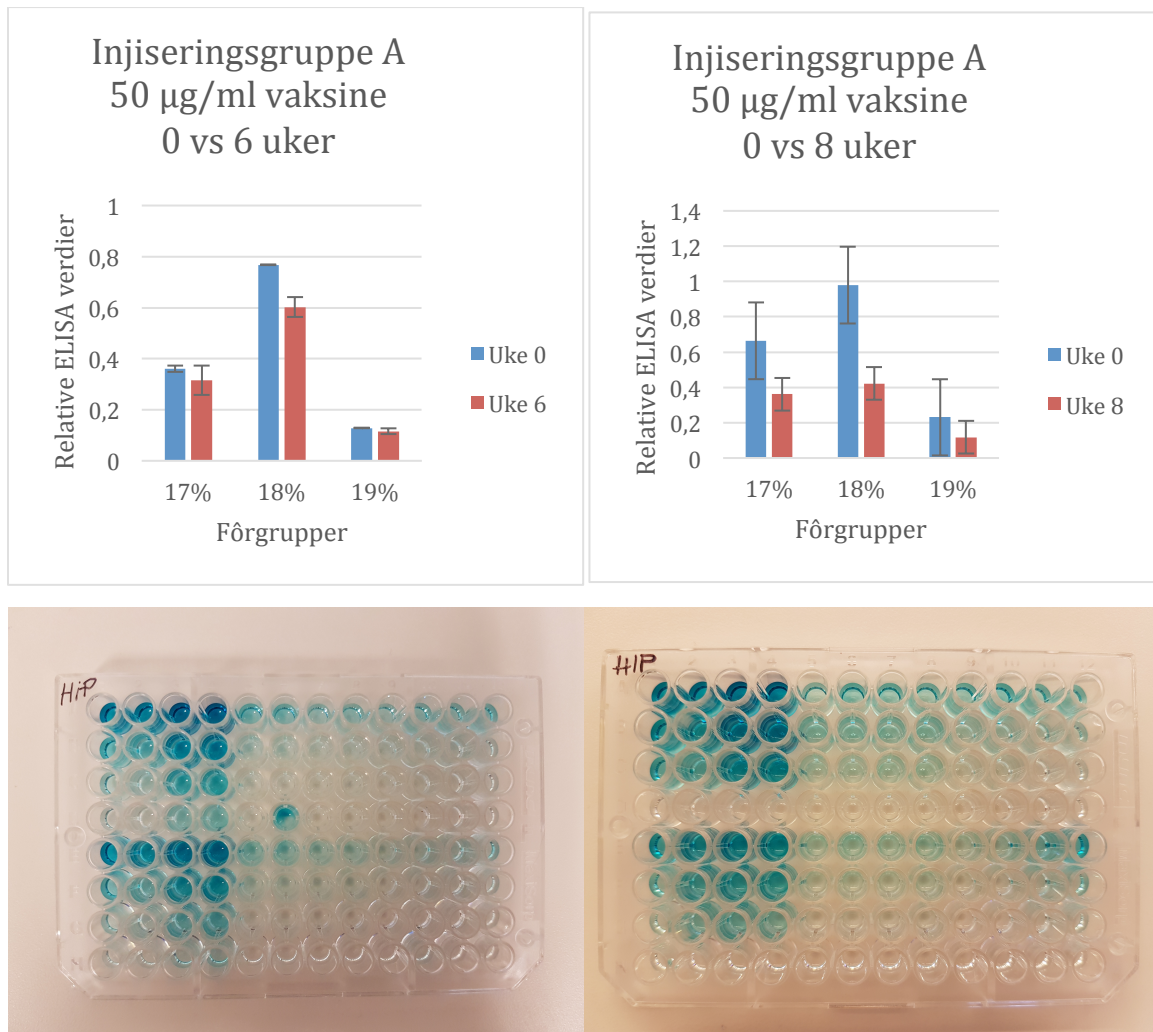
3.4.3 Spesifikk IgY-nivå i eggeplomme

Siden målinger med ELISA er meget følsomme og viser relative, ikke absolutte, verdier kunne forskjellige plater ikke sammenlignes med hverandre. Resultatene ble derfor beregnet separat for hver plate, og to paralleller ble tatt ut for å beregne gjennomsnitt for hver gruppe i de valgte uttaksdatoene. Resultatene viser kun eventuelle trender men ikke konklusjoner, da resultatene ikke er statistisk testet.

Oppsett for i hvilke brønner de forskjellige prøvene ble tilsatt, er vist i tabell 7.

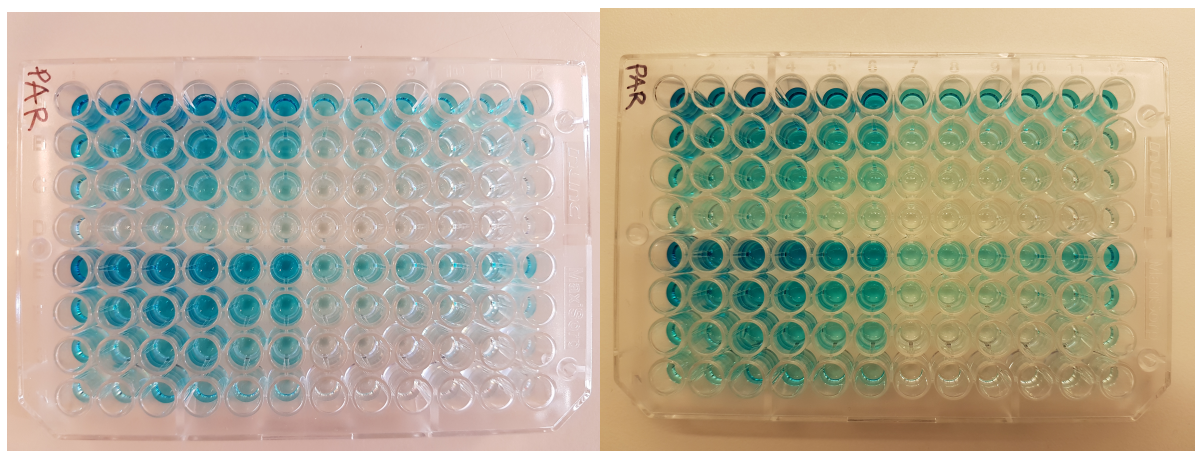
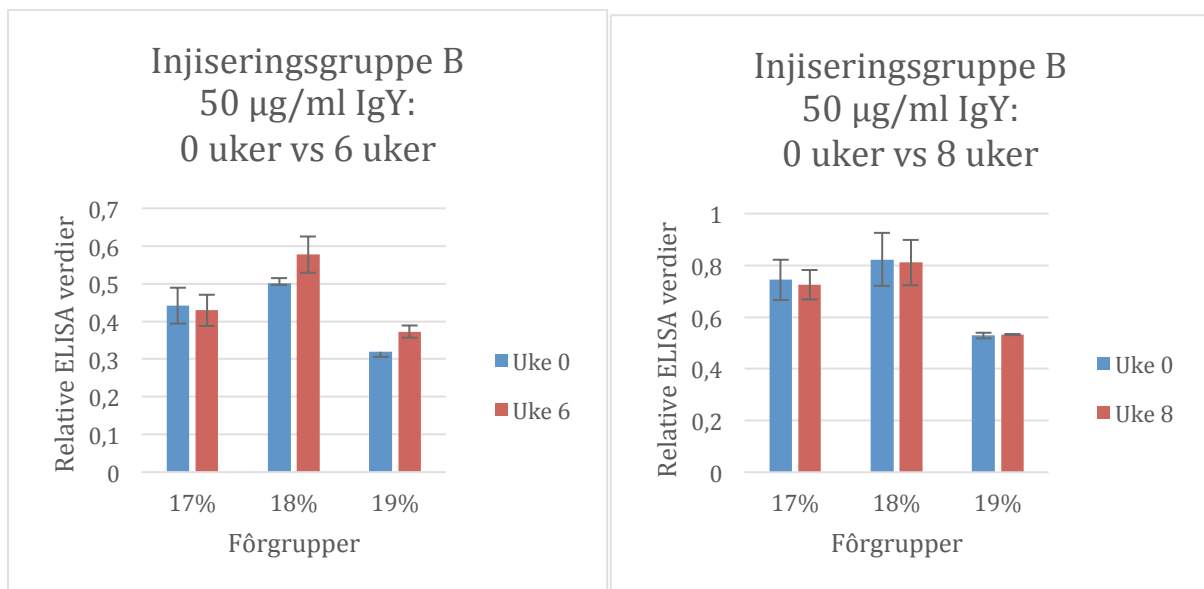
Injiseringgruppe A

Ved måling i ELISA av uke 0 mot uke 6 så det ut til å være forskjell i IgY-konsentrasjon kun for høner injisert med A på Fôr 18%. Der var IgY-nivået lavere etter 6 uker sammenlignet med forsøksstart. Også etter 8 uker var det lavere IgY-nivå for Fôr 18% sammenlignet med forsøksstart. For Fôr 17% og Fôr 19% vises ikke denne trenden ved noen av uttaksdatoene. Begge testene viste imidlertid samme mønster for alle fôrtypene med lavere IgY-nivå i egg etter 6 og 8 uker enn ved forsøksstart. Testene viste et generelt meget lavt nivå av antistoff hos A Fôr 19% og dette ble styrket av øvrige målinger av A Fôr 19% (Vedlegg 5B). Det vises noe kontaminering i brønn 6D på platen tilhørende Figur 15a – absorptansen er tilsynelatende sterkere der enn ved den sterkeste fortynningen av Fôr 19% på samme plate. På platen tilhørende Figur 15b, er absorptansen hos PRIOR-hønene liknende for A Fôr 19%.



Injiseringgruppe B

Det var i følge testene en trend at det var noe høyere IgY-nivå i egg etter 6 uker for høner injisert med B på Fôr 18% og Fôr 19% (Figur 16a), men ikke for de som hadde fått Fôr 17%. Etter 8 uker var nivåene tilnærmet like som ved forsøksstart, for alle fôrgrupper (Figur 16b).



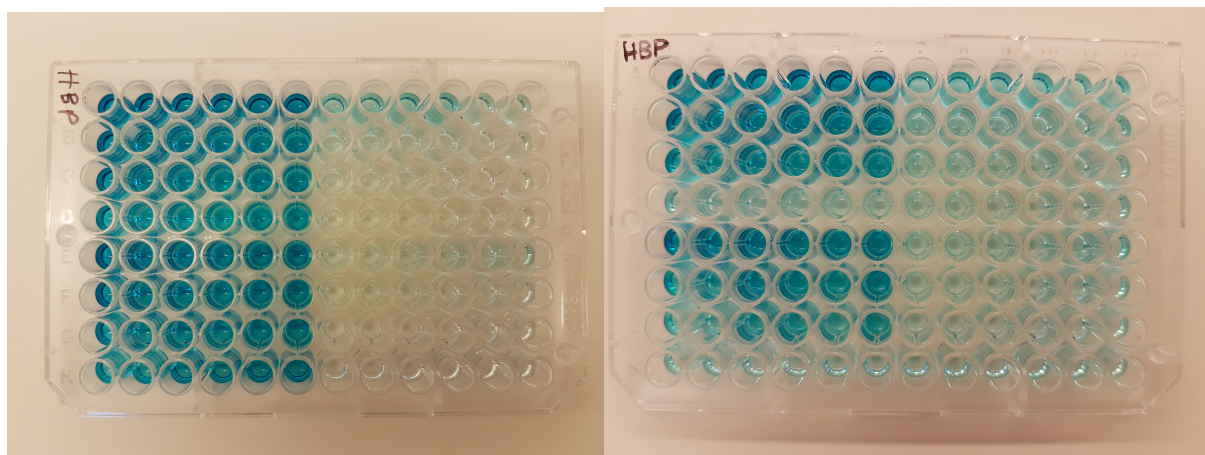
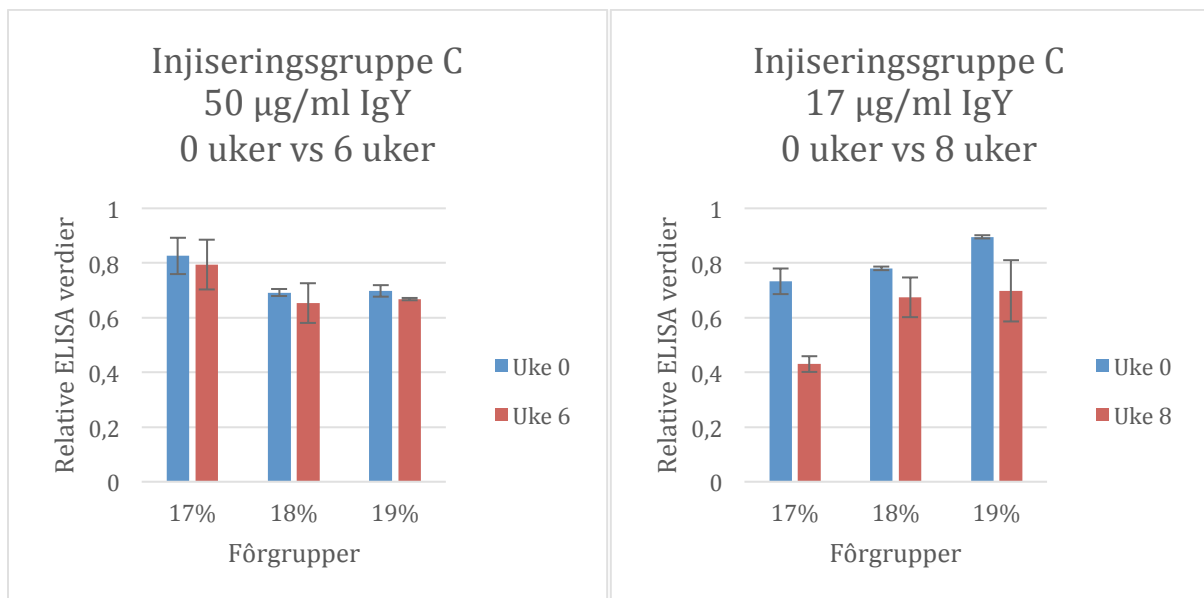
Figur 16a-b. Resultat fra de valgte B-målinger.

Bilder: ELISA-platene fra de samme målingene som respektive diagram ovenfor.

Injiseringgruppe C

For høner injisert med C viste testene ingen trend i forskjeller i IgY-nivå mellom forsøksstart og uke 6, mens mellom forsøksstart og uke 8 var det forskjeller hos alle fôrgruppene da de alle viste et lavere IgY-nivå etter 8 uker. Gruppene med Fôr 18% og Fôr 19% hadde imidlertid minket mindre enn 17%.

Den endrede fortynningen som ble gjort 27 mars for C og D kan ses tydelig i Figur 17b hvor forskjellene mellom periodene er relativt større enn i Figur 17a.



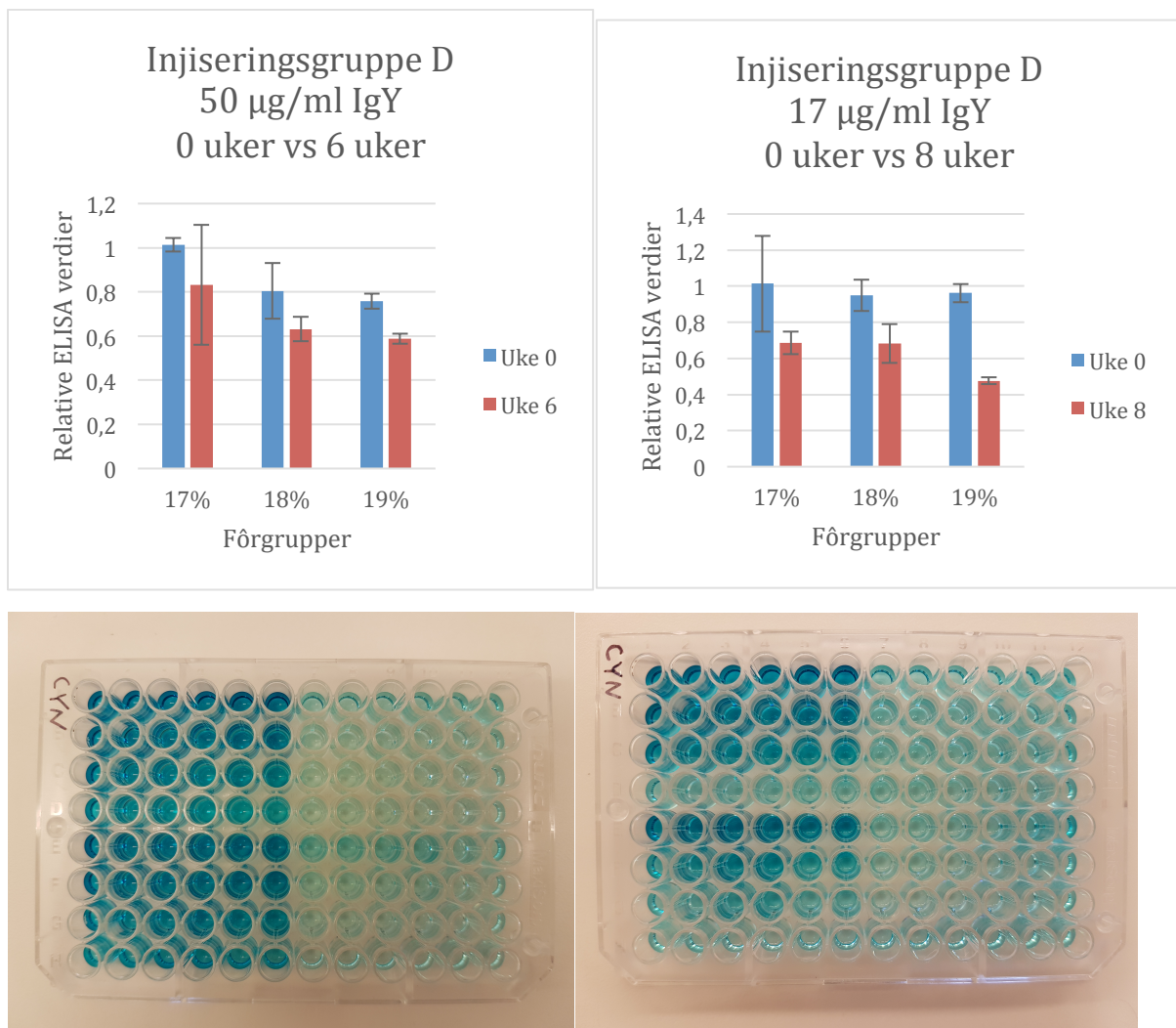
Figur 17a-b. Resultat fra de valgte C-målinger.

Bilder: ELISA-platene fra de samme målingene som respektive diagram ovenfor.

Injiseringsgruppe D

Ved testing av IgY-nivå i egg hos høner som hadde blitt injisert med D, vistes et mønster med lavere nivå etter 6 uker sammenlignet med forsøksstart. Det samme mønster ble vist ved testing av forsøksstart mot etter 8 uker med lavere verdier for alle gruppene. Her så D Fôr 19% ut til å ha minket mest.

Som for C kan den endrede fortyningen som ble gjort 27. mars også ses for D i Figur 18b hvor forskjellene mellom periodene er noe større enn i Figur 18a.



Figur 18a-b. Resultat fra de valgte D-målinger.

Bilder: ELISA-platene fra de samme målingene som respektive diagram ovenfor.

3.5 Statistiske analyser

En lineær ANOVA type 2-test (obeying marginality) ble ansett å være korrekt å bruke da de tre hønene fra hvert bur ble sett som replikater, inne i hvert bur. Eggene som ble samlet fra hvert bur var blandet og det ble antatt at de gjennomsnittlige verdiene fra hver høne var samme for andre høner i samme bur. Det var altså ikke mulig å teste hvert enkelt individ. Grunnet tekniske problemer med programvaren ble det ikke mulig å teste om det var signifikante forskjeller i fôropptak mellom gruppene.

Modellen som ble brukt:

$$\text{Generell IgY-konsentrasjon} = \text{Fôrtype} * \text{Prøveuttaksdato} + r(\text{Injiseringssgruppe}) + \text{Plommevekt}$$

hvor *Fôrtype* var de tre fôrtypene Fôr 17%, Fôr 18% og Fôr 19%, *Prøveuttaksdato* var uke 0, uke 2, uke 4, uke 6 og uke 8, *r(Injiseringssgruppe)* var tilfeldig faktor av injiseringsgruppe (A, B, C, D samt PRIOR) og *Plommevekt* var gjennomsnittlig plommevekt hos alle grupper.

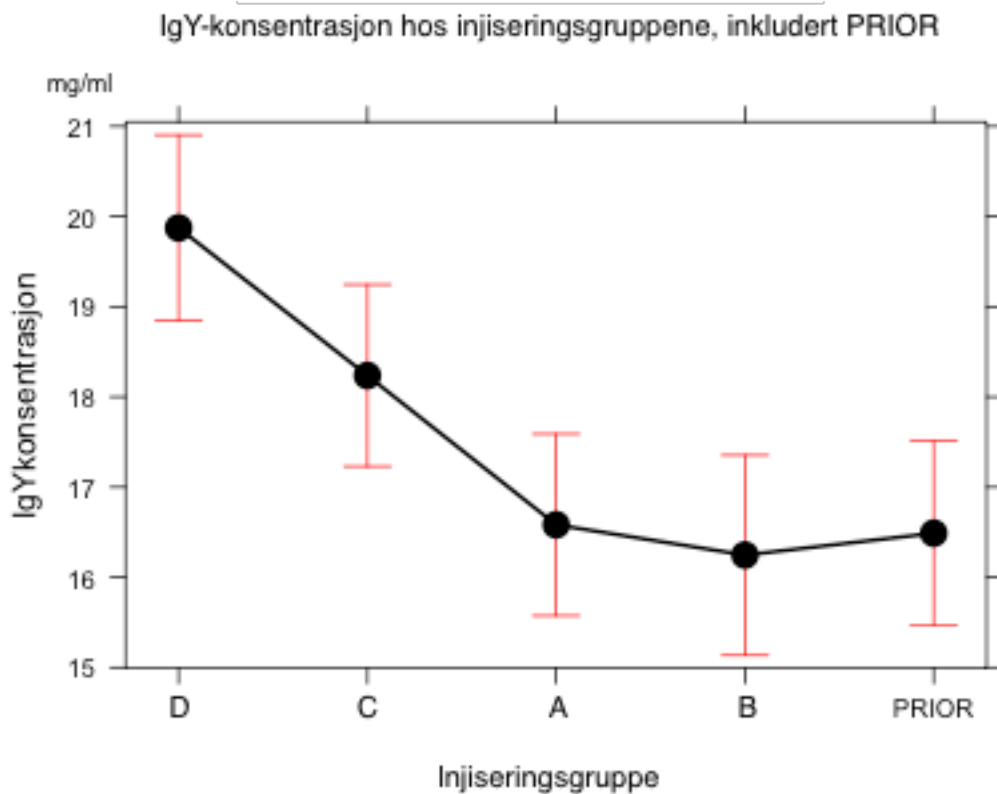
Ved 95% konfidensintervall viste analysene at injeksjonsgruppe respektive prøveuttaksdato hadde en signifikant innvirkning på den generell IgY-konsentrasjonen, begge med p-verdi under 0,001 (Tabell 10). Fôrtype, plommevekt, og fôrtype sammen med prøveuttaksdato var ikke signifikante ($P > 0,05$).

Tabell 10. Resultater fra ANOVA type II test for total IgY-konsentrasjon i egg.

Respons: Generell IgY-konsentrasjon	Kvadratsum	Frihetsgrader	F-verdi	P-verdi¹
Fôrtype (Fôr 17%, Fôr 18%, Fôr 19%)	12,8	2	1,694	0,193
Prøveuttaks-dato (uke 0, uke 2, uke 4, uke 6, uke 8)	116,4	4	7,683	5,422e ⁻⁰⁵
Injiseringssgruppe (A, B, C, D, PRIOR)	134,6	4	8,890	1,307e ⁻⁰⁵
Plommevekt	2,8	1	0,748	0,391
Fôrtype x Prøveuttaksdato	34,1	8	1,124	0,362
Residualer	208,3	55		

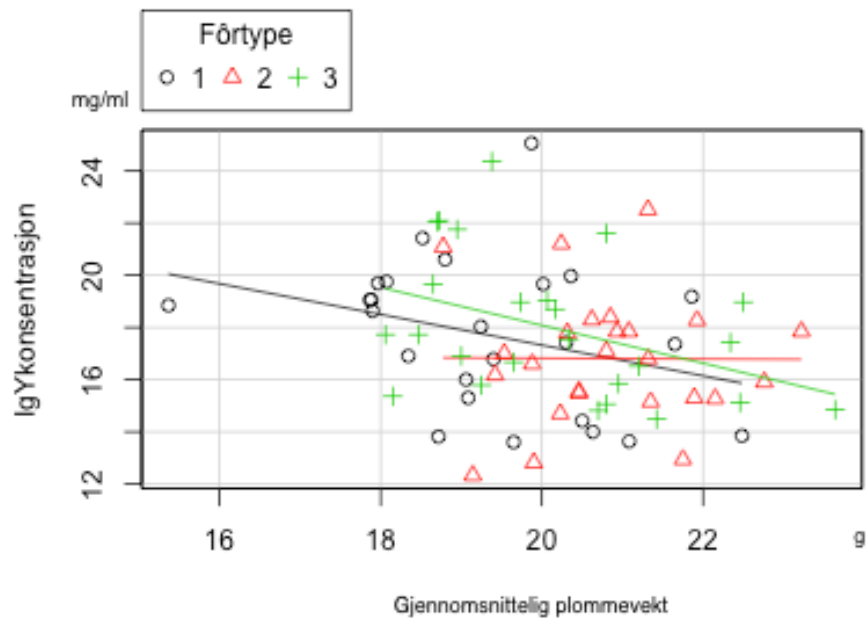
¹Signifikans ved $P < 0,05$.

Figur 19 viser forskjeller mellom injiseringsgrupper i total IgY-konsentrasjon i egg. IgY-konsentrasjonen var signifikant påvirket av hvilken injiseringsgruppe hønene tilhørte ($P=1,307 \times 10^{-5}$).



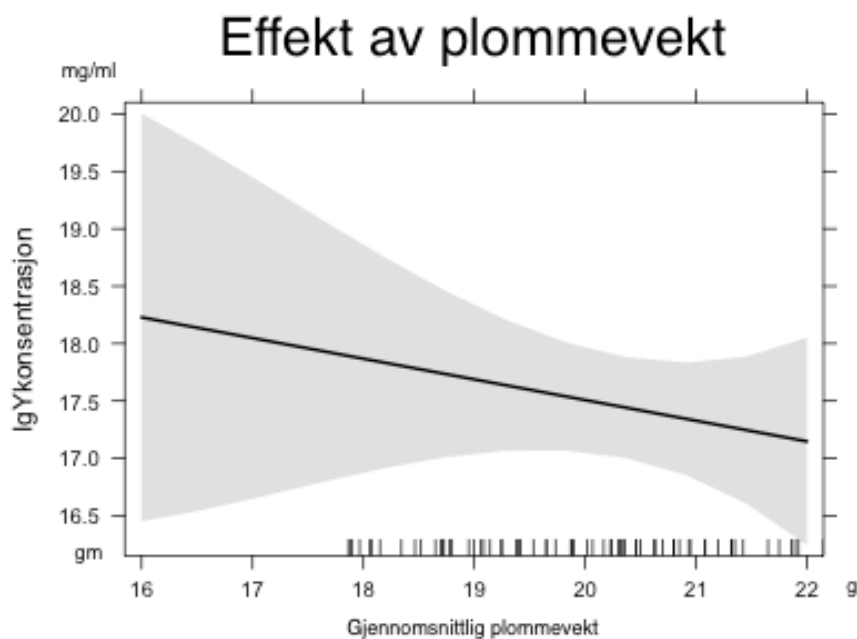
Figur 19. IgY-konsentrasjonen i egg fra høner injisert med A, B, C, D eller ingen injisering (PRIOR).

Figur 20 viser spredning av gjennomsnittlig plommevekt og IgY-konsentrasjon ved forskjellig fôrtype (Fôr 17%, Fôr 18% og Fôr 19%). Det ble ikke påvist noen tydelig sammenheng.



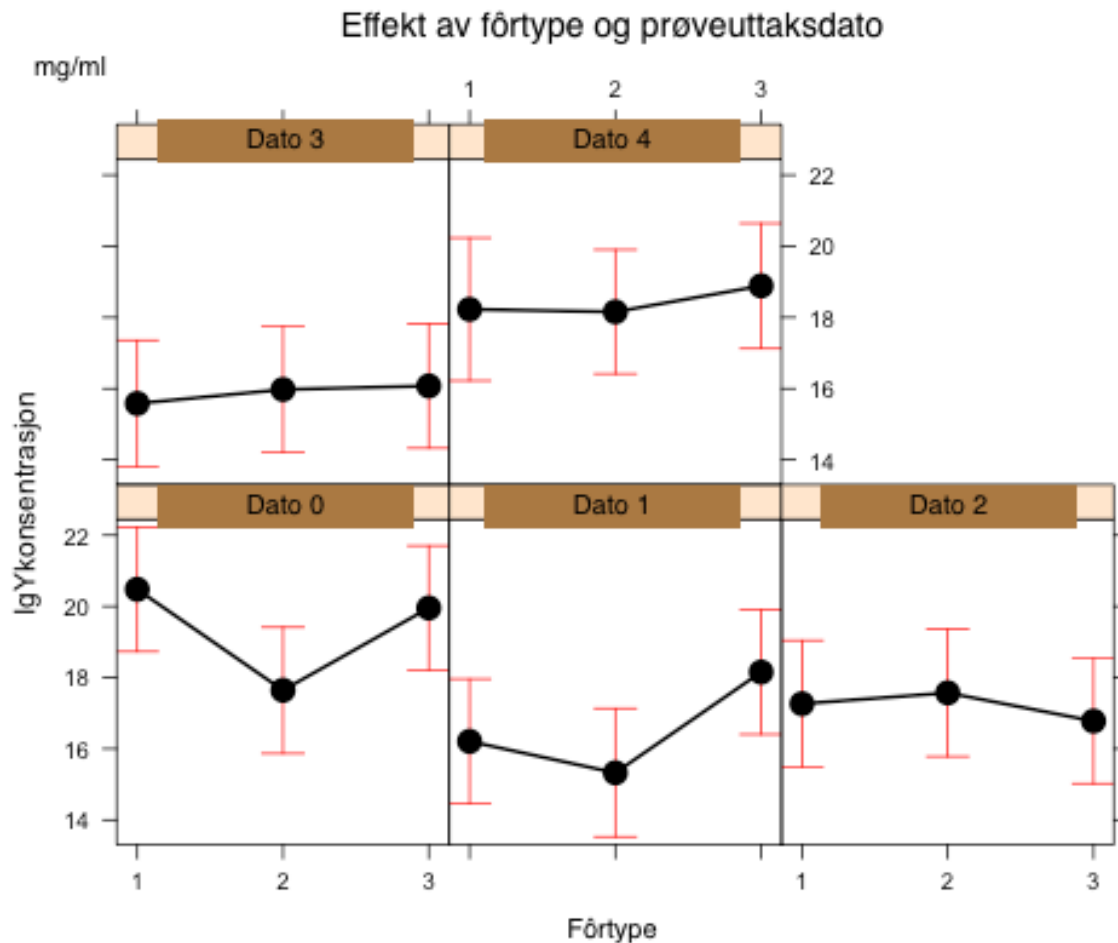
Figur 20. Spredningsdiagram for IgY-nivå ved forskjellig fôrtype og gjennomsnittlig plommevekt. Fôrtype 1, 2 og 3 tilsvarer Fôr 1, Fôr 2 respektive Fôr 3.

Plommevekten var ikke signifikant for IgY-nivået ($P=0,391$). Det er imidlertid interessant å studere spredningen av IgY-konsentrasjonen mot plommevekten (Figur 21). Der vises en trend mot høyere IgY-konsentrasjon (og større konfidensintervall) med lavere plommevekt. Det grå området viser konfidensintervallet for IgY-konsentrasjonen.



Figur 21. Gjennomsnittlig plommevekt (g) og IgY-konsentrasjon (mg/ml plomme).

Interaksjoner mellom fôrtype og dato (Figur 22), viste ingen signifikante forskjeller i IgY-konsentrasjonen ($P=0,362$). De var dermed uavhengig av hverandre; ved en gitt fôrtype varierte ikke plommevekten signifikant sammen med fôrtypen, og motsatt.



Figur 22. Forholdet mellom fôrgrupper ved forskjellige prøveuttaksdatoer, i IgY-konsentrasjon. 1, 2 og 3 representerer fôrtype Fôr 17%, Fôr 18% respektive Fôr 19%. Dato 0-4 representerer prøveuttaksdatoene (0-4).

4.0 Diskusjon

4.1 Generell IgY-nivå i eggeplomme

Generell IgY mg/g eggeplomme ble ikke påvirket av endret protein i fôret fra 17%, 18% og 19% protein. Spektrofotometermålingene viste ingen effekt fra fôrtype på generell IgY-nivå ($P=0,193$). Det er vist at IgY-nivået varierer lite fra dag til dag (Carlander et al. 2001; Li et al. 1998). Imidlertid var det forventet at nivået skulle gå opp ved økt proteinnivå i fôret. Anbefalt proteininntak for verpehøner (Leghorn) er vist å være mellom 12,5% til 15% ved fôrinntak på 120g fôr/dag respektive 100 g fôr/dag per høne (National Research Council Committee on Animal Nutrition 1994). Hønene i dette forsøket spiste i gjennomsnitt 113 g (Fôr 17%), 115 g (Fôr 18%) og 116 g (Fôr 19%) per dag i forsøksperioden. Derfor er det rimelig å anta at standard proteinnivå på 17% er tilstrekkelig, og at høna muligens ikke lagrer mer IgY i eggeplommen ved inntak av mer fôrprotein. I følge Carlander et al. 2001, så er nivået av IgY stabilt på grunn av at hvert enkelt avkom skal ha like forutsetninger uansett hønans eggproduksjon-rate og eggstørrelse. IgY transporteres aktivt mot sin gradient inn i eggeplommen, i midlertid vet vi ikke serumkonsentrasjon i dette forsøket, eller om proteinnivået i fôr vil påvirke dette nivået. Det kan ikke utelukkes at det ikke var høyere IgY i serum ved høyere protein-nivå i fôr, men det er uvisst om transporten fungerer sånn at høyere konsentrasjon i serum automatisk vil gi et høyere nivå i eggeplomme.

Usikkerheter ved metoden

Med mange trinn i IgY-bestemmelsen ble det rom for mange feil. For eksempel ble mange kjemiske løsninger laget nye hver gang, til alle fem prøveuttak. Kjemisk sett er det ammoniumsulfat som gjør at IgY feller ut. Det var imidlertid ikke kontroll på å bruke samme ammoniumsulfatløsning hver uke og til tross for at det er et resept som skal følges ved produksjon av ammoniumsulfat må en ta med i beregningen at innholdet kan ha variert noe grunnet menneskelig feil. En annen usikkerhetsfaktor er at det er viktig at prøvene har tint tilstrekkelig før tilsetning av ammoniumsulfatet. Dette kan ha variert noe.

En annen feilkilde kan være veiing ved tilsetning av væsker og prøver. Det var ikke mulig å få dette til å bli presist gjennom hele IgY-rensingene. En mulighet til forbedring er å registrere faktisk tilsatt mengde ved alle trinn, spesielt ved dialyse, og så bruke registreringene ved

beregning av resultatet. Ved måling av prøvevekt før og etter dialyse fremkom det at volumet var forandret. Det er usikkert hvorfor det ikke var samme forandring i alle veide prøver. En faktor er at tilsatt mengde i dialysepølsen kan variere. Denne målingen burde ha blitt utført for alle prøver og forandringer burde så ha blitt tatt med i beregninger.

Det ble vurdert å ta to nullprøver, men grunnet tidsbegrensninger ble dette ikke mulig. To nullprøver ville sannsynlig ha gitt et sikrere startpunkt å sammenligne de etterfølgende prøveuttakene mot.

4.2 Spesifikk IgY-nivå i eggeplomme

Oppsummert ga ikke IgY-målingene ved ELISA et entydig svar på om proteinnivået i fôr påvirket det spesifikke IgY-nivået i eggeplomme. Det var lavere spesifikk IgY for injiseringsgruppe A Fôr 18% etter 6 og 8 uker sammenlignet med ved start. Det var høyere IgY for injiseringsgruppe B Fôr 18% og B Fôr 19% etter 6 uker men ikke etter 8 uker sammenlignet med start. Ved alle fôrtyper hos injiseringsgruppe C minsket IgY etter 8 uker men C Fôr 18% og C Fôr 19% minskete mindre enn C Fôr 17% enn ved start. Det er mulig at de også etter 6 uker hadde vist samme forhold i minskning fra start hvis samme konsentrasjon hadde blitt brukt. Også for injiseringsgruppe D minsket IgY for alle grupper, men her var det mest fall i IgY hos D Fôr 19%. Trenden så lik ut som for injiseringsgruppe C ellers, at det er mulig at også 17% og 18% hadde minsket etter 6 uker hvis fortynningen hadde vært lik.

I alle injiseringsgrupper var det forventet at nivået hos Fôr 17%-proteingruppene skulle være lik over tid da disse hønene fikk samme fôr i alle perioder. Men majoriteten var tydelig ikke lik, men fulgte samme mønster som gruppene som fikk Fôr 18% og Fôr 19% da de viste omtrent samme forandring i forhold til hverandre. Hvis forandringen hos gruppene som fikk Fôr 18% og Fôr 19% var reel så hadde det ikke vært samme forandring hos PRIOR Fôr 17% (kontrollgruppen) som for Fôr 18% og Fôr 19%. De mest interessante resultatene er derfor minskningen i IgY hos injiseringsgruppe C og D. Dessverre motsier disse resultatene hverandre da C Fôr 18% og C Fôr 19% minskete mindre enn C Fôr 17%, men minskete mer for tilsvarende D Fôr 19% mot D Fôr 17%.

Det burde i teorien ikke være forskjellig resultat etter 6 uker sammenlignet med etter 8 uker, da det tar ca 12 dager for et egg å dannes og egget således burde være stabilt i sin sammensetning lenge før 6 uker. Forskjeller skylles heller feilkilder i metodikken. Alt som skjer før selve målingen i ELISA-avleseren kan gi potensielle feil. For eksempel er det flere ting som påvirker selve utbyttet av IgY fra eggeplommen, blant annet bruk av kjemiske løsninger og tining (flere eksempler i Kapittel 4.1 Generell IgY-nivå i eggeplomme”).

Konsentrasjonen fra spektrofotometermålingene ble brukt til å beregne hvor mye hver prøve skulle fortynnes for å få riktig konsentrasjon til målinger med ELISA. Det var vist at det var liten forskjell i målingene med spektrofotometeret (med kontrollprøver). Variansen er akseptabel for denne typen målinger. Derfor er resultatet fra spektrofotometeren ganske sikre, mens ELISA-resultatene er mer usikre dels på grunn av at det kreves gode rutiner av erfaren personell som har utført protokollen mange ganger for å få en sikker, standardisert teknikk. Eventuell varians av hvor mye IgY som felles ut hadde formodentlig også minket ved tre rensinger av IgY – dette hadde gitt tre paralleller hvor resultatet hadde blitt sikrere ved å ta gjennomsnitt og standardavvik av målingene. Dette var ikke mulig på grunn av tidsperspektivet.

4.3 Fôrsammensetning og fôrforbruk

Fôrsammensetningen var som forventet med henhold til økende nivåer av de enkle aminosyrene ved økende nivå av totalprotein. Fôr 17% inneholdt 16,5% protein, Fôr 18% inneholdt 17,8% protein og Fôr 19% inneholdt 18,7% protein. Energiinnholdet lå mellom 336 og 347 kcal/100 g fôr, med mest energi i Fôr 18% og minst i Fôr 17%. Fôr 18% og Fôr 19% hadde noe lavere vanninnhold, lavere andel flerumettede fettsyrer og noe høyere råfiberinnhold, enn Fôr 17%.

Mineralsammensetningen var noe varierende. Det var forventet at nivåene skulle være tilnærmet like i de tre fôrtypene. Den største variasjonen var nivået av jern som var lavest for Fôr 18% (18,6 mg/100 g fôr). Også kalsium var lavest for Fôr 18% (3350 mg/100 g fôr). Variansen i mineralsammensetningen kan eventuelt forklares ved at det kan ha vært forskjellige mekaniske metoder ved produksjon og blanding av kraftfôret, eller ved feil ved representativt uttak av fôrprøver.

Fôrforbruket i tilvenningsperioden var kun et estimat og det er derfor sikrere å se på forskjeller mellom gruppene i forsøksperioden. Det varierte relativt lite når en så på gjennomsnittet av gruppene innen hver fôrgruppe.

Hønene som fikk Fôr 18% stod lenger borte fra de andre (oppsett vist i Tabell 4). Det kan tenkes at de dermed var roligere og skulle ha spist mindre enn de andre gruppene. Hønene som fikk Fôr 17% og Fôr 19% stod ovenfor hverandre og fikk muligens mer stimulans fra dette. Det var ikke mulig å teste ut om det var av betydning for fôrforbruket hvor hønene stod i rommet, da de var plassert gruppevis etter fôrtype. Funnene fra dette forsøket styrket imidlertid ikke noen av disse teoriene. De styrket heller ikke teorien om at høner som får nytt fôr er skeptiske til det i begynnelsen og vil spise mindre. Hønene som fikk Fôr 18% og Fôr 19% spiste tomt ”direkte” ved overgang til forsøksfôr (observasjon fra ansvarlig røkter).

Det er kjent at høner er eksperter på å plukke i seg de fôrbiter som sammen gir de eksakt det de trenger av næringsstoffer. Kraftfôret var pelletert, men smuldret sammen noe og det var mye mel igjen i bunnen av fôrrennen hver dag. Smuldringen var lik i de tre fôrtypene. Derfor kunne fôrinntaket gjerne ha blitt kontrollert ved å sende rester til analyse for å sjekke om hønene plukket og fikk i seg en annen sammensetning enn forventet.

4.4 Eggproduksjon

Gjennom tilvennings- og forsøksperioden lå verpeprosenten på ca 97% for hønene som fikk Fôr 17%, mot ca 94-95% for de som fikk Fôr 18% og Fôr 19%. Verpeprosenten forandret seg lite mellom periodene. Sett sammen med at det var små forskjeller i fôropptak så det ut som fôrtype hadde lite å si for eggproduksjonen. Et interessant funn ved dette forsøket var imidlertid at Fôr 18% og Fôr 19% viste den minste reduksjonen i plommevekt. Eggvekt og eggeplomme-størrelse har betydning for IgY-innholdet, men IgY varierer ikke hos samme individ (Li et al. 1998). Derfor er det usikkert om forandringen i plommevekt i dette forsøket er av betydning.

En risiko ved å øke proteininnholdet i fôr er at mer protein i fôret kan gi bløtere gjødsel, dermed flere skitne egg og flere egg som må kastes. Dette kan gi dårligere økonomisk resultat. I dette forsøket ble det ikke vist tendenser til flere kastede egg avhengig av fôrtype.

Begrensinger

En svakhet ved stikkprøvene var at det for hver periode ble tatt ut egg fra to dager, som ga i gjennomsnitt 6 egg per gruppe. Dette var relativt få og gjorde metoden sårbar for varians. Forslagsvis burde flere eller alle egg ha blitt veid, hver uke for alle 15 grupper. Forsøket kunne også ha blitt forlenget til det ble sett en eventuell utflating av kurvene for å se tydeligere om det var effekt av fôrtype. Det er også grunn til å vurdere om 15 høner per fôrgruppe er for få for å utligne individuelle forskjeller som kan ha hatt betydning for resultatet.

5.0 Konklusjon

I dette forsøket kunne det ikke med sikkerhet faststilles at det spesifikke IgY-nivået ble påvirket av mengden protein i fôret. Ved måling av spesifikk IgY i ELISA ble det observert forandringer i IgY-nivå, men forandringene gikk i ulike retninger og kan derved ikke gi noen konklusjon om IgY-nivået ble påvirket. Generell IgY-nivå viste ingen signifikante forskjeller. 17% protein er antakelig nok protein i fôret til å gi adekvat IgY-nivå i eggeplomme.

Det er mulig at svakhetene som er diskutert, samt noen forandringer underveis i metoden, kan ha hatt betydning for resultatet. Sannsynlig må metodikken forbedres for å få et sikrere resultat. Følgende muligheter trekkes fram som forslag til å forbedre metodikken i et fremtida, lignende forsøk:

- Én høne per bur for å teste individuelle forskjeller og finne feilkilder.
- Teste Fôr 17% mot fôr med *lavere* proteinprosent, for eksempel under 12,5% protein.
- Registrering av fôropptak ved å veie tildelt fôr samt fjerne og veie fôrrester hver dag.
- To nullprøver og notering av alle vekter i alle trinn.
- Bruk av buffer og andre væsker fra samme batch til alle prøver.
- Tre rensinger av IgY.

Referanser

- Bou, R., Guardiola, F., Barroeta, A. & Codony, R. (2005). Effect of dietary fat sources and zinc and selenium supplements on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poultry science*, 84 (7): 1129-1140.
- Carlander, D., Wilhelmson, M. & Larsson, A. (2001). Limited Day to Day Variation of IgY Levels in Eggs from Individual Laying Hens. *Food and Agricultural Immunology*, 13 (2): 87-92.
- Chalghoumi, R., Théwis, A., Portetelle, D. & Beckers, Y. (2008). Production of Hen Egg Yolk Immunoglobulins Simultaneously Directed Against Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium in the Same Egg Yolk. *Production of Hen Egg Yolk Immunoglobulins Simultaneously Directed Against Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium in the Same Egg Yolk*, 87 (1): 32-40.
- Diraviyam, T., Zhao, B., Wang, Y., Schade, R., Michael, A. & Zhang, X. (2014). Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 9 (5): e97716.
- Furnes Bagley, M. (2002). *Fjørfeboka*: Fagbokforlaget.
- Haug, E., Sand, O. & Sjaastad, Ø. (1992). Kapittel 8, Blodet og immunforsvaret. I: *Menneskets fysiologi*. Oslo: Universitetsforlaget AS.
- Leskanich, C. & Noble, R. (1997). Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid composition of avian eggs and meat. *World's Poultry Science Journal*, 53 (02): 155-183.
- Leslie, G. A. & Martin, L. N. (1973). Studies on the secretory immunologic system of fowl III. Serum and secretory IgA of the chicken. *The Journal of Immunology*, 110 (1): 1-9.
- Li, F., Xu, L. M., Shan, A. S., Hu, J. W., Zhang, Y. Y. & Li, Y. H. (2011). Effect of daily feed intake in laying period on laying performance, egg quality and egg composition of genetically fat and lean lines of chickens. *British Poultry Science*, 52 (2): 163-168.
- Li, X., Nakano, T., Sunwoo, H., Paek, B., Chae, H. & Sim, J. (1998). Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Science*, 77 (2): 266-270.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. G. (2011a). Chapter 14 Feeding standards for maintenance and growth. I: *Animal Nutrition*. Essex: Pearson Education Limited.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A. & Wilkinson, R. G. (2011b). Chapter 15 Feeding standards for reproduction. I: *Animal Nutrition*. Essex: Pearson Education Limited.
- National Research Council Committee on Animal Nutrition. (1994). *Nutrient requirements of poultry*. 9th rev. ed. utg. Nutrient requirements of domestic animals. Washington, D.C: National Academy Press.
- Rose, M. E. & Orland, E. (1981). Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. *Developmental & Comparative Immunology*, 5 (1): 15-20.
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J. & Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern Lab Anim*, 33 (2): 129-154.
- Sjaastad, Ø., Sand, O. & Hove, K. (2010). Chapter 19 Reproduction. I: *Physiology of Domestic Animals. 2nd edition*. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.

Xu, Y., Jin, L., Li, X., Zhen, Y., Lu, Y., Wang, L. & You, J. (2008). *Application of chicken egg yolk immunoglobulin in land and aquatic animal diseases control*, 136. S9-S10 s.

Vedlegg

1. Fôringsskjema

- Huk av hvis du har gitt én strøken blå øse.
- Hvis gitt mer enn én, skriv for eksempel ”+ 1” eller ”+ ½” avhengig av mengde.
- Hvis ikke gitt den dagen, skriv ” – ”

Dato	5 bur med 17%	5 bur med 18%	5 bur med 19%	Merknad	Sign.
10.1					
11.1					
12.1					
13.1					
14.1					
15.1					
16.1					
17.1					
18.1					

3A. Protokoll IgY-utfelling fra egg

Vedlegg 3A beskriver IP-belagt metode som eies av Norwegian Antibodies AS og kan derfor ikke offentliggjøres og er ikke lagt ved denne versjonen av masteroppgaven.

3B. Protokoll Spektrofotometer-måling av IgY-konsentrasjon

Protokollen tar ca 1,5 time.

1. Slå på Millipore-vannet.
2. Slå på strømmen til Spektromaskinen (ikke passord).
3. Hell opp ca 50 ml PBS m/Azid i et glass.
4. Skyll kyvettene med Millipore-vann (NB! Ikke ta på sidene som det måles gjennom). Tørk av utsidene og ha oppi 1000 µl PBS med Azid i hver kyvette, med pipette 100-1000 µl, spiss Finntip 1000.
5. Velg Spektrum, Base Corr (F1). Sjekk at det står Scan range 350-250. Trykk på Autozero.
6. Skyll den fremste kyvetten med Millipore-vann. Tørk av utsiden.
7. Ta ut prøvene fra kjølerommet.
8. Bruk en annen pipette (grå) og sett på en ny Finntip 250 Universal for hver prøve. Sett mengden på 25 µl. Hold spissen mot innsiden av kyvette-veggen når du tilfører prøven.
9. Bruk den første pipetten og sett den på 975 µl. Ha i PBS m/Azid kyvetten (NB! Ikke kom borti kantene av kyvetten med pipetten, da må spissen byttes mellom hver prøve. Pass på å presse ut alt ur pipetten.). Sett kyvetten på plass.
10. Trykk på Start. Når målingen er ferdig kastes den første prøven, skyll glasset, hold det opp ned mot papir og gjør en ny måling med samme prøvenummer.
11. Trykk F2, deretter 3. Noter resultatet. Trykk på Retur tre ganger.
12. Hell ut prøven og gjør om prosedyren fra nr. 6 til alle prøvene er målt.

13. Husk å slå av strømmen på maskinen og å slå av Millipore-vannet.

3C. Protokoll ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Protokollen tar ca 4 timer.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Eks: (spektrofotometer-måling) **17 mg/ml** x **X** =

valgt konsentrasjon **0,5 mg/μl** x valgt mengde **5000 μl** =

$$(0,5 \times 500)/17 = \underline{14,7 \mu l}$$

$$\text{Eks 2: } (0,1 \times 1000)/19,7 = \underline{5,1 \mu l}$$

Coating av ELISA-platen med antigen(1 μg/ml) eller vaksinen (1:100 fortynnet).

1. Lag PBS. Ta med ca 10 ml ferdig blanding i et prøverør (trenger 10 000 μl/100 = 10 ml).
2. Ta ut riktig vaksine.
3. Ta ut 2 nåler og 2 engangssprøyter (1,0 ml). Rist vaksinen og ta ut 0,1 ml med sprøyte, tilsett det i PBS-røret (hold nålen nede i løsningen). Vend røret 4-6 ganger for å blande.

Injisering

D: 9 μl til 10 ml PBS, 18 μl til 20 ml PBS

C: 3,45 (3,5) μl til 10 ml PBS, 6,9 μl til 20 ml PBS

B: 0,1 ml til 10 ml PBS, 0,2 ml til 20 ml PBS

A: 0,1 ml til 10 ml PBS, 0,2 ml til 20 ml PBS

4. Pipetter ut løsningene med multi-channel pipette, 100 μl/brønn (eller 85 μl for å være sikker på å ha nok). Pass på å ikke sette spissen ned i brønnen, la den hvile på kanten.
1. Sjekk at alle brønner har væske og dekk platen med plastfolie/plastfilm og inkuber minimum over natt 24 timer i kjøleskap (platen kan stå i kjøleskap i opptil 1 uke)

TRINN 2: Blokkering

2. Blokkeringsbuffer: 1 %BSA i PBS ((1 gram BSA (Bovint serum albumin) i 100 ml PBS)). Blokkeringsbufferen er holdbar i kjøleskap i ca 1 uke. Hvis blakket = bakterievekst.
3. Tøm platens innhold i vasken. Bank platen lett mot tørkepapir for å fjerne overflødig væske.
4. Tilsett 150 µl/brønn med multi-channel pipette. Det kreves 15 ml blokkeringsbuffer per ELISA plate (96-brønner totalt).
5. Inkuber under lokk (aluminiumsfolie) i 30 minutter ved romtemperatur.
6. Tøm innholdet i vasken. Vask ELISA-platen med PBS/Tween ved bruk av en ELISA-washer apparat (vaskeprogram NUNC-FLAT vasker hver brønn 3 ganger). Bank lett mot tørkepapir etter endt vask for å fjerne overflødig væske.
7. VASKEBUFFER: PBS/0,1 % tween v/v: 1 mL Tween i 1 L PBS.

Primærantistoff

8. Fortynn antistoffene til ønsket konsentrasjon i PBS m Tween. A og B antistoffer krever ca 300 µg/ml som utgangskonsentrasjon i en fortynningsrekke. C noe mindre (må prøve seg frem eller spørre NABAS).
9. Tillaging av fortynningsrekke: Pipetter 150 µl antistoff i Rad A. I radene B-H pipetterer man 100 µl PBS/Tween. Ved å overføre 50 µl fra Rad A til B, videre fra rad B til C osv. får man fortynnet antistoff konsentrasjonen 1:3 for hver rad. Dette gir en fortynningsrekke, og ved et svakere signal for hver fortynning vet man at bindingen er spesifikk. Lag til 2-3 fortynningsrekker per antistoff som skal testes for å få paralleller til å gjøre statistikk.
10. Inkuber i 1 time ved romtemperatur.
11. Tøm innholdet i vasken, bank platen lett mot et tørkepapir, vask med programmet NUNC_FLAT. Bank igjen mot tørkepapir.

Sekundærantistoff (konjugat)

12. Fortynn sekundærantistoffet (Goat-anti-Chicken IgY HRP) 1: 20 000 i PBS/TWEEN. For eksempel 1 μ l i 20 ml PBS m Tween. Eller 2 μ l til 40 ml. Bruk hansker.
13. Tilsett (14 og 23 og 24 og 27 mars: 90 μ l) 100 μ l/brønn. (100 x 96 x 2= trenger ca 20 000 μ l= 20 ml til 2 plater. 40 ml til 4 plater).
14. Inkuber i 1 time ved romtemperatur.
15. Tøm innholdet i vasken, bank ELISA platen lett mot et tørkepapir, vask med programmet NUNC_FLAT, bank igjen mot et tørkepapir.

Substrat (fremkalling)

16. TMB er en løsning man kjøper ferdig blandet og kan tilsettes direkte i brønnene. Tilsett 100 μ l/brønn.
17. Inkuber i mørket (under aluminiumsfolie) .
18. Sjekk med jevne mellomrom for fargeutvikling. Ved rask fargeutvikling leses platen av etter 1 til 2 min.
19. Les av platen hver 5 minutt. Noter total inkuberingstid med TMB.

ELISA-måling

20. Les av ELISA-platen ved bruk av en ELISA Reader (vi bruker ELx808). Mål ved 630 nm.

4. Fôranalyser fra Eurofins, Moss.

Gjengitt med tillatelse fra Eurofins Food & Feed Testing Norway AS.

Felleskjøpet Forutvikling AS
Nedre Ila 20
7018 TRONDHEIM
Attn: **Gorm Sanson**

**Eurofins Food & Feed Testing Norway
(Moss)**

F. reg. 982 571 146 MVA
Møllebakken 50
NO-1538 Moss

Tlf: +47 69 00 52 00

Fax: +47 21 00 51 10

AR-17-MO-002823-01



EUNOMO2-00050254

Prøvemottak: 09.03.2017

Temperatur:

Analyseperiode: 09.03.2017-27.03.2017

Referanse: Førforsøk, Moer

ANALYSERAPPORT

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
<: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1,<50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.
Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



Prøvenr.:	440-2017-0309-154	Prøvetakingsdato:	09.03.2017	
Prøvetype:	Fjørfefør	Prøvetaker:	Oppdragsgiver	
Prøvemerkning:	17% Kraftfôr	Analysestartdato:	09.03.2017	
Analyse	Resultat	Enhet	LOQ MU	Metode
a) Aminosyrer (syrehydrolyse)				
a) DI004 Asparaginsyre	1.32	g/100 g	0.017 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Serin (Total)	0.760	g/100 g	0.016 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Glutaminsyre (Total)	3.18	g/100 g	0.021 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Prolin (Total)	1.04	g/100 g	0.02 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Glysin	0.647	g/100 g	0.019 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Alanin	0.804	g/100 g	0.015 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Valin (Total)	0.716	g/100 g	0.016 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Isoleusin	0.601	g/100 g	0.035 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Leusin	1.41	g/100 g	0.015 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Tyrosin (Total)	0.557	g/100 g	0.023	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Phenylalanin (Total)	0.796	g/100 g	0.031 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Histidin	0.380	g/100 g	0.02 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Lysin	0.846	g/100 g	0.014 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Arginin (total)	0.900	g/100 g	0.01 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DJ009 Tryptofan	0.184	g/100 g	0.01 8%	EU 152/2009
a) Cystine , methionine (amino acid, oxidative)				
a) DJ011 Cystein + Cystine	0.305	g/100 g	0.006 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DJ011 Metionin	0.424	g/100 g	0.024 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) Aminosyrer (syrehydrolyse)				
a) DI004 Hydroksyprolin	<0.05 (LOQ)	g/100 g	0.05	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Ornitin	<0.05 (LOQ)	g/100 g	0.05	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Treonin	0.622	g/100 g	0.006	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
d) Svovel i mat				
d) SLB89 Svovel (S)	2400	mg/kg	50 20%	NMKL No 161 1998 mod
c) LW03P Aske	12.3	g/100 g	0.1 10%	2009/152/EU mod.
* MN004 Energi	336	kcal/100 g		Beregnet
c) Fett i mat/før Soxtec uten syrehydrolyse				
c) LW00V Fett Soxtec	7.03	g/100 g	0.1 10%	2009/152/EU mod.
c) Fettsyreprofil				
c) LP056 C6:0 Kapronsyre (Heksansyre)	<0.1	% FA	0.1	Internal Method -

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1,<50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



c)	LP056	C8:0 Kaprylsyre (Oktansyre)	<0.1 % FA	0.1	GC-FID Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C10:0 Kaprinsyre	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C12:0 Laurinsyre	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C14:0 Myristinsyre (Tetradekansyre)	0.5 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 14:1 (Myristoleic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 15:0 (Pentadecanic acid)	0.1 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C15:1 n-5	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C16:0 Palmitinsyre	14.2 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 16:1 n-7 (Palmitoleinsyre)	0.8 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C17:0 Margarinsyre	0.4 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 17:1 n-7 (Heptadecenoic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C18:0 Stearinsyre (Oktadekansyre)	10.3 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:1 n-9 (Oljesyre)	35.4 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C18:2n-6 (Linsyre) %	31.2 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:3n-3 (α-Linolensyre) %	3.4 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:3 n-6 (γ-Linolensyre)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:4n-3 (Octadecatetraenoic acid) %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:0 (Arakinsyre)	0.3 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:1 n-9 (Gadoleinsyre)	0.6 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:2n-6 (Eikosadiensyre) %	0.1 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C20:3n-6 %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:3 n-3	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:4 n-6 (Arakidonsyre)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C20:4n-3 %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:5n-3 (EPA) %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:0 (Behensyre)	0.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C22:1 (Docosenoic Acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C22:2n-6 (Docosadienoic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:4 n-6	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:5 n-6	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1, <50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



c)	LP056	C 22:5 n-3 (Dokosapentaensyre)	<0.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:6n-3 (DHA) %	0.1 % FA	0.1	20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 24:0 (Lignoserinsyre)	0.1 % FA	0.1	20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 24:1 n-9 (Tetracosensyre)	<0.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Sum av mettede fettsyrer	26.0 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Enumettede fettsyrer totalt	36.8 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Flerumettede fettsyrer totalt	35.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Totale fettsyrer	98.0 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Uidentifiserte komponenter	2.0 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Summen av Omega-6 fettsyrer (kalkulert)	31.4 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Summen av Omega-3 fettsyrer (kalkulert)	3.7 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Fatty Acids, Omega6/Omega3 Ratio	8.56	0.1		Internal Method - GC-FID
b) Fosfor mg/kg (For)						
b)	MMF21	Totalt fosfor (P)	4500 mg/kg	20	20%	NS EN ISO 17294-2
b) Jern mg/kg (For)						
b)	MMF27	Jern (Fe)	233 mg/kg	20	25%	NS EN ISO 17294-2
b) Kalium mg/kg (For)						
b)	MMF23	Kalium (K)	5810 mg/kg	60	20%	NS EN ISO 17294-2
b) Kalsium mg/kg i for						
b)	MMF20	Kalsium (Ca)	45500 mg/kg	50	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Kobber mg/kg (For)						
b)	MMF25	Kobber (Cu)	18.9 mg/kg	5	40%	NS EN ISO 17294-2
b) Magnesium mg/kg (For)						
b)	MMF28	Magnesium (Mg)	1600 mg/kg	20	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Mangan mg/kg (For)						
b)	MMF26	Mangan (Mn)	149 mg/kg	1	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Natrium mg/kg (For)						
b)	MMF22	Natrium (Na)	1800 mg/kg	20	15%	NS EN ISO 17294-2
c) Protein (Nx6.25) (Kjeldahl)						
c)	LW03S	Protein (Nx6.25)	16.5 g/100 g	0.3	10%	2009/152/EU
c) Råfiber/trevler (Fibertec)						
c)	LP08B	Trevler	4.7 g/100 g	0.5		ISO 5498 mod.
b) Sink mg/kg (For)						
b)	MMF24	Sink (Zn)	104 mg/kg	10	20%	NS EN ISO 17294-2
c) Vanninnhold i tørre fôrprodukter						
c)	LW01N	Fuktinnhold	10.9 g/100 g	0.1	10%	2009/152/EU mod.

Merknader:

Energi i kcal/100g er beregnet med utgangspunkt i 9 kcal/g for fett, 4 kcal/g for protein, 4 kcal/g for karbohydrat og 2 kcal/g for kostfiber.

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1, <50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



Prøvenr.:	440-2017-0309-155	Prøvetakingsdato:	09.03.2017	
Prøvetype:	Fjørfefør	Prøvetaker:	Oppdragsgiver	
Prøvemerkning:	18% Kraftfôr	Analysestartdato:	09.03.2017	
Analyse	Resultat	Enhet	LOQ MU	Metode
a) Aminosyrer (syrehydrolyse)				
a) DI004 Asparaginsyre	1.47	g/100 g	0.017 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Serin (Total)	0.880	g/100 g	0.016 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Glutaminsyre (Total)	3.68	g/100 g	0.021 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Prolin (Total)	1.23	g/100 g	0.02 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Glysin	0.740	g/100 g	0.019 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Alanin	0.838	g/100 g	0.015 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Valin (Total)	0.796	g/100 g	0.016 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Isoleusin	0.679	g/100 g	0.035 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Leusin	1.50	g/100 g	0.015 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Tyrosin (Total)	0.622	g/100 g	0.023	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Phenylalanin (Total)	0.877	g/100 g	0.031 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Histidin	0.418	g/100 g	0.02 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Lysin	0.886	g/100 g	0.014 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Arginin (total)	0.992	g/100 g	0.01 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DJ009 Tryptofan	0.215	g/100 g	0.01 8%	EU 152/2009
a) Cystine , methionine (amino acid, oxidative)				
a) DJ011 Cystein + Cystine	0.325	g/100 g	0.006 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DJ011 Metionin	0.427	g/100 g	0.024 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) Aminosyrer (syrehydrolyse)				
a) DI004 Hydroksyprolin	<0.05 (LOQ)	g/100 g	0.05	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Ornitin	<0.05 (LOQ)	g/100 g	0.05	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Treonin	0.684	g/100 g	0.006	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
d) Svovel i mat				
d) SLB89 Svovel (S)	2700	mg/kg	50 20%	NMKL No 161 1998 mod
c) LW03P Aske	11.4	g/100 g	0.1 10%	2009/152/EU mod.
* MN004 Energi	347	kcal/100 g		Beregnet
c) Fett i mat/før Soxtec uten syrehydrolyse				
c) LW00V Fett Soxtec	7.36	g/100 g	0.1 10%	2009/152/EU mod.
c) Fettsyreprofil				
c) LP056 C6:0 Kapronsyre (Heksansyre)	<0.1	% FA	0.1	Internal Method -

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1,<50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



c)	LP056	C8:0 Kaprylsyre (Oktansyre)	<0.1 % FA	0.1	GC-FID Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C10:0 Kaprinsyre	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C12:0 Laurinsyre	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C14:0 Myristinsyre (Tetradekansyre)	0.9 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 14:1 (Myristoleic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 15:0 (Pentadecanic acid)	0.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C15:1 n-5	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C16:0 Palmitinsyre	18.9 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 16:1 n-7 (Palmitoleinsyre)	1.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C17:0 Margarinsyre	0.4 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 17:1 n-7 (Heptadecenoic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C18:0 Stearinsyre (Oktadekansyre)	9.0 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:1 n-9 (Oljesyre)	35.1 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C18:2n-6 (Linsyre) %	27.7 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:3n-3 (α-Linolensyre) %	2.8 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:3 n-6 (γ-Linolensyre)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:4n-3 (Octadecatetraenoic acid) %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:0 (Arakinsyre)	0.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:1 n-9 (Gadoleinsyre)	0.6 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:2n-6 (Eikosadiensyre) %	0.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C20:3n-6 %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:3 n-3	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:4 n-6 (Arakidonsyre)	0.1 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C20:4n-3 %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:5n-3 (EPA) %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:0 (Behensyre)	0.1 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C22:1 (Docosenoic Acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C22:2n-6 (Docosadienoic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:4 n-6	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:5 n-6	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1, <50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



c)	LP056	C 22:5 n-3 (Dokosapentaensyre)	<0.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:6n-3 (DHA) %	0.1 % FA	0.1	20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 24:0 (Lignoserinsyre)	<0.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 24:1 n-9 (Tetracosensyre)	<0.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Sum av mettede fettsyrer	29.8 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Enumettede fettsyrer totalt	37.0 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Flerumettede fettsyrer totalt	31.2 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Totale fettsyrer	98.0 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Uidentifiserte komponenter	2.0 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Summen av Omega-6 fettsyrer (kalkulert)	28.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Summen av Omega-3 fettsyrer (kalkulert)	3.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Fatty Acids, Omega6/Omega3 Ratio	9.09	0.1		Internal Method - GC-FID
b) Fosfor mg/kg (For)						
b)	MMF21	Totalt fosfor (P)	4400 mg/kg	20	20%	NS EN ISO 17294-2
b) Jern mg/kg (For)						
b)	MMF27	Jern (Fe)	186 mg/kg	20	40%	NS EN ISO 17294-2
b) Kalium mg/kg (For)						
b)	MMF23	Kalium (K)	5940 mg/kg	60	20%	NS EN ISO 17294-2
b) Kalsium mg/kg i for						
b)	MMF20	Kalsium (Ca)	33500 mg/kg	50	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Kobber mg/kg (For)						
b)	MMF25	Kobber (Cu)	16.2 mg/kg	5	40%	NS EN ISO 17294-2
b) Magnesium mg/kg (For)						
b)	MMF28	Magnesium (Mg)	1550 mg/kg	20	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Mangan mg/kg (For)						
b)	MMF26	Mangan (Mn)	114 mg/kg	1	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Natrium mg/kg (For)						
b)	MMF22	Natrium (Na)	1420 mg/kg	20	15%	NS EN ISO 17294-2
c) Protein (Nx6.25) (Kjeldahl)						
c)	LW03S	Protein (Nx6.25)	17.8 g/100 g	0.3	10%	2009/152/EU
c) Råfiber/trevler (Fibertec)						
c)	LP08B	Trevler	5.9 g/100 g	0.5		ISO 5498 mod.
b) Sink mg/kg (For)						
b)	MMF24	Sink (Zn)	93.6 mg/kg	10	40%	NS EN ISO 17294-2
c) Vanninnhold i tørre fôrprodukter						
c)	LW01N	Fuktinnhold	8.70 g/100 g	0.1	10%	2009/152/EU mod.

Merknader:

Energi i kcal/100g er beregnet med utgangspunkt i 9 kcal/g for fett, 4 kcal/g for protein, 4 kcal/g for karbohydrat og 2 kcal/g for kostfiber.

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1, <50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



Prøvenr.:	440-2017-0309-156	Prøvetakingsdato:	09.03.2017	
Prøvetype:	Fjørfefø	Prøvetaker:	Oppdragsgiver	
Prøvemerkning:	19% Kraftfôr	Analysestartdato:	09.03.2017	
Analyse	Resultat	Enhet	LOQ MU	Metode
a) Aminosyrer (syrehydrolyse)				
a) DI004 Asparaginsyre	1.58	g/100 g	0.017 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Serin (Total)	0.917	g/100 g	0.016 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Glutaminsyre (Total)	3.93	g/100 g	0.021 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Prolin (Total)	1.32	g/100 g	0.02 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Glysin	0.774	g/100 g	0.019 7%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Alanin	0.958	g/100 g	0.015 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Valin (Total)	0.843	g/100 g	0.016 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Isoleusin	0.712	g/100 g	0.035 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Leusin	1.69	g/100 g	0.015 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Tyrosin (Total)	0.677	g/100 g	0.023	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Phenylalanin (Total)	0.958	g/100 g	0.031 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Histidin	0.443	g/100 g	0.02 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Lysin	0.892	g/100 g	0.014 8%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Arginin (total)	1.05	g/100 g	0.01 6%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DJ009 Tryptofan	0.215	g/100 g	0.01 8%	EU 152/2009
a) Cystine , methionine (amino acid, oxidative)				
a) DJ011 Cystein + Cystine	0.341	g/100 g	0.006 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DJ011 Metionin	0.421	g/100 g	0.024 10%	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) Aminosyrer (syrehydrolyse)				
a) DI004 Hydroksyprolin	<0.05 (LOQ)	g/100 g	0.05	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Ornitin	<0.05 (LOQ)	g/100 g	0.05	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
a) DI004 Treonin	0.699	g/100 g	0.006	ISO 13903:2005, EU 152/2009 (F)
d) Svovel i mat				
d) SLB89 Svovel (S)	2600	mg/kg	50 20%	NMKL No 161 1998 mod
c) LW03P Aske	12.9	g/100 g	0.1 10%	2009/152/EU mod.
* MN004 Energi	339	kcal/100 g		Beregnet
c) Fett i mat/før Soxtec uten syrehydrolyse				
c) LW00V Fett Soxtec	7.19	g/100 g	0.1 10%	2009/152/EU mod.
c) Fettsyreprofil				
c) LP056 C6:0 Kapronsyre (Heksansyre)	<0.1	% FA	0.1	Internal Method -

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1,<50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



c)	LP056	C8:0 Kaprylsyre (Oktansyre)	<0.1 % FA	0.1	GC-FID Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C10:0 Kaprinsyre	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C12:0 Laurinsyre	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C14:0 Myristinsyre (Tetradekansyre)	0.7 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 14:1 (Myristoleic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 15:0 (Pentadecanic acid)	0.1 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C15:1 n-5	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C16:0 Palmitinsyre	16.8 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 16:1 n-7 (Palmitoleinsyre)	1.0 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C17:0 Margarinsyre	0.4 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 17:1 n-7 (Heptadecenoic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C18:0 Stearinsyre (Oktadekansyre)	9.4 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:1 n-9 (Oljesyre)	35.6 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C18:2n-6 (Linosyre) %	29.1 % FA	0.1 10%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:3n-3 (α-Linolensyre) %	2.9 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:3 n-6 (γ-Linolensyre)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 18:4n-3 (Octadecatetraenoic acid) %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:0 (Arakinsyre)	0.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:1 n-9 (Gadoleinsyre)	0.6 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:2n-6 (Eikosadiensyre) %	0.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C20:3n-6 %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:3 n-3	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:4 n-6 (Arakidonsyre)	0.1 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C20:4n-3 %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 20:5n-3 (EPA) %	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:0 (Behensyre)	0.2 % FA	0.1 20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C22:1 (Docosenoic Acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C22:2n-6 (Docosadienoic acid)	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:4 n-6	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:5 n-6	<0.1 % FA	0.1	Internal Method - GC-FID

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1,<50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



c)	LP056	C 22:5 n-3 (Dokosapentaensyre)	<0.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 22:6n-3 (DHA) %	0.1 % FA	0.1	20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 24:0 (Lignoserinsyre)	0.1 % FA	0.1	20%	Internal Method - GC-FID
c)	LP056	C 24:1 n-9 (Tetracosensyre)	<0.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Sum av mettede fettsyrer	28.0 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Enumettede fettsyrer totalt	37.3 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Flerumettede fettsyrer totalt	32.8 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Totale fettsyrer	98.1 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Uidentifiserte komponenter	1.9 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Summen av Omega-6 fettsyrer (kalkulert)	29.5 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Summen av Omega-3 fettsyrer (kalkulert)	3.2 % FA	0.1		Internal Method - GC-FID
c)	LP056	Fatty Acids, Omega6/Omega3 Ratio	9.10	0.1		Internal Method - GC-FID
b) Fosfor mg/kg (For)						
b)	MMF21	Totalt fosfor (P)	4360 mg/kg	20	20%	NS EN ISO 17294-2
b) Jern mg/kg (For)						
b)	MMF27	Jern (Fe)	212 mg/kg	20	25%	NS EN ISO 17294-2
b) Kalium mg/kg (For)						
b)	MMF23	Kalium (K)	6070 mg/kg	60	20%	NS EN ISO 17294-2
b) Kalsium mg/kg i for						
b)	MMF20	Kalsium (Ca)	41100 mg/kg	50	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Kobber mg/kg (For)						
b)	MMF25	Kobber (Cu)	18.5 mg/kg	5	40%	NS EN ISO 17294-2
b) Magnesium mg/kg (For)						
b)	MMF28	Magnesium (Mg)	1580 mg/kg	20	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Mangan mg/kg (For)						
b)	MMF26	Mangan (Mn)	118 mg/kg	1	15%	NS EN ISO 17294-2
b) Natrium mg/kg (For)						
b)	MMF22	Natrium (Na)	1540 mg/kg	20	15%	NS EN ISO 17294-2
c) Protein (Nx6.25) (Kjeldahl)						
c)	LW03S	Protein (Nx6.25)	18.7 g/100 g	0.3	10%	2009/152/EU
c) Råfiber/trevler (Fibertec)						
c)	LP08B	Trevler	5.8 g/100 g	0.5		ISO 5498 mod.
b) Sink mg/kg (For)						
b)	MMF24	Sink (Zn)	92.8 mg/kg	10	40%	NS EN ISO 17294-2
c) Vanninnhold i tørre fôrprodukter						
c)	LW01N	Fuktinnhold	9.07 g/100 g	0.1	10%	2009/152/EU mod.

Merknader:

Energi i kcal/100g er beregnet med utgangspunkt i 9 kcal/g for fett, 4 kcal/g for protein, 4 kcal/g for karbohydrat og 2 kcal/g for kostfiber.

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
 <: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1,<50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.

Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).

**Utførende laboratorium/ Underleverandør:**

- a) Eurofins Steins Laboratorium (Vejen - Vitamin), Ladelundvej 85, DK-6600, Vejen DS EN ISO/IEC 17025 DANAK 222,
- b) Eurofins Environment Testing Norway AS (Moss), Møllebakken 50, NO-1538, Moss NS/EN ISO/IEC 17025:2005 NA TEST 003,
- c) Eurofins Food & Feed Testing Sweden (Lidköping), Box 887, Sjöhogsg. 3, SE-53119, Lidköping ISO/IEC 17025:2005 SWEDAC 1977,
- d) Eurofins Environment Sweden AB (Lidköping), Box 887, Sjöhogsg. 3, SE-53119, Lidköping ISO/IEC 17025:2005 SWEDAC 1125,

Kopi til:

Lina Tveit (tveit.lina@gmail.com)

Moss 27.03.2017

Maria Therese Tjernsbekk

ASM

Tegnforklaring:

* Ikke omfattet av akkrediteringen LOQ: Kvantifiseringsgrense MU: Måleusikkerhet
<: Mindre enn >: Større enn nd: Ikke påvist. Bakteriologiske resultater angitt som <1,<50 e.l. betyr 'ikke påvist'.

Opplysninger om måleusikkerhet og konfidensintervall fås ved henvendelse til laboratoriet.
Rapporten må ikke gjengis, unntatt i sin helhet, uten laboratoriets skriftlige godkjenning. Resultatene gjelder kun for de(n) undersøkte prøven(e).



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway