



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2019 30 stp

Institutt for husdyr- og akvakulturvitenskap (IHA) ved Fakultet for biovitenskap
Birger Svihus

Effekt av UVB lys på vitamin D innholdet i egg, skallkvalitet, skjelettkvalitet og produksjonsresultater

Effects of UVB light on vitamin D content in eggs,
shell quality, bone quality and production results

Martine Louise Nordås

Husdyrvitenskap
Fakultet for biovitenskap

Forord

Helt siden jeg startet på Ås har jeg visst at det var fjørfe jeg ønsket å fordype meg i. Jeg fikk mulighet til å skrive min bacheloroppgave på slaktekylling, hvilket trigget interessen min ytterligere. Da Birger Svihus kom med en forespørsel om noen kunne tenke seg å skrive masteroppgave innenfor fjørfe var det en mulighet jeg ikke kunne la gå fra meg. Temaet i oppgaven var interessant, og da jeg startet forsøkene i mai 2018 viste det seg at jeg hadde en spennende tid i vente. Mastertiden har vært krevende, og samtidig svært lærerik. Jeg har fått et godt innblikk i hvordan man planlegger og utfører praktiske forsøk, samt viktigheten av god planlegging.

Jeg vil rette en stor takk til min veileder, Birger Svihus, for at han introduserte meg for temaet, og for gode innspill og veiledning hele veien. Jeg vil også takke Atle Løvland for stor hjelp med planlegging av fremgangsmåte ved obduksjon av høner, og kjølbainsevaluering. Takk til Nortura som gjorde dette forsøket mulig med økonomisk støtte. Vil rette en spesiell takk til Sverre Rædergård fra Nortura for hjelp med egginnsamling, og Line Mari Sørensen fra Felleskjøpet Fôrutvikling for hjelp med produksjonsresultater. Takk til Moer gård og Ole Egge for fasiliteter og faglige diskusjoner, samt Tor Bernhard Eriksen som har vært med under hele prosessen.

I tillegg vil jeg også takke alle ved LabTek for stor hjelp på laboratoriet. En særlig takk til Elin Follaug Johansen for god veiledning og utførelse av analyser, samt Frank Sundby for bistand til det meste, og mange gode samtaler. Takk til FôrTek for hjelp med knekkstyrketester, og til Henrik Folke Holmberg fra fakultet for realfag og teknologi som bistod med utstyr og utlån av kontoret sitt. En stor takk rettes til Giske Trøan for gjennomlesing og veiledning på oppgaven. Takk til medstudenter og venner, særlig Jenny Kristine Runningen og Mari Molteberg for god hjelp. Tilslutt ønsker jeg å takke familien min for god støtte og mange fine samtaler.

Ås, mai 2019

Martine Louise Nordås

Sammendrag

I dagens samfunn er mangel på vitamin D et problem. Dette problemet kan løses ved å endre innholdet av vitamin D i ulike matvarer. For verpehøns kan vitamin D tilføres via fôret, men det er satt en maksimumsgrense på lovlig mengde tilsetning. Et alternativ er å eksponere hønene for UVB lys. Da vil hønene syntetisere vitamin D₃ via huden, og dette overføres videre til egget.

Det er gjort studier på UVB berikelse på verpehøns, og det er funnet betydelig økning av vitamin D₃ innholdet i eggeplommen. Vitamin D styrer kalsiumhomeostasen, og det kan dermed tenkes at UVB belysning vil kunne ha positiv effekt på skall- og skjelettkvalitet, samt produksjonsresultater.

I denne studien ble det undersøkt effekter av ulike lengder UVB lys på vitamin D₃ innholdet i egg, skallkvalitet og skjelettkvalitet, samt effekt på produksjonsresultater ved UVB lys gjennom hele produksjonsperioden. UVB lyset var plassert under fôrtroa og ble slått på ved fôring. Det var også 54 kontrollhøner som ikke var eksponert for UVB lys. 54 høner var eksponert for 2x30 minutter UVB lys under hele innsettet, fram til dette forsøket startet. Dette forsøket ble utført de siste månedene før avlaving. Fra mai til september ble UVB-hønene eksponert for henholdsvis 2x15 minutter, 2x30 minutter og 4x30 minutter med UVB lys, hvor hver periode varte i fire uker. Egg ble samlet inn i fem omganger, 1) kontrollegg uten UVB belysning, og egg fra høner som var eksponert for UVB lys i 2x30 minutter, 2) 2x15 minutter UVB belysning, 3) 2x30 minutter UVB belysning, 4) 4x30 minutter UVB belysning og 5) 2x30 minutter UVB belysning, og kontrollegg. Studien viste signifikant forskjell i vitamin D₃ innhold mellom de ulike behandlingene, med høyest innhold ved 4x30 minutter, og lavest innhold for kontrollhønene som ikke var eksponert for UVB lys. Det var også signifikant lavere innhold av vitamin D₃ for hønene eksponert for 2x15 minutter UVB lys i forhold til de som hadde fått 2x30 minutter. Det ble funnet signifikante forskjeller mellom kontrollhøner og høner eksponert for UVB lys på noen parametere innenfor skall- og skjelettkvalitet samt for produksjonsresultater for hele perioden.

Resultatene i denne studien viser at det vil være mulig å påvirke vitamin D₃ innholdet i egg ved eksponering for ulike lengder UVB lys. For sikrere resultater angående skall- og skjelettkvalitet samt produksjonsresultater trengs flere gjentak.

Abstract

In today's society, vitamin D deficiency is a problem. This problem could be solved by vitamin D fortified food. Laying hens get vitamin D through the feed, but it has been set a maximum limit of how much is legal to add. One alternative is to expose the hens for UVB light. Then, the hens will synthesise vitamin D₃ in their skin, and this will transfer into the egg.

There have been done studies on UVB light on laying hens, and it is found a significant increase in vitamin D₃ content in the egg yolk. Vitamin D controls the calcium homeostasis, and it has been developed hypothesis that UVB light could have a positive effect on shell and bone quality, in addition to an effect on production results when the hens have been exposed to UVB light during the entire production period.

In this study, we examined effects of different exposure times of UVB irradiation on vitamin D₃ content in egg yolk, shell quality, bone quality and production results. The UVB light where placed at the bottom of the cages under the feed rows and it was turned on during feeding. There were also 54 control hens that where not exposed to UVB light. 54 hens were exposed for 2x30 minutes UVB light during the entire production period, until the start of this study. This study was conducted the last months before they were killed. From May to September, the UVB hens were exposed to 2x15 minutes, 2x30 minutes and 4x30 minutes UVB light, respectively, and each period lasted for 4 weeks. The eggs where collected in five rounds, 1) controls without UVB exposure and eggs from hens that were exposed for 2x30 minutes, 2) 2x15 minutes of exposure, 3) 2x30 minutes of exposure, 4) 4x30 minutes of exposure, 5) 2x30 minutes of exposure and controls. The study demonstrated significant differences in vitamin D₃ content between the different treatments. The highest amount of vitamin D₃ was found for UVB exposure of 4x30 minutes, and the lowest amount was found for the hens that where not exposed for UVB light. It was also significant lower amount of vitamin D₃ in the egg yolk from hens exposed for 2x15 minutes UVB light compared to the ones that were exposed for 2x30 minutes. Significant differences were found on some of the parameters regarding shell quality, bone quality and production results, between controls and hens exposed for UVB light.

The results demonstrated that it is possible to affect the content of vitamin D₃ in egg yolk by different exposure times for UVB irradiation. It is necessary to investigate the shell quality, bone quality and production results further by repeating experiments to be able to make a conclusion.

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
1. Innledning	1
2. Teori	3
2.1 Egget.....	3
2.1.1 Eggets anatomi	3
2.1.2 Dannelsen av egget.....	4
2.1.3 Eggeplommen.....	5
2.2 UV-lys	6
2.3 Vitamin D	7
2.3.1 Metabolisme	7
2.3.2 Påvirkning av vitamin D på kalsiumhomeostase.....	9
2.3.3 Vitamin D ₃ i fôret	11
2.4 Eggeskallet	12
2.4.1 Påvirkning på skallkvalitet	12
2.4.2 Effekt av vitamin D ₃ på skallkvalitet.....	13
2.5 Skjelettkvalitet.....	14
2.6 Kjølbein.....	15
3. Materiale og metode	17
3.1 UVB-lys.....	17
3.2 D-vitaminanalyser	18
3.2.1 Innsamling av egg.....	18
3.2.2 Skilling av eggeplommer.....	19
3.2.3 Prøvepreparering av eggeplomme og forsåpning	19
3.2.4 Ekstraksjon	19
3.2.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	21
3.3 Skallkvalitet.....	22
3.3.1 Knekkstyrke.....	22
3.3.2 Skalltykkelse	22
3.3.3 Prosent eggeskall.....	23
3.4 Skjelettkvalitet.....	23
3.4.1 Tibia.....	23
3.4.2 Kjølbeinsskader	24
3.5 Produksjonsresultater	25
3.6 Statistikk.....	25

4. Resultater	27
4.1 Vitamin D ₃	27
4.1.1 Effekt av ulike tidsintervaller av UVB lys	27
4.1.2 Signifikante forskjeller ved behandling.....	28
4.1.3 Forskjellen mellom minimum og maksimum vitamin D ₃ innhold i egg i periodene	29
4.1.4 Variasjonen mellom bur med UVB bestråling	29
4.1.5 Standardavvik og forskjell mellom minimum og maksimum nivåer innad i burene.....	30
4.2 Skallkvalitet.....	32
4.2.2 Eggvekt.....	32
4.2.3 Effekt av UVB belysning på egg- og skallkvalitet	32
4.3 Effekt av UVB bestråling på tibia og kjølbein	33
4.3.2 Effekt av UVB på tibia	33
4.3.3 Kjølbeinsskader	34
4.3.3.1 Gradering av skjevhet og brudd	35
4.4 Produksjonsresultater	36
4.4.1 Verpeprosent	36
4.4.2 Eggvekt.....	37
4.4.3 Eggmasse.....	38
4.4.4 Fôropptak.....	39
4.4.5 Vannopptak	40
4.4.6 Dødelighet	41
4.4.7 Klinkegg	42
4.4.8 Knekkegg.....	43
5. Diskusjon.....	44
5.1 Vitamin D ₃ respons på ulike tidsintervall av UVB lys	44
5.2 Skallkvalitet.....	48
5.3 Skjelettkvalitet.....	50
5.4 Produksjonsresultater	51
6. Konklusjon.....	53
7. Referanser	54
Vedlegg	
Vedlegg 1: Standardisert metode for å skille eggeplomme fra eggehvite	
Vedlegg 2: Prosedyre – analysering av vitamin D ₃	

1. Innledning

I dagens eggproduksjon er målet å produsere næringsrike egg, med god skallkvalitet på en effektiv og bærekraftig måte. Egg er en god kilde for flere næringsstoffer, blant annet protein, lipider og de fleste vitaminene, hvilket gjør det til en viktig del av et variert kosthold. Fjørfe er i dag svært effektive matprodusenter og med en stadig økende verdensbefolkning fører dette til et økende behov for mat. Høner i eggproduksjon blir kjønnsmodne rundt 18-24 ukers alder, og etter dette legger hønene omtrent ett egg om dagen. Dette gjør høner til det landlevende husdyret som er mest effektiv med tanke på å gjøre om fôrressurser til produkt (Bagley, 2016). Et av næringsstoffene det er vanskeligheter med å få et tilstrekkelig inntak av i Norge i dag er vitamin D. Fet fisk, sopp og egg er gode kilder, i tillegg til sollys. I og med at sollys er svært sesongbetont i Norge, vil befolkningen være avhengig av å få tilført vitamin D gjennom kosten i vintermånedene.

I tillegg til fokus på høyt næringsinnhold i egg, er skallkvaliteten et svært viktig parameter i eggproduksjonen. Skallet skal være ugjennomtrengelig for bakterier, og sterkt nok til å tåle behandlingen under håndtering, pakking og transport. Hovedbestanddelen i eggeskallet er kalsium, som høna kan hente fra enten fôret eller fra skjelettet. Dermed er det svært viktig med tilstrekkelig kalsiuminnhold i fôret, for at høna skal opprettholde god skallkvalitet og unngå å utvikle ulike skjelettproblemer, som TB (tibial dyschondroplasia) og osteoporose. Skjelettets kvalitet er også en viktig faktor, både dyrevelferdsmessig og i forhold til produksjonsresultater (M. Nasr, Murrell, & Nicol, 2013). Kalsiumhomeostasen styres hovedsakelig av vitamin D₃, hvilket gjør vitamin D₃ til en vel så viktig bestanddel i fôret. Eksponering for sollys setter i gang en prosess som fører til syntese av vitamin D₃ fra 7-dehydrokolesterol i huden. Tidligere er det gjort forsøk på UV berikelse på verpehøner som har vist økt vitamin D₃ innhold i egget (Kühn et al., 2015; Kühn, Schutkowski, Kluge, Hirche, & Stangl, 2014). Det har også vært viktig å finne ut om UV lys påvirker hønene på andre måter.

I denne oppgaven skal jeg teste eksponering av UVB lys på verpehøns med ulike tidsintervaller, og dets effekt på vitamin D₃ innholdet i egg, skallkvalitet, skjelettets kvalitet samt effekt av UVB lys gjennom hele produksjonsperioden på produksjonsresultater.

Hypotesene jeg skal teste i denne oppgaven er:

1. Vitamin D₃ innholdet i egg vil øke med økt intensitet av UVB-lys
2. UVB lyset vil ha positiv effekt på skallkvalitet, skjelettkvalitet og produksjonsresultater

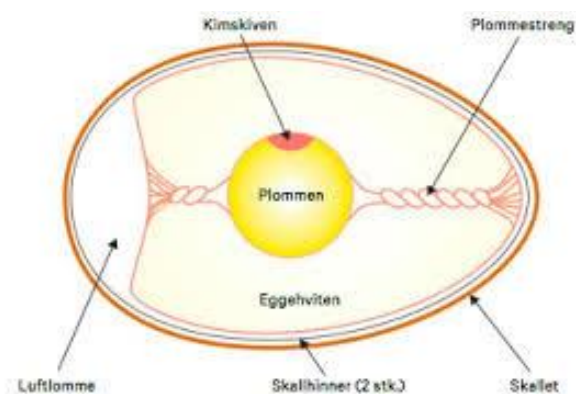
2. Teori

2.1 Egget

Egget er en stor del av det norske kostholdet, og inneholder mange av næringsstoffene vi trenger, blant annet rundt 0,3 % karbohydrater, 10 % fett og 12 % protein. I tillegg er det rikt på vitaminer og mineraler, hvor vitamin C er det eneste vitaminet vi ikke finner i egg. Selve egget veier mellom 50-70 g, hvor ca. 10 % av vekten er eggeskall, 60 % er hvite og 30 % er plomme (Bagley, 2016).

2.1.1 Eggets anatomi

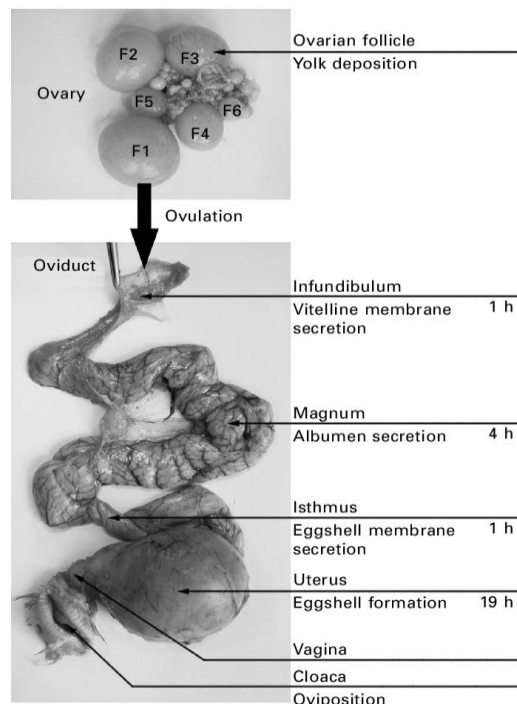
I midten av egget finner vi eggeplommen. Den er omringet av vitellinmembranen, som skal holde materiale fra plomme og hvite adskilt. Som illustrert i figur 1, ligger kimskiven på plommens overside og består av en del eggstokkceller som har fulgt med under egglosning, og er kjernen til eggcellen (Bagley, 2016). Rundt eggeplommen ligger eggehviten. Eggehvite består av proteinet albumin, og er delt inn i to lag. Nær plommen er hviten fast, mens i området rundt er den tynnere. Dette kommer av at proteinmolekylene er noe forskjellig bundet sammen. Utover i verpesyklusen vil den faste andelen av eggehviten øke, mens ved lagring vil den tynne delen av hviten øke. Plommen holdes i midten av egget ved hjelp av to plommestrenger som strekker seg fra plommen og ut til polene av skallet (Yves Nys, Bain, & Van Immerseel, 2011). Rett innenfor skallet ligger to hinner som er i kontakt med hverandre med unntak av i den butte enden av egget. Her dannes en luftlomme som kyllingen ligger nært inntil ved fosterutviklingen. Selve eggeskallet kan bestå av opptil fem lag, og overflaten er dekket av et tynt fett- og proteinlag som beskytter mot uttørking og mikroorganismer.



Figur 1: Eggets anatomi (Bagley, 2016)

2.1.2 Dannelsen av egget

I figur 2 vises en hønes kjønnsorgan. Dette består av eggstokk (ovarium), eggledertrakt (infundibulum), magnum, eggpasset (isthmus), skallkjertel (uterus) og vagina. Eggstokken, i interaksjon med hypofysen, kontrollerer eggdannelsen ved å sørge for sekresjon av steroid- og hypofysehormoner. Leveren produserer plommestoff som transporteres via blodet og til eggstokken. Under kjønnsmodning samler eggcellene store mengder av dette plommestoffet, og eggstokkvevet rundt eggcellene vil til slutt revne. Eggstokkvevet består av blodkar, og i tilfeller hvor disse blodkarene revner kan eggeplommen få blodflekker (Bagley, 2016). Eggcellen går deretter videre til eggledertrakten (infundibulum), som fanger opp eggcellen slik at den ikke faller ut i bukholen. Det er kun i øverste del av eggledertrakten at befruktning kan foregå. Her avleires også eggehvite i nedre del. Videre i magnum fortsetter avleiringen av eggehvite. Eggehvite produseres og lagres i kjertler i veggen til eggeplommen ankommer. Da vil stoffet frigjøres over plommen. I neste del, eggpasset (isthmus), dannes siste del av eggehviten i tillegg til skallhinnen. Det lengste oppholdsstedet til egget er i skallkjertelen, her dannes skallet. De første timene pumper kjertelen vann og salter inn i eggehviten, noe som får hviten til å svulle. Når skallet dannes blir det lagt på kalsium som kan komme fra føret og eget skjelett. Nederste del av kjønnsorganet er vagina, og brukes kun til å frakte egget raskt ut ved egglegging. Verpehyppigheten reduseres med alder, mens plommestoffproduksjonen, hvite- og skallmengde holder seg relativt konstant. I og med at det blir lagt færre egg vil andelen plomme per egg øke, og det blir større egg mot slutten av verpeperioden, gjerne med svakere skall (Bagley, 2016).



Figur 2: Kjønnsgorganet hos ei høne i produksjon. Bildet viser fasene i eggproduksjonen og varigheten er anslått ved hver fase. (Y Nys & Guyot, 2011)

2.1.3 Eggeplommen

Eggeplommen består av rundt 33 % lipider, 17 % protein, 48 % vann og 2 % av ulike mineraler. Denne sammensetningen er noenlunde konstant mellom hønene. Den største andelen av lipidene i plommen er triglyserider (65%), mens fosfolipider og kolesterol finnes i mindre mengder. Alt innhold av lipider i egget befinner seg i eggeplommen og er bundet til proteiner i form av lipoproteiner (Yves Nys et al., 2011). Disse lipoproteinene dannes i leveren, og transporteres videre til eggstokken via blodet, i form av forløperne, vitellogenin og very low density lipoprotein (VLDL). Det er kun 0,7-1 % karbohydrater i eggeplommen, og av dette er rundt 0,3 % fri glukose. Andre karbohydrater bindes til proteiner (glykoproteiner) eller til lipider (glykolipider). Plommen inneholder alle de fettløselige vitaminene i egget, og har høye verdier av de vannløselige vitaminene sammenlignet med eggehviten.

Den oransje fargen på plommen kommer av akkumulering av karotenoider. Karotenoidene blir overført til egget fra det høna spiser, og den lagrer fortrinnsvis xantofyll (karotenoider med en hydroksylgruppe) i kroppsfettet og i lipidene i eggeplommen (Yves Nys et al., 2011).

2.2 UV-lys

UV-lys er en del av det elektromagnetisk strålingsspekteret som ligger mellom 100-400 nm og er inndelt i tre typer etter bølgelengde: UVA (315-400), som ligger rett under synlig lys, UVB (280-315 nm), og UVC (100-280 nm), noen ganger kalt bakteriedrepende/antibakteriell UV (UIO, 2019). Elektromagnetisk strålingsenergi måles i watt (W), og UV-lys måles med et radiometer. Den vanlige måleenheten er mW/m^2 (Lewis & Gous, 2009). Alle former for UV lys sendes ut fra solen, men det meste av UV lyset som når jorda er UVA. Lys med bølgelengder kortere enn 290 nm når aldri ned til jordoverflaten, og dermed blir UVC og mye av UVB stoppet av ozonlaget. Ordinært vindusglass er delvis gjennomtrengelig for UVA, men er så å si ugjennomtrengelig for UVB (lys med bølgelengder under 300 nm).

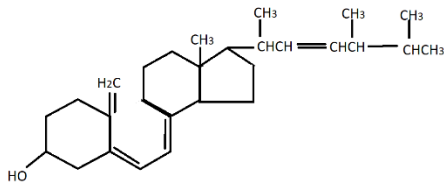
Fjørfe har fire typer tapper i netthinnen, i motsetning til mennesker, som har tre. Tappene er fargereseptorene på øyet, og denne ekstra tappen gjør det mulig for fjørfe å se UVA-lys. Retinal mottakelse av bølgelengder mellom 350 og 780 nm gjør at fuglen kan se og regulere ulike atferdsaktiviteter. Lyset påvirker blant annet etablering og vedlikehold av sosiale hierarkier, fôringsaktivitet og valg av parringspartner. Lys påvirker hovedsakelig vekst, særlig under de første tre ukene, via en indirekte effekt på fôringsaktivitet. Lenger lysperioder er assosiert med høyere fôrinntak (Lewis & Gous, 2009).

UVA og UVB induserer syntese av kolekalsiferol (vitamin D₃) fra 7-dehydrokolesterol i huden, men det kan også (hovedsakelig UVB) skade kollagenfibre, ødelegge vitamin A i huden, føre til solbrenthet, og initiere molekylære endringer som kan føre til hudkreft.

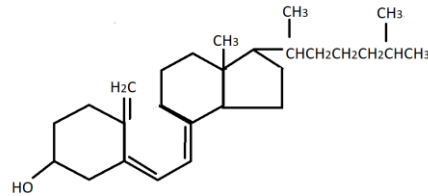
I et forsøk gjort av Lupu og Robins (2013) undersøkte de endret atferd og helseproblemer hos undulater ved UVB-eksponering ved bredspektret og smalspektret UVB-lys. Bredspektret tar for seg hele spekteret som omfatter UVB, mens ved smalspektret anvendes en gitt UVB lengde. De fant at fuglene kunne eksponeres for $<150\text{-}300 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ for bredspektret UVB lys, og $>1730 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ for smalspektret UVB uten å forårsake skade.

2.3 Vitamin D

De to viktigste formene av vitamin D er D₂ (ergokalsiferol) og D₃ (kolekalsiferol).



Vitamin D₂ (ergokalsiferol)



Vitamin D₃ (kolekalsiferol)

Vitamin D er et fettløselig vitamin, sammen med vitamin A, E og K. De kan lagres i lever og fettvev, noe som gjør at dyret kan overleve i perioder uten inntak av disse vitaminene. For høyt inntak av disse vitaminene, særlig vitamin A og D, kan ha en toksisk effekt. Overflødig eksponering for sollys degraderer previtamin D₃, samt vitamin D₃ til inaktive komponenter. Fordi alt overflødig previtamin D₃ og vitamin D₃ ødelegges av sollys, vil ikke for mye eksponering for sollys føre til vitamin D₃ toksisitet. Både vitamin D₂ og vitamin D₃ er mer resistent for oksidasjon enn vitamin A, mens vitamin D₃ er mer stabil enn D₂ (McDonald et al., 2011).

Hovedkilden til vitamin D for mennesker er via sollys, og den påvirkningen UV-stråler har på omdannelsen av 7-dehydrokolesterol i huden. Tilgangen på sollys er svært avhengig av sesong og hvor man befinner seg i verden. I tillegg ser man tendenser til økt innendørsaktivitet. Mat som kilde for vitamin D er i motsetning til sollys tilgjengelig året rundt. Fet fisk, som laks og makrell, er en av de viktigste kildene til vitamin D. I tillegg er sopp en god kilde (Kühn et al., 2014). Når fugler føres med for lite vitamin D₃, påvirkes vekst positivt av UVA og UVB stråler gjennom vitamin D₃ syntese i huden (Lewis & Gous, 2009).

2.3.1 Metabolisme

Det er to kilder til vitamin D, via UV-stråler, og via maten. Metabolismen av vitamin D₃ er illustrert i figur 3.

Sterolene ergosterol og 7-dehydrokolesterol er forløperne til vitamin D₂ og vitamin D₃. 7-dehydrokolesterol omdannes til pre-vitamin D₃, og ergosterol omdannes til previtamin D₂. Previtaminene har ingen verdi for dyret før det er omgjort til kalsiferol. Omdannelsen krever

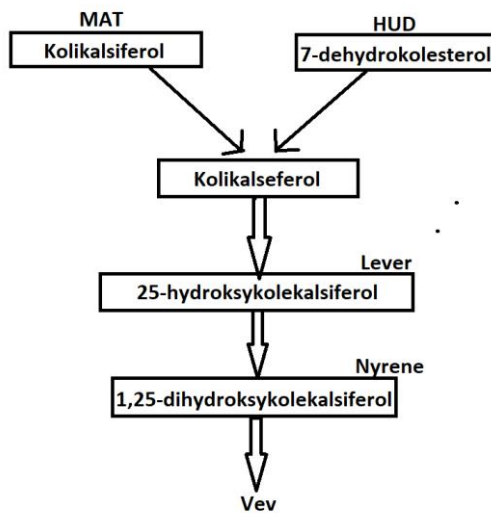
en viss mengde energi til sterolmolekylet for å kunne skje. Dette kan blant annet oppnås ved ultrafiolett lys fra sola eller kunstig stråling. Aktivering er mest effektiv ved lys med bølglengde på 290-315 nm (McDonald et al., 2011). I og med at det er lite UV-lys som slipper inn gjennom normale vindusglass, vil dette ha en svært liten effekt på husdyr som holdes innendørs.

Vitamin D₂ og D₃ fra maten absorberes fra tynntarmen og transporteres via blodet til leveren. Her konverteres de til 25-hydroksykolekalsiferol. Det blir videre transportert i denne formen til nyrene, og konverteres videre til 1,25-dihydroksykolekalsiferol. Dette er den biologiske mest aktive formen av vitaminet.

Når UVB-lys treffer huden vil det føre til en omgjøring av 7-dehydrokolesterol til previtamin D₃. Ved en temperaturavhengig isomerisering transformeres previtamin D₃ til vitamin D₃ (kolekalsiferol) (Lupu & Robins, 2013). Kolekalsiferol binder seg til et vitamin D-bindende protein (VDBP), og vil enten lagres i denne formen i fett, eller transporteres via blodet til leveren (Holick, 2007). I leveren skjer det en hydroksylering av kolekalsiferol, ved hjelp av leverenzymet, 25-hydroxylase. Dermed dannes det 25-hydroksykolekalsiferol (25(OH)D₃). Det skjer en ny hydroksylering i nyrene, her ved hjelp av 1- α -hydroxylase. Dermed blir 25(OH)D₃ omdannet til den aktive formen av vitamin D₃, 1,25(OH)D₃ (Proszkowiec-Weglarz & Angel, 2013). 1,25(OH)₂D₃ regnes for å være den aktive metabolitten, men forløperen 25(OH)D₃ absorberes fra maten, og har trolig metabolske effekter i regulering av cellevekst, og kalsiummetabolismen (Jakobsen, Clausen, Leth, & Ovesen, 2004). Det er 25(OH)D₃ som regnes som mest verdifull med tanke på å bestemme vitamin D status. Det kommer av at 25(OH)D₃ er assosiert med VDBP, og at mengde 25(OH)D₃ er stabilt i blodet (Spiro & Buttriss, 2014). Høner kan produsere to typer vitaminbindende proteiner, en som kan transportere vitamin D₃, og en som kan transportere 25(OH)D₃ (Lewis & Gous, 2009).

Tian *et al.* (1994) undersøkte kapasitet til å generere vitamin D₃ i kyllinghud, og målte dermed konsentrasjoner av 7-dehydrokolesterol i ulike hudområder. Den høyeste konsentrasjonen fant de i huden på bena til kyllingene, 30 ganger høyere enn i huden på ryggen. Da de utsatte kyllingene for belysning av hele kroppen, fant de produksjon av previtamin D₃ i huden på ben og føtter, men ikke på ryggen (Tian, Chen, Lu, Shao, & Holick, 1994).

Et forsøk gjort av Kühn *et al.* (2014) viste at UVB-stråling økte vitamin D-innholdet i egg i høyere grad enn ved å bruke maksimum lovlig mengde vitamin D₃ i fôret.



Figur 3: Vitamin D-metabolisme

2.3.2 Påvirkning av vitamin D på kalsiumhomeostase

Den fundamentale rollen til vitamin D i kroppen er å regulere kalsium, styre opptaket fra fôret, samt lagring og frigjøring av kalsium fra bein. I tillegg styres også fosforhomeostasen av vitamin D (Jakobsen *et al.*, 2004). Kalsiummetabolismen er illustrert i figur 4. Funksjonen i forhold til kalsiumhomeostase er å øke kalsiumabsorpsjonen fra tarmene. 1,25(OH)₂D₃ forsterker kalsiumabsorpsjon i tyntarmen ved å reagere med et vitamin D reseptor-retinoid X reseptor-kompleks (VDR-RXR). Dette stimulerer kalsiumkanaler og calbindin, et kalsiumbindende protein (CaBP) (Holick, 2007).

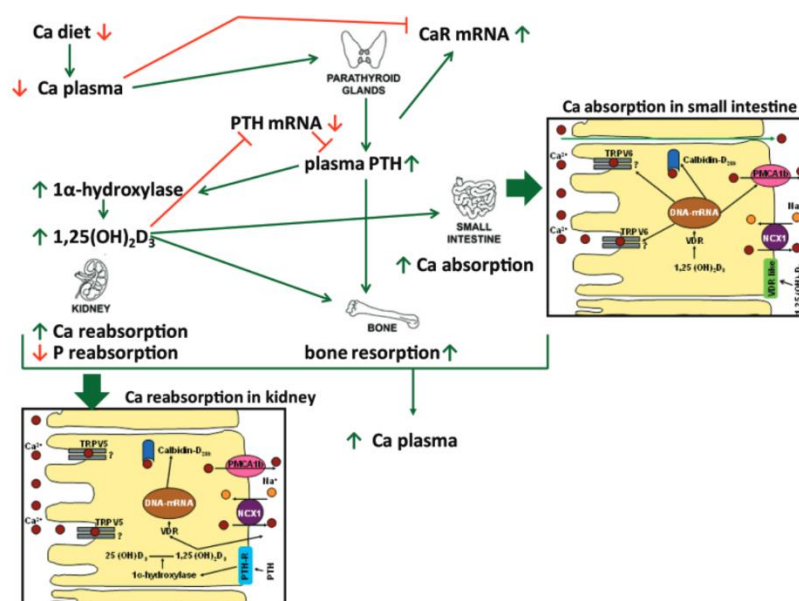
VDR er satt sammen av to ulike proteiner, og omfatter to ulike domener. Det er en N-terminal som fungerer som et DNA-bindingsdomene og en C-terminal som fungerer som et ligand-bindingsdomene (Pike & Meyer, 2012). Etter at 1,25(OH)₂D₃ har diffundert inn i cellene reagerer hormonet med enten cytoplasmisk eller nukleær VDR, og danner heterodimere med retinoid X reseptor (RXR) som binder seg til en spesifikk DNA-sekvens (Proszkowiec-Weglarz & Angel, 2013).

Den aktive formen av vitamin D₃ (25(OH)D₃) styrer kalsiumhomeostasen via feedback hemming av parathyreoideahormon (PTH)-produksjon i biskjoldbruskkjertelen (Pike, Zella, Meyer, Fretz, & Kim, 2007).

PTH responderer på både kortsiktige og langsiktige endringer i kalsium-konsentrasjonen. Hormonet stimulerer konversjonen av vitamin D₃ til 1,25(OH)₂D₃, som igjen øker tarmabsorpsjon av kalsium. Aktivering av vitamin D₃ avhenger dermed av kalsiumkonsentrasjoner i plasma. Hvis kalsiumkonsentrasjonen er lav, blir 1 α -hydroksylase i nyrene aktivert og den aktive formen av vitamin D₃, syntetiseres. 1,25(OH)₂D₃ vil igjen føre til frigjøring av PTH. Hvis kalsiumkonsentrasjonen er tilstrekkelig, vil 25(OH)D₃ gjennomgå 24-hydroksylering til den inaktive metabolitten 25,24(OH)₂D₃ i nyrene (Jones, Strugnell, & DeLUCA, 1998). 24-hydroksylase er et enzym som fremmer degradering av 1,25(OH)₂D₃ (Jones, Prosser, & Kaufmann, 2012). 1,25(OH)₂D₃ kontrollerer også dets egen produksjon ved å hemme 1 α -hydroksylase i nyrene og stimulere 24-hydroksylase. 1,25(OH)₂D₃ kan stimulere 24-hydroksylase til økt katabolisme for vitamin D₃ til vann-løselig, biologisk inaktiv kalsitroinsyre, som utskilles i galle.

Mangel på vitamin D senker konsentrasjonen av retinal PTH reseptor og dets aktivitet. 1,25(OH)₂D₃ har også reseptorer i osteoblastene, og er en viktig faktor for utvikling og opprettholdelse av mineraliseringen av skjelettet. Når 1,25(OH)₂D₃ blir gjenkjent av reseptorene, fører det til økt aktivering av reseptorer for nukleær faktor-kappa β ligand (RANKL). Reseptoren, RANK, binder RANKL og fører til utviklingen av modne osteoklaster. Osteoklastene bryter ned benvev ved å fjerne kalsium og fosfor fra benet, slik at kalsium- og fosforkonsentrasjonene opprettholdes i blodet. Omvendt, tilstrekkelig kalsium- og fosforkonsentrasjon i blodet fører til økt mineralisering av skjelettet (Holick, 2007).

Transcellulær kalsiumtransport omfatter trolig tre 1,25(OH)₂D₃-regulerte steg; 1) transport av kalsium fra tarmlumen over «brush border» membranen, 2) transcellulær transport av kalsium gjennom enterocyttenes cytosol og 3) ATPase pumper for transport av kalsium på den basolaterale membranen (Christakos, 2012)



Figur 4: Kalsiummetabolisme i verpehøns (Proszkowiec-Weglarz & Angel, 2013)

2.3.3 Vitamin D₃ i fôret

Det er satt en maksimumsgrense for hvor mye vitamin D det er lov å tilsette i fôret til husdyr. Norge følger Den europeiske myndighet for næringsmiddeltrygghet (EFSA), da vi er en del av det europeiske økonomiske samarbeidsområdet (EØS). For fjørfe ble maksimumsgrensen for vitamin D tilsetning i fôret endret i 2017 fra 3000 internasjonale enheter (IE) til 3200 IE vitamin D₃ per kg fôr (Regjeringen, 2017). Dette tilsvarer 80 µg per kg fôr. Grunnen til dette maksimumsnivået er de toksiske egenskapene vitamin D kan få ved for store mengder.

Vitamin D₃ kan delvis eller helt erstattes med 25(OH)D₃ i hønsefôr, men 25(OH)D₃ er toksisk i høyere grad enn vitamin D₃ (P. H. Mattila, Valkonen, & Valaja, 2011). Mattila *et al.* (2004) tilsatte mengder opp til 15 000 IE vitamin D₃ i fôret til verpehøns, og fant ingen negative påvirkninger på hønene. Det er i flere forsøk funnet signifikant effekt av vitamin D₃ tilsetninger på vitamin D₃ innholdet i egg (P. Mattila, Lehikoinen, Kiiskinen, & Piironen, 1999; P. Mattila, Valaja, Rossow, Venäläinen, & Tupasela, 2004).

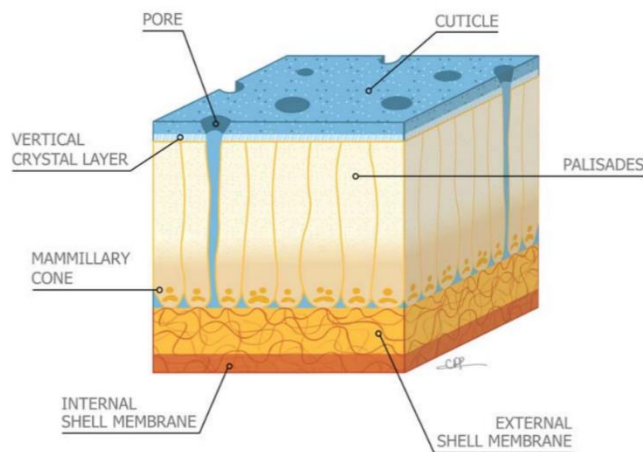
Fjørfe som holdes innendørs er avhengig av vitamin D supplement via fôret, og dersom kalsium og/eller fosfornivåene er for lave, eller forholdet mellom dem ikke er optimal, øker behovet for vitamin D.

2.4 Eggeskallet

Eggeskallet utgjør ca. 9-12 % av egget, og består av flere lag som illustrert i figur 5. De to skallhinnene omtalt i avsnitt 1.1, dannes i eggpasset (isthmus), mens selve skallet dannes i skallkjertelen (uterus). Skallet har en innviklet struktur, og det er en omfattende dannelsesprosess på omtrent 15 timer, og skjer ofte om natten. Omtrent 2-2,5 g kalsium legges på skallet i denne perioden (Bagley, 2016).

Innerst finner vi den ytre og den indre skallhinnen. Disse har porer, og består av keratinfibre dekket av et slimlignende stoff. Det innerste laget av selve skallet betegnes som mammillarlaget. Mammillarlaget er utformet som halvmåneformede knotter, med kjerner av organisk materiale. Disse kjernene er hovedsakelig protein, og den ytre skallhinnen er festet i mammillarlaget via fibre gjennom disse kjernene. Videre går mammillarlaget over i et kompakt, kalkholdig lag, svamplaget (palisade layer). Kanaler gjennom svamplaget og ut til eggets overflate sørger for gassutveksling mellom egget og omgivelsene. Det ytterste laget av skallet betegnes som kutikula, og består av organisk materiale (Åbro, 2009). Dette laget skal hindre innvandring av mikroorganismer og uttørking av egget (Bagley, 2016).

De kalkholdige lagene inneholder hovedsakelig kalsiumkarbonatkrystaller (90-95 %).



Figur 5: De ulike lagene av skallet (Hincke et al., 2012)

2.4.1 Påvirkning på skallkvalitet

Å opprettholde god skallkvalitet er av stor viktighet for industrien. Skallet beskytter embryoet, og gjør at det kan utvikles, samt at det har en økonomisk betydning med tanke på tap av egg i produksjonen. Kvaliteten kan blant annet måles ved å se på eggstørrelse, farge på

skallet, knekkstyrke, deformasjoner, skallvekt, skallprosent og skalltykkelse. Skalltykkelse avhenger blant annet av hvor lenge egget oppholder seg i skallkjertelen (uterus), og hvor mye kalsium som kommer til under skaldannelsen. Faktorer som kan påvirke skallkvaliteten kan være hønas alder, sykdom, faktorer ved fôret som f.eks. kalsium, fosfor og vitaminer eller kontaminert fôr, samt management. Det er funnet at varmessress og høye temperaturer kan føre til redusert fôrinntak og nedsatt evne til å ta opp kalsium fra blodet til skallformasjon (Roberts, 2004).

Resultater fra Bar *et al.* (1987) tilsa at for eldre høner reduseres evnen til å tilpasses endringer i kalsiuminntak eller –behov via mekanismer som involverer endringer av vitamin D metabolismen (Arie Bar & Hurwitz, 1987). Høner kan i tilfeller utsettes for faktorer som reduserer fôrinntak, og derfor kalsiuminntaket. Disse faktorene, kombinert med mangel på adaptiv evne hos eldre høner, kan resultere i midlertidig kalsiummangel, som videre kan føre til en høyere andel av egg med dårlig skallkvalitet (Arie Bar & Hurwitz, 1987). Det er derfor særlig viktig for eldre høner, med et økende kalsiuminntak utover i innsettet for å opprettholde benmineraliseringen, og for at vitamin D metabolismen skal fungere optimalt. Kalsium og vitamin D (på grunn av påvirkning på kalsiumhomeostasen) er svært viktige bestanddeler i fôret til høna. Det kan tilføres direkte fra duodenum og jejunum, eller indirekte fra «medullary bone» via en skjelettoresorpsjonsprosess til skallet. Dersom det er lite kalsium tilgjengelig via fôret, og dermed mye kalsium som må brukes fra skjelettet i produksjon av eggskall, vil skallkvaliteten være lavere (Almeida Paz & Bruno, 2006).

2.4.2 Effekt av vitamin D₃ på skallkvalitet

Verping og kalsifisering av skallet fører til ekstra behov for kalsium hos verpehøner. Kalsium tilsvarende omtrent 10 % av det totale kalsiuminnholdet i ben sekreseres daglig til skaldannelse (A Bar, Razaphkovsky, & Vax, 2002). Kalsiumet kan komme fra fôret eller hønen selv (eget skjelett). Dette fører til økt vitamin D-behov, på grunn av påvirkningen vitamin D har på homeostase av kalsium. Ei høne som produserer egg har behov for 25 % mer kalsium enn en som ikke legger egg. Hvis kalsiumet i fôret er utilstrekkelig eller utilgjengelig blir det tatt fra skjelettet i stedet, og over lengre tid kan den bli beinskjør (Bagley, 2016).

En rekke proteiner i tarmer og ben uttrykkes i målorganer via mekanismer som involverer vitamin D-reseptor. Noen av disse proteinene er også funnet i skallkjertelen (uterus). Grunnet stort behov for kalsium i eggskallet har de svært effektive mekanismer for kalsiumtransport fra fôret til skallet. I denne prosessen er det hormonene, 1,25(OH)₂D₃ og PTH som er

involvert. Ingen av hormonene er funnet å påvirke kalsiumtransporten i skallkjertelen direkte, men vitamin D avhengige proteiner er tilstede og modifiseres i skallkjertelen under egglegging (Arie Bar, 2008).

Tarmlumen tømmer seg omtrent helt for kalsium etter lyset slås av i kommersielle flokker. Kalsifiseringen av skallet skjer gjerne også i denne perioden, og dermed vil en stor del av kalsifiseringen skje mens det er lite kalsium i tarm fra fôret. To mekanismer settes da i gang; 1) økning av nettoabsorpsjon av kalsium i mørkeperioden, 2) aktivering av resorpsjon av bein, hovedsakelig fra «medullary bone» (MB). «Medullary bone» er funnet i beina hos kjønnsmodne hunnfugler, og fungerer som en kalsiumkilde (Arie Bar, 2008). Resorpsjon av skjelettet kan minimaliseres ved store partikler i fôret, da dette tar lenger tid å fordøye, slik at det øker kalsiumtilgjengeligheten fra tarmene om natten (Mendes et al., 2006). Når lyset kommer på vil absorpsjon fra tarmene igjen være mulig grunnet nytt kalsiuminntak, og kalsiumet i ben vil gjenopprettes.

2.5 Skjelettkvalitet

Skjelettstrukturen hos verpehøns blir fullt utviklet under perioden før produksjonsstart. Den uorganiske delen av knoklene består av hydroksyapatitt, som er en krystallinsk form av kalsiumfosfat, og fører til at knoklene blir harde. Den organiske delen består av kollagen type I, som er strekkfaste proteinfibre.

Det er flere ulike typer knokler. Hovedtypene er kortikal- og trabekulærbein, som begge er av typen lamellær bein. Disse bentyperne formes under vekstperioden (Whitehead & Fleming, 2000). Ved kjønnsmodning vil østrogen føre til dannelse av «medullary bone» i marginen i noen ben. Det finnes blant annet i tibia, femur og kjølbeinet (Hester, 2017), og gir lite struktur, men fungerer som kalsiumkilde. Omtrent 98 % kalsium er lagret i skjelettet som hydroksyapatitt, mens resterende kalsium er lokalisert i ekstracellulær væske, i plasma og i celler (Veum, 2010).

På innsiden av ben finnes ulike typer celler. Osteoklaster som bryter ned ben, samt osteoblaster som bygger opp ben og senere endrer form til osteocytter. Etter at benet er ferdig utviklet, gjennomgår det en kontinuerlig prosess av nedbryting og gjenoppbygging.

Osteoklastene resorberer deler av benet og blir deretter erstattet av osteoblaster som danner nytt ben. Dersom det skulle være en ubalanse mellom disse prosessene kan det føre til osteoporose (benskjørhet) (Whitehead & Fleming, 2000).

I et forsøk utført av Taylor *et al.* (1954) fant de at osteoklastaktiviteten i «medullary bone» ble opprettholdt i 7 dager når hønene gikk på fôr med manglende kalsium (Taylor & Moore,

1954). Andelen av «medullary bone» (MB) i skjelettet øker ved egglegging med fôr uten tilstrekkelig kalsium, fordi resten av skjelettet tømmer seg slik at MB skal kunne opprettholdes (Dacke et al., 1993). Fordi vitamin D fremmer kalsiumhomeostase, er det viktig med nok vitamin D og kalsium i fôret. For barn kan vitamin D mangel føre til for dårlig mineralisering av bein, og føre til rakitt. For voksne øker vitamin D mangel risikoen for benskjørhet og brudd. (P. H. Mattila et al., 2011).

2.6 Kjølbein

Kjølbeinet (*sternum*), eller brystbeinet, bærer en kraftig kjøl i midtlinjen som en forsterkelse. Det ligger ventralt for hjertet, og er en kobling for muskelfestet til flygemusklene. I og med at høner ikke flyr er størrelsen på kjølen redusert (Bagley, 2016).

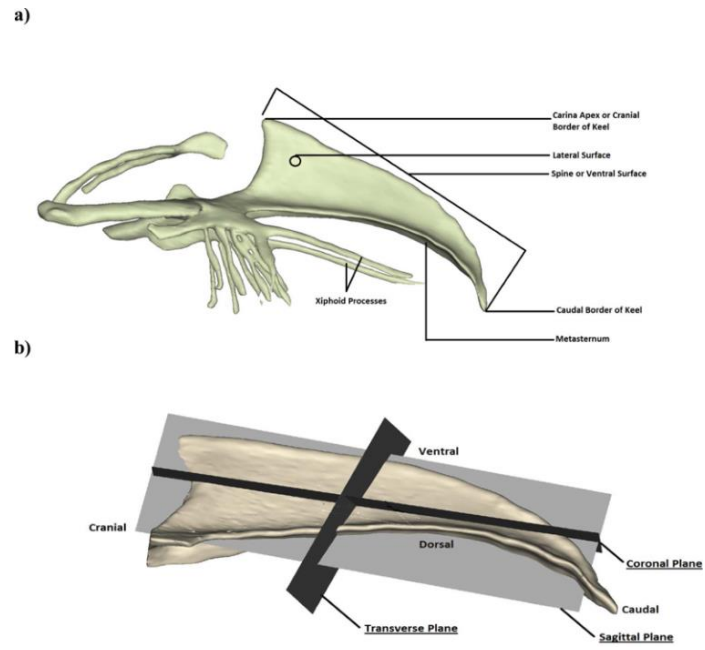
Kjølbeinsskader kan deles inn i to kategorier, brudd og avvik (Casey-Trott et al., 2015).

Brudd karakteriseres av skarpe svingninger, kutt og/eller fragmenterte områder på kjølbeinet. Brudd kan oppstå mellom den ventrale og dorsale overflaten, mellom cranial og caudal, eller en kombinasjon. Disse områdene er illustrert i figur 6. Brudd kjennetegnes oftest ved fortykninger i den ventrale eller laterale overflaten, grunnet helingsprosessen etter bruddet. Dersom kjølbeinet er S-formet, eller har annen type svingning som gjør at midtlinjens form avviker fra en rett linje, vil det betegnes som avvik (Casey-Trott et al., 2015).

Verpehøner med kjølbeinsskader viser redusert mobilitet, og dermed potensielt redusert evne til utførelse av naturlig atferd som flaksing og vagling. Kjølbeinet er svært utsatt for skader grunnet den anatomiske plasseringen (Riber, Casey-Trott, & Herskin, 2018).

Frittgående høns er assosiert med høyere andel kjølbeinsskader (M. A. Nasr, Nicol, & Murrell, 2012). Wilkins *et al.* (2011) fant at utbredelsen av kjølbeinsskader i bur var 36 % mot 86 % i frittgående systemer (Wilkins et al., 2011). I et forsøk utført av Gregory *et al.* (1996) ble det vist at kjølbeinet var et av de vanligste benene å skade (Gregory & Wilkins, 1996).

Nasr *et al.* (2013) utførte et forsøk med hensikt å se på påvirkningen av kjølbeinsskader på eggproduksjon, eggvekt og fôr- og vanninntak. De fant at høner som ikke hadde kjølbeinsskader la flere egg (91,7 % vs. 84,9 %), med høyere eggvekt, samt hadde lavere fôrinntak og lavere vanninntak enn høner med kjølbeinsskader. De fant også at hønene uten kjølbeinsskader hadde sterkere kjølbein ved knekkstyrketest (M. Nasr et al., 2013). Det er også gjort forsøk på om hønene opplever smerte ved kjølbeinsskader, og Nasr *et al.* (2012) konkluderte med at hønene opplever smerte, samt at det dermed går ut over velferden (M. A. Nasr et al., 2012).



Figur 6: a) Kjølbeneets anatomi, b) orientering (Casey-Trott et al., 2015)

3. Materiale og metode

Eggene og hønene brukt i denne oppgaven ble alle hentet hos Ole Egge på Moer gård. I hønehuset var det tre forsøksrom, hver med to separate etasjer. Hver etasje bestod av 22 bur med 9 høner i hvert bur. To av rommene ble brukt i denne studien, og totalt 108 høner. Burene i øverste etasje i rom 1 var brukt som kontroll, mens UVB-lysene var montert i nederste etasje i rom 2. Bena til hønene ble eksponert for UVB-lyset ved at lyset var plassert i fronten av hver bur under fôrtroene, og lyset ble slått på ved fôring. UVB hønene hadde vært eksponert for 2x30 minutter UVB lys fra starten av innsettet. Fra mai til september 2018 ble tidsintervallene 2x15 minutter, 2x30 minutter og 4x30 minutter utprøvd. I disse månedene ble det samlet inn egg som ble analysert for vitamin D₃ innhold. Fra siste innsamling i september ble det også samlet inn egg til skalkkvalitetsanalyser. Da hønene skulle avlives ble 54 høner fra kontrollrommet og 54 høner fra rom med UVB-lys tatt ut for videre tibia- og kjølbeinsundersøkelser. Alle hønene fikk tildelt samme type fôr, Kromat verpefôr fra Felleskjøpet. Hønene var av rasen, Lohmann.

3.1 UVB-lys

UVB-lyset som ble anvendt i dette forsøket var av typen *Philips TL 20W/12 RS SLV/25 tube*. Løvkvam-Køster (2018) brukte samme type lysrør i sitt pilotforsøk. De var 60 cm lange, hadde en radius på 20 cm og diameter på 40 cm. Wattstyrken var 19,3 W, og av dette var 2,4 W UVB-lys. Overflaten ble kalkulert til å være:

$$40 \text{ cm} * 3,14 * 60 \text{ cm} = 7536 \text{ cm}^2$$

Antall watt som pæren utstråler dividert med overflaten gir lysintensiteten:

$$\frac{2400 \text{ mW}}{7536 \text{ cm}^2} = 0,3185 \text{ mW/cm}^2 = 318,5 \text{ }\mu\text{W/cm}^2$$

3.2 D-vitaminanalyser

Det ble hentet egg 16. mai, 11. juli og 8. august 2018. I tillegg måtte to uttak først til Nortura i Rakkestad før uthenting. Disse ble plukket henholdsvis 13. juni og 5. september 2018 i hønehuset, og hentet på Nortura mandagen etter (18. juni og 10. september).

3.2.1 Innsamling av egg

Ved første henting av egg, 16. mai, ble det hentet ut 8 egg fra nederste etasje i rom 2 (med UVB-lys), og 4 egg fra øverste etasje i rom 1 (kontroll). Samme dag ble lystiden redusert fra 2x30 til 2x15 minutter, altså halvert. 13. juni ble det igjen tatt ut 12 egg, denne gangen kun fra nederste etasje i rom 2 (rom med UVB-lys). Belysningen ble nå økt til 2x30 minutter, dvs. samme lyssetting som før 16. mai. 11. juli ble det igjen hentet 12 egg fra nederste etasje i rom 2. Deretter ble belysningen økt til 4x30 minutter per dag, altså det doble av det som ble undersøkt i første del av prosjektet. Den 8. august ble det tatt ut 12 egg, og lyset ble redusert til 2x30 minutter igjen. Siste omgangen med egg ble tatt ut 5. september, og hentet 10. september på Nortura. Denne gangen ble det tatt ut 12 egg fra rom 1 (leddet uten UVB-lys), samt 12 egg fra rom 2 (leddet med UVB-lys). I tillegg ble det også tatt ut 32 egg fra leddet med UV-lys og 32 egg fra leddet uten UVB-lys. Disse skulle brukes i eggeskallkvalitetsanalyser.

Tabell 1: Oversikt over innsamling av egg

Lyslengde (minutter)	Dato	Antall egg fra rom 2(UVB)	Antall egg fra rom 1 (kontroll)	Burnummer i rom 2 (UVB)	Burnummer i rom 1 (kontroll)
2x30	16. mai	8	4	3, 5, 7, 9	3, 7
2x15					
2x15	13. juni	12		3, 5, 7, 9	
2x30					
2x30	11. juli	12		3, 5, 7, 9	
4x30					
4x30	8. august	12		3, 5, 7, 9	
2x30					
2x30	5. september	12 + 32	12 + 32	3, 5, 7, 9	3, 5, 7, 9

3.2.2 Skilling av eggeplommer

Det ble brukt en standardisert metode for å skille eggeplommen fra eggehviten (Løvkvam-Køster, 2018, vedlegg 1). Egget ble veid, før eggeskallet ble knust og innholdet overført til en eggeskiller. Eggeplomme og eggehvite ble overført fram og tilbake mellom to eggeskillere slik at eggehviten kunne renne gjennom åpninger under og på siden. Når det kun var plommen igjen ble den overført til en plastikkbeholder og veid. Deretter ble eggeplommene lagret på -80°C fram til vi kunne starte analysene. Lagringstemperaturen på -80°C ble brukt for å unngå degradering av vitamin D_3 .

3.2.3 Prøvepreparering av eggeplomme og forsåpning

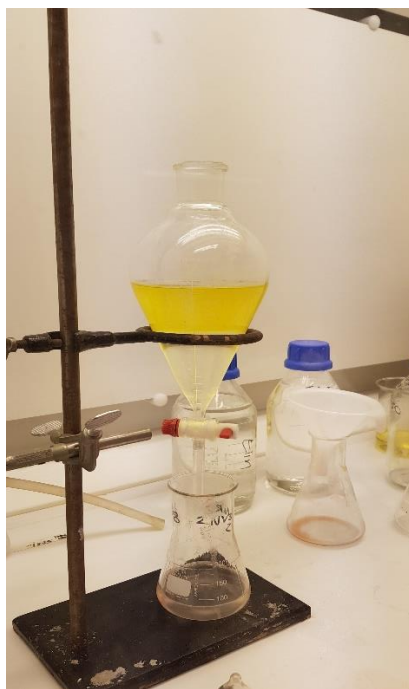
Analysene ble gjort i flere omganger med 12 egg per omgang, samt et kontrollegg. Før analyseringen måtte det gjennomføres en prøveopparbeidelse i samsvar med beskrivelsen i Løvkvam-Køster, 2018, vedlegg 2. Prøveopparbeidelsen ble gjort for å fjerne forstyrrende komponenter, for å få en prøve som kunne analyseres av instrumentet og for oppkonsentrering. Prøvene måtte først tines, før de kunne overføres i 250 mL erlenmeyerkolber og veies. Det ble videre tilsatt intern standard (D_2), askorbinsyre, kaliumlut og etanol. Internstandard D_2 ble brukt for å korrigere for variasjoner i prøveopparbeidelsen. Løsningen ble deretter boblet med N_2 -gass. Prøvene ble tilslutt satt på røring over natten i romtemperatur for en mest mulig skånsom forsåpning. Det er mulig å gjøre dette med høy temperatur mye raskere, men da har man sett at man mister en del D_3 fordi det er mer ustabil ved høyere temperaturer.

3.2.4 Ekstraksjon

Etter forsåpningen måtte prøvene ekstrahertes for å rense og oppkonsentrere D_2 og D_3 i prøven slik at de kunne separeres og detekteres. Det uforsåpbare materialet ble ekstrahert to ganger. Først ved væske-væske ekstraksjon (LLE), og deretter med fastfase ekstraksjon (SPE). Ved LLE overføres, i dette tilfellet, vitamin D fra en væske til en annen. Vanligvis er den ene væsken et organisk løsemiddel, mens den andre væsken er vandig.

Det ble blandet inn eter, som har mindre tetthet enn vann, og som dermed la seg på toppen. Det nederste laget bestod av et vandig materiale. De to lagene ble tappet ut, og samlet i hver sin beholder. Deretter ble den vandige fasen ekstrahert på nytt. Denne gangen ble den vandige

fasen kastet, og eterfasen tatt vare på. Fraksjonene (de to eterfasene) ble sammenslått, vasket med H₂O, for deretter å bli ristet. Løsningene skilte seg igjen, denne gangen med vann og lut på bunnen. Også her var det eterfasen vi var interesserte i, og den vandige fasen ble fjernet. Det ble tilsatt natriumsulfat (Na₂SO₄, tørkesalt), for å binde opp eventuelle vannrester i eterfasen, før prøven ble filtrert. Deretter måtte prøvene dampes inn over natten.



Bilde 1: Væske-væske ekstraksjon

Det ble videre brukt fastfase ekstraksjon for å sitte igjen med en løsning som inneholdt vitamin D₂ og D₃ i rensert form. Dette er en metode som er basert på å skille komponentene i to ulike faser, en fast- og en væskefase. Stoffet av interesse kan enten absorberes til den faste fasen, eller det kan holdes løst i væskefasen. I dette tilfellet ble D-vitamin absorbert til den faste, for deretter å bli frigjort ved å vaske med heptan.

Det ble tilsatt heptan til det inndampede materialet, før prøvene ble satt i en sentrifuge. Dette førte til bunnfall. Det ble brukt pipette til å overføre prøven, uten bunnfallet, til SPE-kolonner. I rørene var det en polar fast fase hvor vitamin D₂ og D₃ skulle feste seg. Rørene ble først fuktet med heptan for å åpne bindingene for vitamin D₂ og D₃. Det ble brukt et vakuumsystem med vannsug. Deretter ble det igjen vasket med heptan i flere omganger. Heptanen var tilsatt isopropanol (0,5 %), som gjorde at D₂ og D₃ løsnet fra den faste fasen inne i SPE-kolonnen. Deretter ble det dampet inn med nitrogenass i noen minutter.



Bilde 2: Fastfase ekstraksjon

3.2.5 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

I denne oppgaven er det brukt en metode modifisert ut i fra en analysemetode utviklet av Mattila et al (1992). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) er en separasjonsteknikk som separerer stoffer ved at de fordeler seg ulikt mellom en mobil (bevegelig) fase og en stasjonær (stillestående) fase. Ved HPLC blir løsningen utsatt for høyt trykk som presser løsningen ned.

Etter ekstraksjonen av prøvene ble de videre fraksjonert ved bruk av semi-preparativ HPLC med en normal fase kolonne. Kolonnen var mindre enn normalt ved denne typen opprensing, derav «semi», og fordi den er brukt til å preparere prøven, «preparativ». Ved denne typen HPLC er mobilfasen upolar og stasjonærfasen polar. Fordi de polare forbindelsene vil bruke lengst tid gjennom kolonnen, kan man fraksjonere bort upolare og ekstremt polare forbindelser. Det ble satt på stoppeklokke, og fraksjonene ble samlet opp mellom 8-20 minutter. Disse fraksjonene inneholdt vitamin D₂ og D₃, og ble videre injisert på et analytisk HPLC system med UV-detektor. Her var kolonnen «omvendt fase», altså mobilfasen var polar og stasjonærfasen var upolar. Vitamin D₂ og D₃ ble detektert ved hjelp av UV-deteksjon på 264 nm, og de ble sammenlignet i et kromatogram. Kromatogrammet ga en separasjon av signalet (toppen) som stammer fra D₃ fra den som stammer fra D₂.

3.3 Skallkvalitet

De 64 eggene som ble hentet ved siste uttak (32 fra høner eksponert for UV-lys og 32 kontroller), ble brukt i skallkvalitetsanalyser. Først ble eggene veid på en laboratorievekt, og vekten ble notert. Deretter ble de lagret i kjøleskap på 4 °C i en uke.

3.3.1 Knekkstyrke

Lengde og bredde på hvert egg ble målt ved hjelp av et skyvelære. Tinius Olsen Texture Analyser HK5T ble brukt til å bestemme knekkstyrken. Eggene ble plassert horisontalt mellom to rustfrie stålplater. Cylindrical Feed Pellet Compression Test 100N target Methods ble brukt til å bestemme knekkstyrken. Knekkstyrken ble målt i Newton ved knekkpunktet.



Bilde 3: Knekkstyrketest med Tinius Olsen Texture Analyser HK5T

3.3.2 Skalltykkelse

Etter knekkstyrkeanalysene ble innholdet i eggene tømt og skallene nøye vasket under rennende vann. Skallmembranen var intakt. Tykkelsen på eggeskallet ble målt med 0,0001 mm nøyaktighet ved bruk av et digitalt mikrometer. Det ble festet en kule på mikrometeret slik at målingene skulle bli mer korrekte i forhold til eggets buede overflate. Det ble tatt et

gjennomsnitt på totalt seks målinger på tre ulike punkter på egget, to målinger på hvert punkt. Målinger ble utført på topp og bunn, samt på midten av hvert skall.



Bilde 4: Digital mikrometer for å måle skalltykkelse

3.3.3 Prosent eggeskall

Etter å ha utført målingene på skalltykkelse ble alle deler fra samme eggeskall samlet sammen og plassert i merkede digler. Skallene ble veid på en elektronisk vekt, og vekten ble notert. Deretter ble eggeskallene tørket over natten på 104 °C. Dagen etter ble de plassert i en eksikator i en halvtime, før de til slutt ble veid på en digital vekt til nærmeste 0,0001 gram. Prosent av eggeskall ble kalkulert:

Tørkede eggeskall (vekt)/helt egg (vekt) x 100 %

3.4 Skjelettkvalitet

Mot slutten av forsøket ble hønene slaktet ut og 54 høner fra rom 2 (eksponert for UVB-lys) og 54 høner fra rom 1 (uten UV-lys) ble plukket ut for benanalyser og for å se på kjølbekinsker. De ble pakket ned i søplesekker og pappesker og satt på fryserom. Pappeskene ble merket med rom- og burnummer.

3.4.1 Tibia

Hønene ble veid, og det høyre benet fra hønene ble separert og flådd. Tibia (skinnebenet) ble separert og muskler og brusk ble fjernet ved bruk av hendene, kniv og skalpell. Tibia ble veid og lagt i merkede poser. Prøvene ble lagret i -20°C fram til analyse.

Beina ble deretter tørket på 104 °C i 24 timer, for så å bli veid på nytt. Benlengden målt fra den ene enden til den andre med skyvelære. Diameter ble målt ved å rotere benet for å måle den største og den minste diameteren mot midten. Diameteren ble definert som gjennomsnittet av de to målingene. Etter dette ble beina knust til mindre biter ved bruk av en tang, og plassert i digler. Diglene ble merket med prøvenummer, og brent ved 550°C i 16 timer. Diglene ble plassert i eksikkator i 1 time, og deretter veid på en digital vekt til nærmeste 0,001 g. Tilslutt ble beina knust til pulver ved hjelp av morter, og overført til merkede prøveglass. Disse ble sendt videre til laboratoriet for kalsiumanalyser.

Seedor index (indikasjon på bentetthet) ble regnet ut:

Vekt av tibia/lengde på tibia



Bilde 5: Tibia etter tørking

3.4.2 Kjøllebeinsskader

Kjøllebeinet ble separert ved bruk av hendene, kniv og tang. De ble rensert slik at det skulle være mulig å se eventuelle skader eller brudd. De ble fotografert ovenfra og fra siden, på en så standardisert måte som mulig. Bildene ble siden sendt til en uavhengig person som evaluerte skadene og ga dem karakter i forhold til skadens grad. Graderingene ble gjort ved å legge en tenkt linje fra spiss til spiss, og måle hvor bred åpningen mellom den tenkte linja og kjøllebensbrusken var på punktet med størst avvik. Bruddene ble evaluert etter alvorlighetsgrad, om det var tynne brudd og om det var betydelig callus-dannelse eller feilstilling. Både skjevheter og brudd ble gradert fra 0-3, hvor 0 var ingen avvik, mens 3 var alvorlig.



Bilde 6: Kjølbein, bildet til venstre illustrerer kjølbein med avvik grad 2. Bildet til høyre illustrerer kjølbein med avvik grad 0.

3.5 Produksjonsresultater

Moer gård førte daglige produksjonsresultater som ble sendt inn til Felleskjøpet. Mandag-lørdag registrerte de kun fulle brett, mens på søndag ble alle eggene samlet inn og registrert. På bakgrunn av dette ble alle resultater omregnet fra «per dag» til «per uke» for å gi best mulig bilde av produksjonen. Det ble ført resultater på verpeprosent, eggvekt, eggmasse, fôropptak, vannopptak, vann/fôr, dødelighet, knekk og klink.

3.6 Statistikk

Det ble beregnet gjennomsnitt av vitamin D₃ analysene, samt for parameterne innenfor skall- og skjelettkvalitet og produksjonsresultatene. Standardavvik (σ) er anvendt for å undersøke variasjon mellom egg innenfor behandlingene, mellom burene, innad i burene, samt for skallkvalitet, skjelettkvalitet og produksjonsdata. Formelen for standardavvik er:

$\sigma = \sqrt{V}$, der V er varians. Standardavviket er et mål på spredningen i dataene, og gir verdiens gjennomsnittlige avstand fra gjennomsnittet.

Konfidensintervall er estimert for hver periode. Konfidensintervall er et statistisk mål på feilmarginen av målingene, og størrelsen på intervallet påvirker sikkerheten. Større intervall gir mer usikkerhet. Ved målinger med mye variasjon og lite utvalg vil konfidensintervallet bli bredere, og motsatt.

Det ble brukt T-test for å se på forskjeller mellom behandlingene i forhold til vitamin D₃ innhold, egg og skallkvalitet og skjelettkvalitet. P-verdien var satt til 0.05. Alle statistiske analyser ble utført i Microsoft Excel.

4. Resultater

Med utgangspunkt i analysene gjort på vitamin D₃, skall- og skjelettkvalitet, samt produksjonsresultater fra Felleskjøpet, er det i det neste kapittelet presentert de viktigste resultatene fra forsøket.

4.1 Vitamin D₃

Analysene av vitamin D₃ basert på kromatogrammene fra HPLC-metoden er brukt i de neste avsnittene.

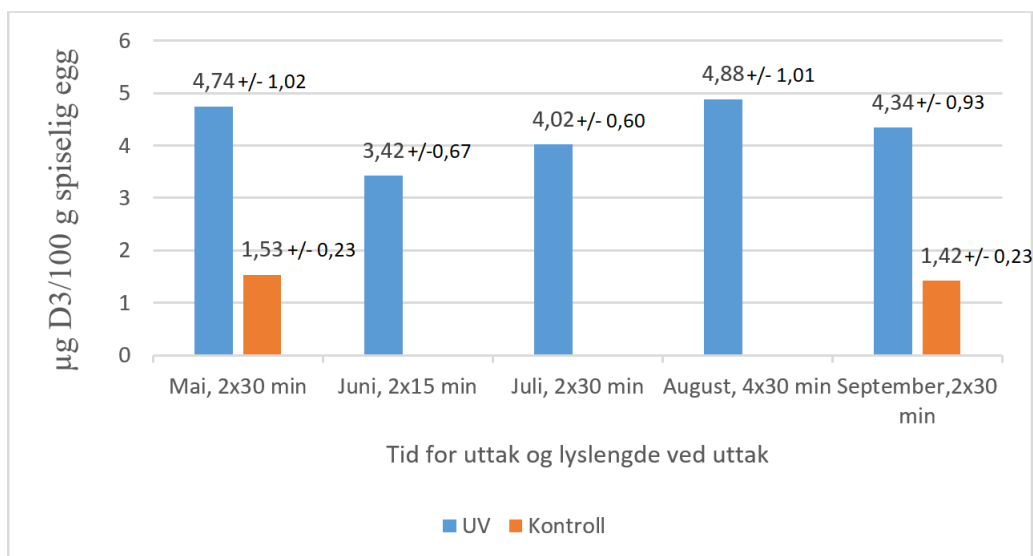
4.1.1 Effekt av ulike tidsintervaller av UVB lys

Effekt av ulike tidsintervaller av UVB lys ble undersøkt. Figur 7 viser det gjennomsnittlige nivået av vitamin D₃-innhold ($\mu\text{g D}_3/100 \text{ g}$ spiselig egg) i eggene ved uttakene med 2x15, 2x30 og 4x30 minutter eksponering for UVB lys, i tillegg til kontroll. I juni, med lyslengde på 2x15 minutter, er vitamin D₃ innholdet redusert i forhold til 2x30 minutter. I august da lyslengden var økt til 4x30 minutter kan vi se en liten økning i vitamin D₃ innhold, i forhold til månedene hvor lyslengden var på 2x30.

Standardavviket innenfor hver behandling ble beregnet ut ifra alle analysene fra hvert bur i hver måned. Dvs. 8 egg fra UVB eksponerte høner og 4 kontrollegg i mai, 12 egg fra UVB eksponerte høner de andre periodene, samt 12 egg fra kontrollhønene i september.

Standardavviket varierer fra 0,23 til 1,02 μg vitamin D₃/100 g spiselig egg.

I alle periodene var 100 % av eggene innenfor konfidensintervallet ved 2 standardavvik, med unntak av for september hvor 91,7 % av eggene var innenfor konfidensintervallet ved 2 standardavvik.



Figur 7: Gjennomsnitt og standardavvik for ulike tidsintervaller av UVB lys på vitamin D₃ innhold i egg (µg D₃/100 g spiselig egg) basert på kontrollbur og bur eksponert for UVB lys fra hvert uttak.

4.1.2 Signifikante forskjeller ved behandling

I tabell 2 er det presentert en sammenlikning mellom egguttaket i juni (2x15) og uttaket i juli (2x30), uttaket i august (4x30 min) og uttaket i juli (2x30), samt uttaket i juli (2x30) og uttaket i september (2x30). Jeg har valgt å utelate uttaket i mai da det var færre egg innsamlet fra hver gruppe (UVB og kontroll) i mai enn for de andre månedene. Målet var å finne om det var signifikant forskjell mellom periodene. Det er funnet signifikant forskjell mellom de ulike behandlingene, det er ikke funnet signifikant forskjell mellom lik behandling ved ulikt tidspunkt.

Tabell 2: Gjennomsnittet for de ulike behandlingene fra juni-september, og om det er var signifikant forskjell mellom behandlingene.

Måned	Gjennomsnitt	P(<0.05)
Juni (2x15)	3,42	Signifikant
Juli (2x30)	4,02	
August (4x30)	4,89	Signifikant
Juli (2x30)	4,02	
Juli (2x30)	4,02	Ikke signifikant
September (2x30)	4,34	

4.1.3 Forskjellen mellom minimum og maksimum vitamin D₃ innhold i egg i periodene

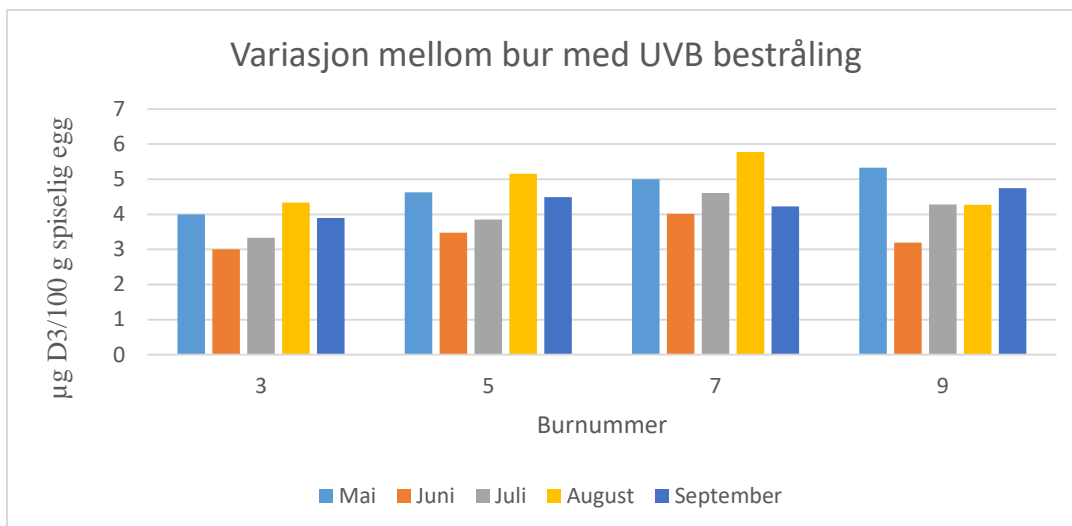
Tabell 3 viser minimum og maksimum nivå av vitamin D₃ (µg D₃/100 g spiselig egg) i egg fra kontrollrom (mai og september) og egg fra rom hvor hønene er eksponert for UVB lys for alle periodene. Forskjellen mellom høyeste og laveste nivå er også illustrert i prosent. Forskjellen varierer mellom 34,6-51,0 % for UVB behandling, og 25,4-37,6% for kontrollene. Den laveste forskjellen for UVB lys er i juli (2x30), mens den høyeste er i august (2x30 min). For kontrolleggene var det lavere forskjell i mai enn i september.

Tabell 3: Laveste og høyeste nivå av vitamin D₃ (µg D₃/100 g spiselig egg) i egg fra kontrollrom og egg fra rom med UVB lys i de ulike periodene, samt forskjellen i prosent.

Periode	Behandling	Laveste mengde D ₃	Høyeste mengde vitamin D ₃	Forskjell (%)
Mai	UVB	3,51	6,50	46,0
	Kontroll	1,32	1,77	25,4
Juni	UVB	2,35	4,42	46,8
Juli	UVB	3,19	4,88	34,6
August	UVB	3,29	6,71	51,0
September	UVB	2,85	5,73	50,3
	Kontroll	1,06	1,70	37,6

4.1.4 Variasjonen mellom bur med UVB bestråling

Variasjonen mellom bur med UVB bestråling ble undersøkt for å se om det var noen forskjeller i resultater mellom ulike bur. Gjennomsnittet av vitamin D₃ innhold for de ulike burene i hver periode er illustrert i figur 8. Bur 7 ligger noe over de andre burene i vitamin D₃ innhold for periodene juni, juli og august. Bur 3 ligger generelt lavt i forhold til de andre burene. Standardavviket er presentert i tabell 4, og viser at det var minst variasjon i bur nr. 3, og størst i bur nr. 9.



Figur 8: Gjennomsnittlig vitamin D₃ innhold (µg D₃/100 g spiselig egg) mellom bur med UVB lys fordelt på burnummer for hele perioden (mai-september).

Tabell 4: Standardavvik i vitamin D₃ innhold (µg D₃/100 g spiselig egg) mellom bur med UVB lys fordelt på burnummer.

Burnummer	Standardavvik (µg D ₃ /100 g spiselig egg)
3	0,53
5	0,66
7	0,70
9	0,79

4.1.5 Standardavvik og forskjell mellom minimum og maksimum nivåer innad i burene

Standardavvik og forskjellene mellom minimum og maksimum nivå av vitamin D₃ (µg D₃/100g spiselig egg) innad i burene som var eksponert for UVB-belysning er vist i tabell 5. Standardavvikene innad i burene ble beregnet på bakgrunn av resultater fra alle egg i hvert bur for høner som var eksponert for UVB lys. Det høyeste standardavviket var i bur 9 i mai, og det laveste var i bur 3 i mai. Forskjellene mellom minimum og maksimum nivå varierte fra 3,2% i bur 3 i mai til 47,5 i bur 3 i september.

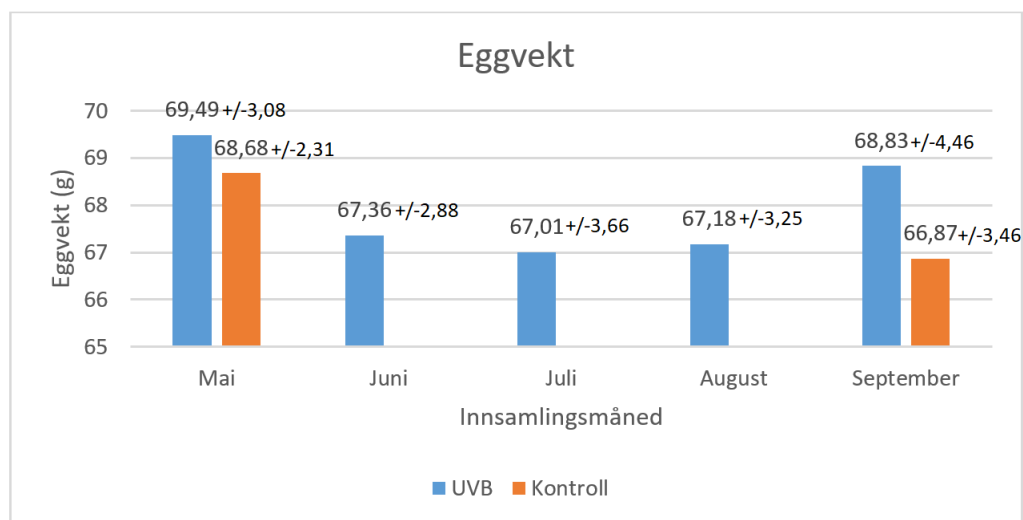
Tabell 5: Gjennomsnitt, standardavvik (SD), minimum og maksimum nivå av vitamin D₃ (µg D₃/100g spiselig egg) innad i burene som var eksponert for UVB-lys, samt forskjellen mellom laveste og høyeste nivå i prosent.

Periode	Burnummer	Gj.snitt	SD (µg D ₃ /100 g spiselig egg)	Min. mengde D ₃	Maks. mengde vitamin D ₃	Forskjell (%)
Mai	3	4,0	0,09	3,93	4,06	3,2
	5	4,63	1,57	3,51	5,74	38,9
	7	5,0	0,27	4,81	5,19	7,3
	9	5,33	1,65	4,17	6,50	35,8
Juni	3	3,0	0,91	2,35	4,05	42,0
	5	3,48	0,43	3,04	3,89	21,9
	7	4,01	0,52	3,42	4,42	22,6
	9	3,19	0,58	2,69	3,83	29,8
Juli	3	3,33	0,17	3,19	3,51	9,1
	5	3,85	0,46	3,37	4,28	21,3
	7	4,61	0,25	4,34	4,84	10,3
	9	4,28	0,54	3,84	4,88	21,3
August	3	4,33	0,57	3,98	4,99	20,2
	5	5,15	1,14	4,10	6,37	35,6
	7	5,77	0,97	4,78	6,71	28,8
	9	4,27	0,86	3,29	4,85	32,2
September	3	3,90	1,35	2,85	5,43	47,5
	5	4,49	1,15	3,27	5,55	41,1
	7	4,22	0,54	3,73	4,80	22,3
	9	4,74	0,86	4,19	5,73	26,9

4.2 Skallkvalitet

4.2.1 Eggvekt

For å se på variasjonen i eggvekt er det brukt gjennomsnittet av eggene samlet inn for hver periode. Gjennomsnitt og standardavvik er presentert i figur 9. I mai (8 egg UVB og 4 kontrollegg), juni (12 egg), juli (12 egg) og august (12 egg) ble eggene brukt til D-vitaminanalyser, og i september (44 egg UVB og 44 kontrollegg) ble 64 av totalt 88 innsamlet egg brukt i videre skallkvalitetsanalyser. Eggvekten var høyere i mai og september enn i de andre månedene. Eggene fra høner som har fått UVB belysning har høyere vekt enn egg fra høner i kontrollbur. Standardavviket var størst for UVB eggene i september, og minst for kontrolleggene i mai.



Figur 9: Gjennomsnitt og standardavvik på eggvekt for hele egg innsamlet i mai, juni, juli, august og september.

4.2.2 Effekt av UVB belysning på egg- og skallkvalitet

Effekten av UVB belysning på egg- og skallkvalitet er illustrert i tabell 6. Eggene brukt i disse resultatene er samlet inn i september. Det er signifikant forskjell mellom UVB behandling og kontroll for bredde, vekt, og skalltykkelse. For parameterne, lengde, bredde, eggvekt, knekkstyrke og vekt på eggeskall (før og etter tørking) er gjennomsnittet noe høyere for de som har hatt UVB lys. For parameterne skalltykkelse og prosent eggeskall har kontrollene høyest gjennomsnitt.

Tabell 6: Effekt av UVB belysning på eggkvalitet på egg innsamlet i september.

Parameter	Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik	P(<0.05)
Lengde (mm)	UVB	60,46	1,78	Ikke sign.
	Kontroll	59,78	1,92	Ikke sign.
Bredde (mm)	UVB	45,55	1,18	Sign.
	Kontroll	44,77	0,92	Sign.
Eggvekt (g)	UVB	69,15	4,53	Sign.
	Kontroll	66,77	3,80	Sign.
Knekkstyrke (N)	UVB	48,20	5,34	Ikke sign.
	Kontroll	46,81	5,95	Ikke sign.
Skalltykkelse (mm)	UVB	0,41	0,02	Sign.
	Kontroll	0,44	0,03	Sign.
Vekt på eggeskall (g)	UVB	6,46	0,60	Ikke sign.
	Kontroll	6,29	0,44	Ikke sign.
Vekt på tørket eggeskall (g)	UVB	6,33	0,60	Ikke sign.
	Kontroll	6,18	0,43	Ikke sign.
Prosent eggeskall (%)	UVB	9,15	0,56	Ikke sign.
	Kontroll	9,27	0,58	Ikke sign.

4.3 Effekt av UVB bestråling på tibia og kjøllein

Av de 108 hønene som ble brukt i prosjektet, 54 kontrollhøner og 54 høner som hadde blitt eksponert for UVB lys, hadde to av hønene knekt begge tibia under transport. Disse ble fjernet fra resultatene. 106 høner (53 fra hver behandling) brukt i analysene.

4.3.1 Effekt av UVB på tibia

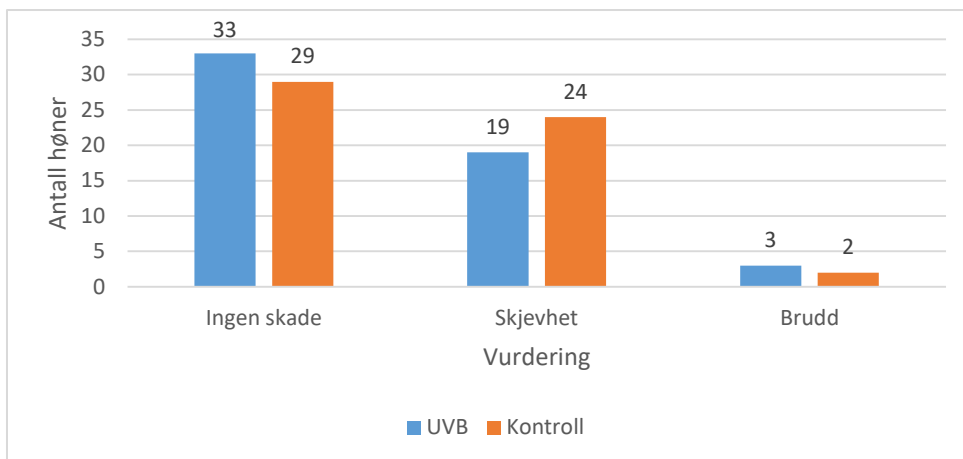
I tabell 7 er resultatene av undersøkelsene på tibia framstilt. Det er funnet signifikant forskjell mellom UVB bestråling og kontroll for vekt på tibia (før og etter tørk), Seedor index (bentetthet) og aske.

Tabell 7: Effekt av UVB belysning på tibia fra høner fra bur med UVB lys og kontroll

Parameter	Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik	P(<0.05)
Vekt høne (g)	UVB	1857,38	176,53	Ikke sign.
	Kontroll	1919,25	190,55	Ikke sign.
Vekt tibia (g)	UVB	8,47	0,55	Sign.
	Kontroll	8,73	0,54	Sign.
Vekt tørket tibia (g)	UVB	5,80	0,41	Sign.
	Kontroll	6,04	0,42	Sign.
Lengde tibia (mm)	UVB	114,64	2,22	Ikke sign.
	Kontroll	115,39	2,20	Ikke sign.
Bredde tibia (mm)	UVB	6,44	0,27	Ikke sign.
	Kontroll	6,46	0,21	Ikke sign.
Seedor index (mg/mm)	UVB	50,61	3,11	Sign.
	Kontroll	52,30	3,11	Sign.
Aske (g)	UVB	2,84	0,23	Sign.
	Kontroll	2,95	0,26	Sign.
Aske/kg tibia (mg/kg)	UVB	488,77	24,79	Ikke sign.
	Kontroll	488,24	29,18	Ikke sign.
Kalsiuminnhold	UVB	376,50	19,82	Ikke sign.
	Kontroll	376,68	24,26	Ikke sign.

4.3.2 Kjølbeinsskader

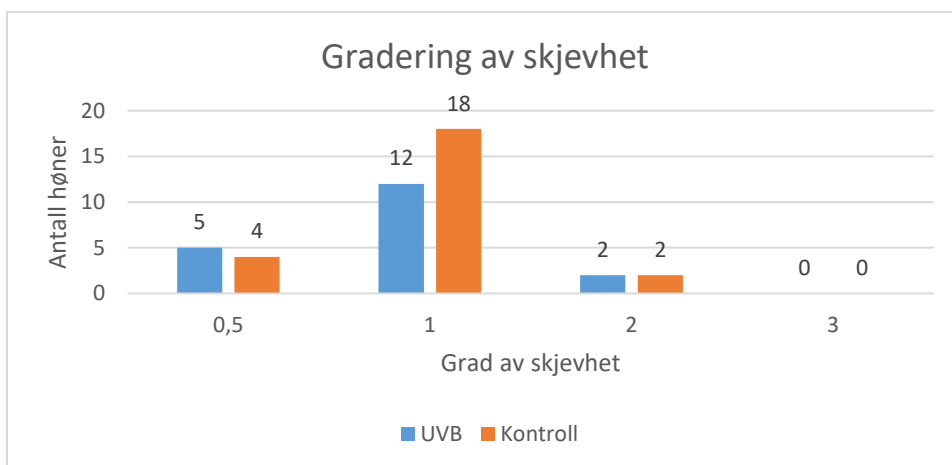
Resultatene av observasjon av kjølbeinsskader mellom høner fra rom som har hatt UVB belysning, og kontrollrom er illustrert i figur 10. Det er observert flere skjevheter blant hønene som ikke har hatt UVB belysning, enn høner som har hatt UVB belysning. Det er observert ett mindre brudd hos hønene fra kontrollburene.



Figur 10: Antall høner som er observert uten skade, med skjevhet og med brudd

4.3.3.1 Gradering av skjevhet og brudd

Skjevheten er gradert fra 0,5-3. Det er flest skjevheter med gradering 1, som vist i figur 11. Av 106 høner var det 3 med brudd fra rom med UVB belysning, og 2 høner med brudd fra kontrollrommet. Av disse fikk alle gradering 1.



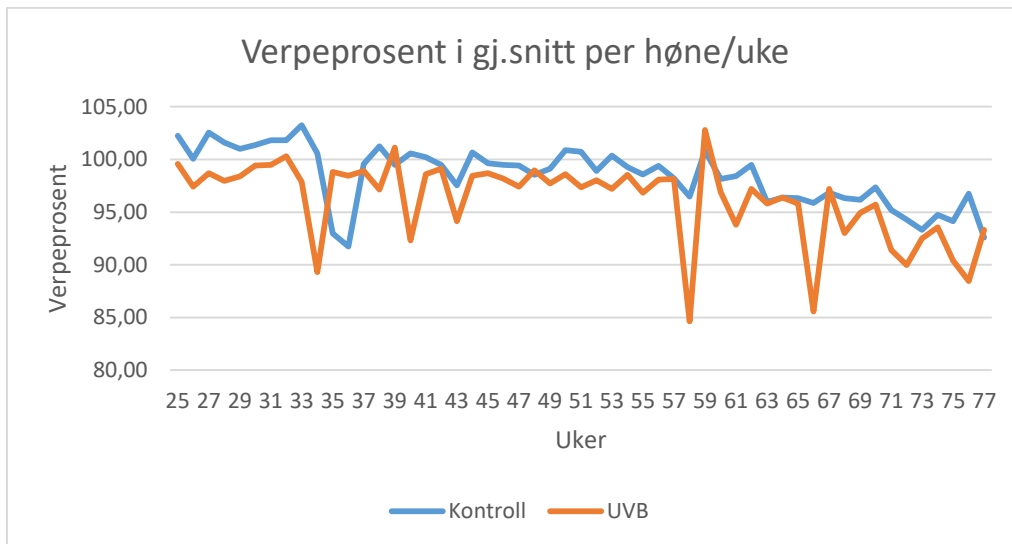
Figur 11: Grad av skjevhet for høner med skjevhet på kjølleinet, gradert fra 0,5-3.

4.4 Produksjonsresultater

Her er resultater på verpeprosent, eggvekt, eggmasse, fôropptak, vannopptak, dødelighet, knekk og klink presentert som «per uke».

4.4.1 Verpeprosent

Figur 12 illustrerer verpeprosenten i gjennomsnitt per høne/uke, og tabell 8 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som har fått UVB belysning. Kontrollhønene hadde høyere gjennomsnittlig verpeprosent, og lavere standardavvik enn høner som fikk UVB belysning.



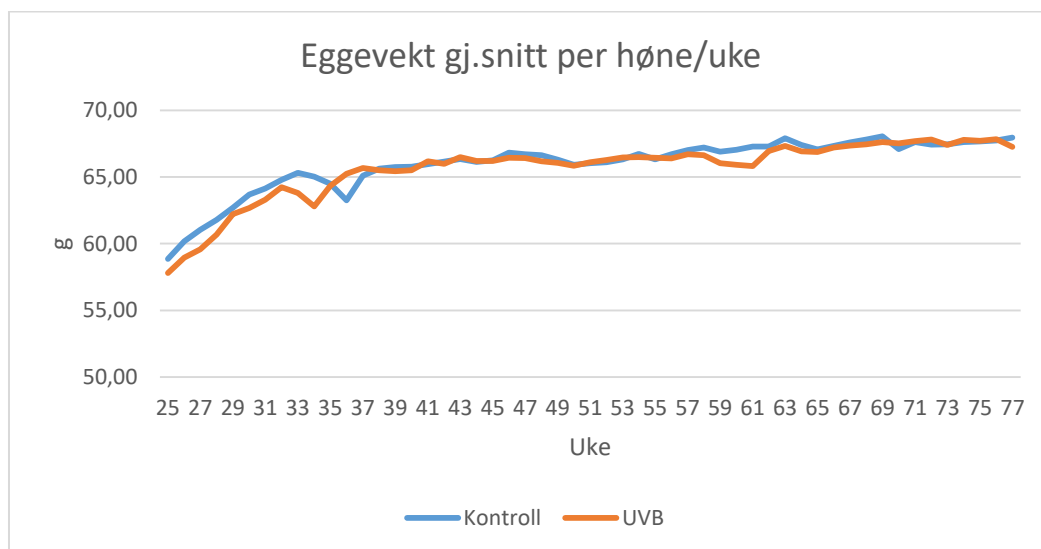
Figur 12: Verpeprosent per høne/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 25 ukers alder og til avliving.

Tabell 8: Gjennomsnitt og standardavvik for verpeprosent per høne/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner.

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	93,93	11,19
Kontroll	96,29	10,48

4.4.2 Eggvekt

Figur 13 illustrerer eggvekten i gjennomsnitt per høne/uke, og tabell 9 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som fikk UVB belysning. Eggvekten er høyere i gjennomsnitt for kontrollhønene enn hønene som har fått UVB bestråling. Standardavviket er høyere for hønene som har fått UVB bestråling.



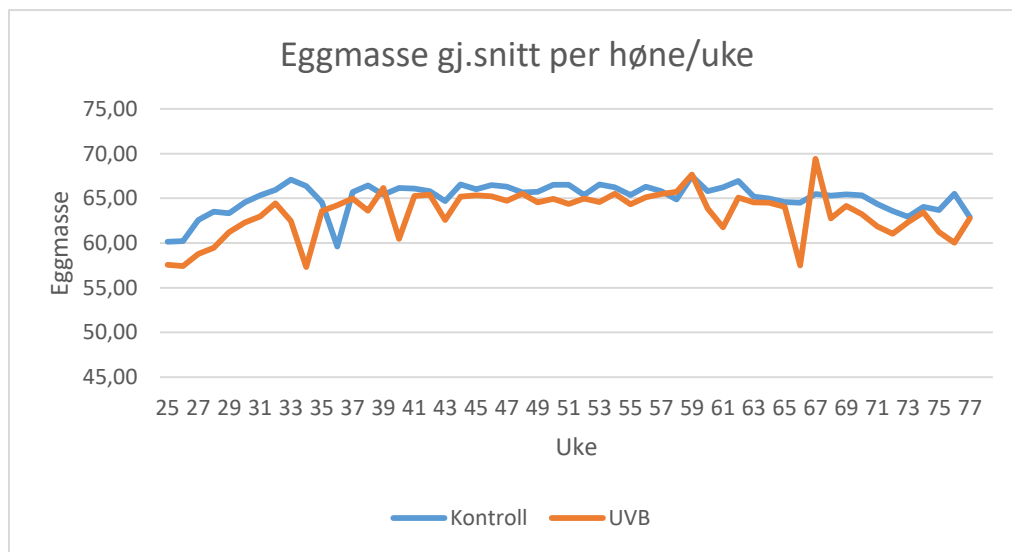
Figur 13: Eggevekt i gjennomsnitt per høne/uke på egg fra høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 25 ukers alder og til avliving.

Tabell 9: Gjennomsnitt og standardavvik for eggvekt per høne/uke på egg fra høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner.

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	64,69	4,12
Kontroll	65,12	3,68

4.4.3 Eggmasse

Figur 14 illustrerer eggmassen i gjennomsnitt per høne/uke, og tabell 10 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som fikk UVB belysning. Kontrollhønene hadde lavere gjennomsnittlige eggmasse og lavere standardavvik enn hønene som hadde fått UVB bestråling.



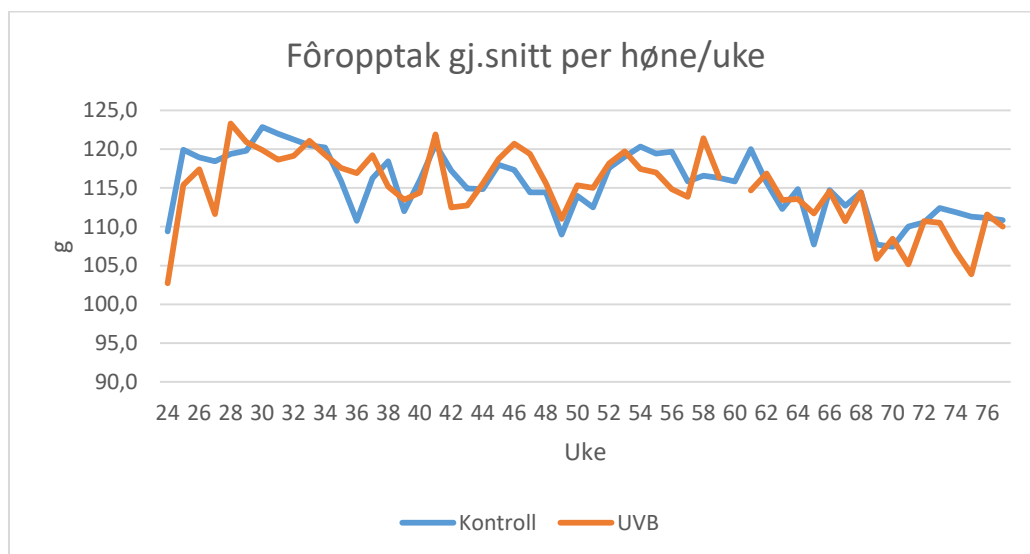
Figur 14: Eggmasse per høne/uke i egg fra høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 25 ukers alder og til avliving.

Tabell 10: Gjennomsnitt og standardavvik for eggmasse per høne/uke i egg fra høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner.

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	61,24	8,61
Kontroll	63,05	9,11

4.4.4 Fôropptak

Figur 15 illustrerer fôropptaket i gjennomsnitt per høne/uke, og tabell 11 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som fikk UVB belysning. Kontrollhønene hadde et høyere fôropptaket per høne/uke i gjennomsnitt og et lavere standardavvik enn hønene som hadde fått UVB belysning.



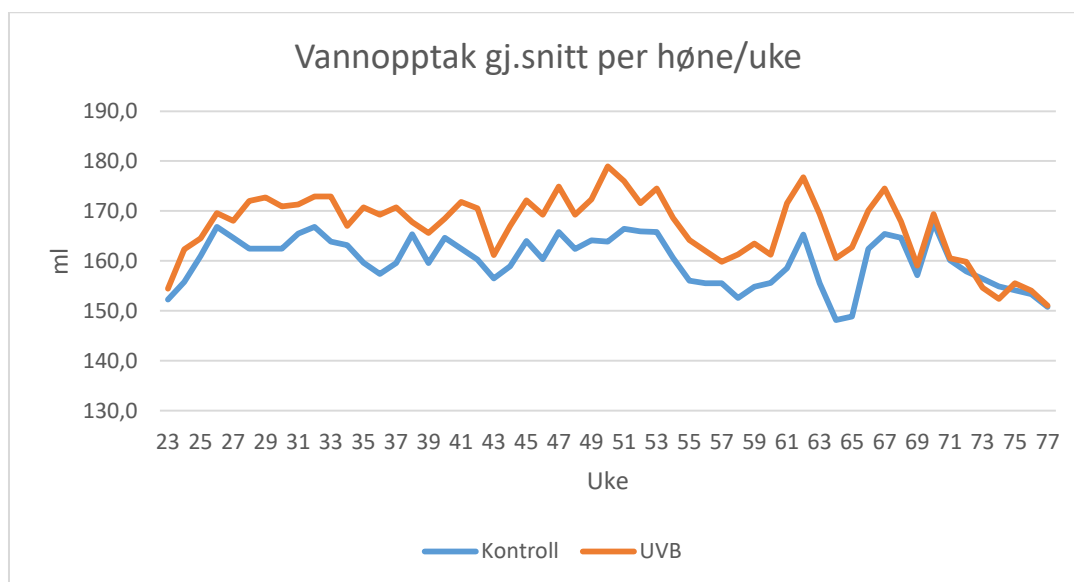
Figur 15: Fôropptak per høne/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 24 ukers alder og til avliving

Tabell 11: Gjennomsnitt og standardavvik på fôropptak per høne/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	108,11	18,29
Kontroll	109,05	17,66

4.4.5 Vannopptak

Figur 16 illustrerer vannopptaket i gjennomsnitt per høne/uke, og tabell 12 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som fikk UVB belysning. Vannopptaket var høyere i gjennomsnitt for høner som hadde fått UVB bestråling. Standardavviket var også høyere for denne gruppen.



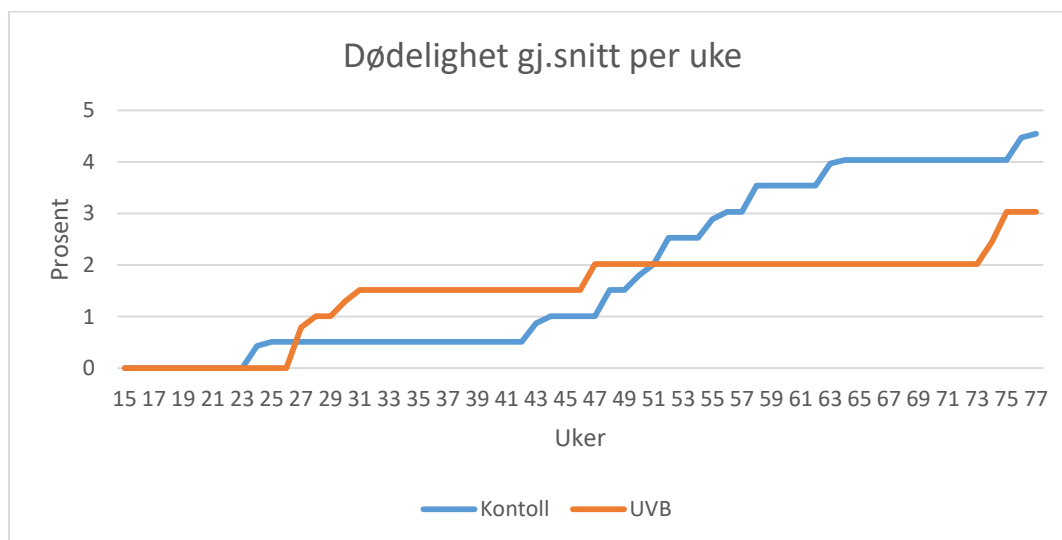
Figur 16: Vannopptak per høne/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 23 ukers alder og til avlaving

Tabell 12: Gjennomsnitt og standardavvik på fôropptak per høne/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	154,22	35,31
Kontroll	148,05	33,68

4.4.6 Dødelighet

Figur 17 illustrerer dødeligheten i gjennomsnitt per uke, og tabell 13 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som fikk UVB belysning. Kontrollhønene hadde høyere dødelighet mot slutten av innsettet enn hønene som hadde fått UVB belysning. Kontrollhønene hadde høyere gjennomsnittlig dødelighet og standardavvik.



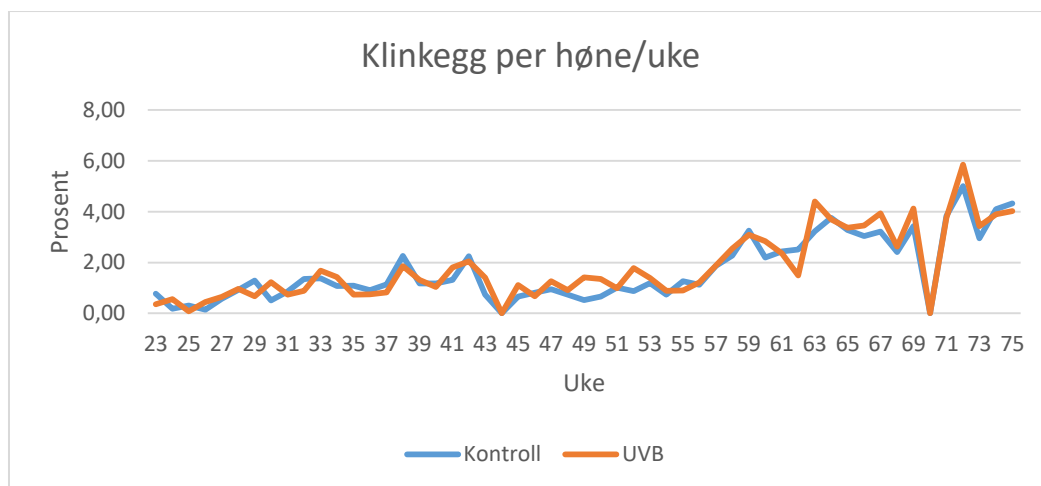
Figur 17: Dødelighet/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 15 ukers alder og til avliving.

Tabell 13: Gjennomsnitt og standardavvik for dødelighet/uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	1,50	0,84
Kontroll	1,86	1,63

4.4.7 Klinkegg

Figur 18 illustrerer klinkegg i prosent per høne/uke, og tabell 14 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som fikk UVB belysning. Det ble funnet høyere andel klinkegg hos hønene som var eksponert for UVB-lys enn for kontrollhønene.



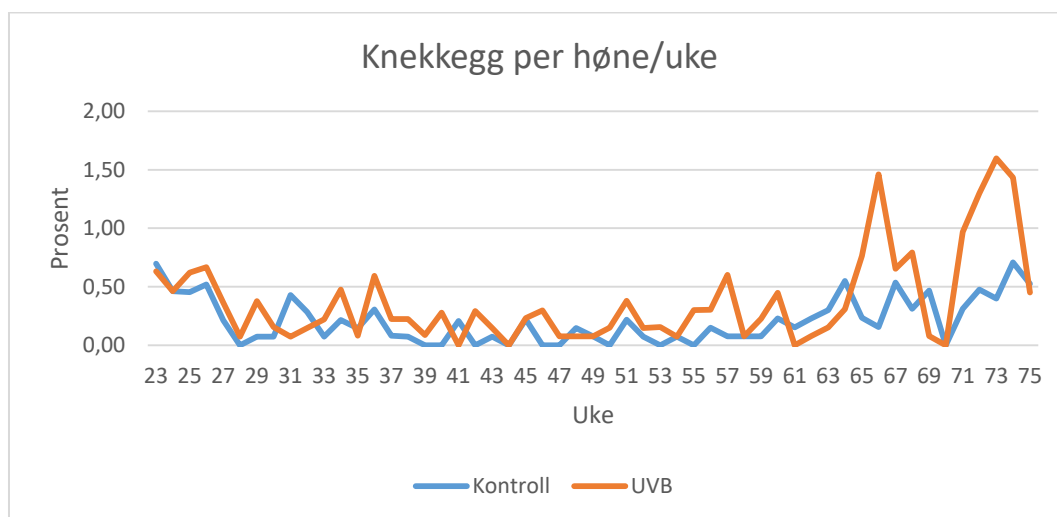
Figur 18: Klinkegg per uke i prosent for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 23 ukers alder og til avliving

Tabell 14: Gjennomsnitt og standardavvik for klinkegg per uke for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	1,81	1,34
Kontroll	1,68	1,25

4.4.8 Knekkegg

Figur 19 illustrerer knekkegg i prosent per høne/uke, og tabell 15 viser gjennomsnitt og standardavvik for kontrollhøner og høner som fikk UVB belysning. Det ble funnet høyere andel knekkegg hos hønene som var eksponert for UVB-lys enn for kontrollhønene.



Figur 19: Knekkegg per uke i prosent for høner som har fått UVB belysning og kontrollhøner fra 23 ukers alder og til avliving

Tabell 15: Gjennomsnitt og standardavvik for knekkegg per uke for høner som har fått UVB lysning og kontrollhøner

Behandling	Gjennomsnitt	Standardavvik
UVB	0,37	0,39
Kontroll	0,21	0,20

5. Diskusjon

5.1 Vitamin D₃ respons på ulike tidsintervall av UVB lys

Denne studien var en videreføring av pilotstudien utført av Maiken Caroline Løvkvam-Køster. Da hennes pilotstudie hadde som mål å undersøke om eksponering for UVB lys økte vitamin D₃ innhold i egg, skulle denne studien undersøke om ulike tidsintervall av UVB-lyset ga effekt på vitamin D₃ innholdet i egg, skallkvalitet, skjelettkvalitet og produksjonsresultater. I forsøket til Løvkvam-Køster ble det demonstrert en tredobling av vitamin D₃ innhold i egg ved eksponering for 60 minutter UVB lys per dag. Hun fant også, i likhet med andre studier, at 3-4 uker med eksponering vil være nok til å gi et stabilt nivå av vitamin D₃ i egg. På bakgrunn av dette ble intervallene i denne studien valgt til en måned per behandling.

Det ble funnet tilnærmet likt innhold av vitamin D₃ for kontrollhønene i Løvkvam-Køster sin studie og denne. I studien til Løvkvam-Køster lå vitamin D₃ nivåene på 4,86 etter 3 måneder med 2x30 minutter med UVB belysning. Dette er høyere enn nivåene jeg fant i denne studien ved 2x30 minutter UVB belysning. Ved 4x30 minutter lå hønene i denne studien på 4,88 µg vitamin D₃/100 g plomme, dvs. ganske like nivåer som Løvkvam-Køster fant i sin studie ved 2x30 minutter UVB belysning.

I mai, juli og september var lyseksponeringen på 2x30 minutter UVB lys. Av disse ble det funnet høyest vitamin D₃ innhold i mai, minst i juli, mens september havnet på verdier mellom mai og juli. Grunnen til at det ble observert høyest innhold av vitamin D₃ i mai kan være fordi hønene hadde vært eksponert for UVB-lyset over en lenger periode, og dermed hadde stabilt høye nivåer. I juli var vitamin D₃ nivåene på vei opp etter perioden med 2x15 minutter med UVB lys. Det kan derfor være en grunn til at det var i juli nivået var lavest av de tre månedene med 2x30 minutter. Det ble ikke funnet signifikant forskjell mellom vitamin D₃ innholdet i uttakene gjort i juli (2x30) og september (2x30). Dette kan indikere at 3-4 uker er nok til å gi stabile nivåer av vitamin D₃, og det vil være nærliggende å tro at ved en lenger periode ville nivåene stabilisert seg på sammen nivå som mai.

Som forventet ga kortest eksponering for UVB lys lavest vitamin D₃ innhold i eggene. Det var likevel over dobling av vitamin D₃ innholdet fra kontrollen til høner eksponert for 2x15 min. Vitamin D₃ innholdet i disse eggene var signifikant lavere enn for høner eksponert for 2x30 minutter. Det var mindre forskjell mellom 2x30 minutter og 4x30 minutter (21 %), men det ble også her konstatert signifikant forskjell. Det vil si at vitamin D₃ innholdet fortsetter å øke noe, men ikke i like stor grad med lenger eksponering for UVB lys enn 2x30 minutter.

Kühn *et al.* (2015) brukte UVB lys med eksponeringsdose på $76 \mu\text{gW}/\text{cm}^2$, hvilket var 4,2 ganger lavere dose enn lysene brukt i denne studien. Lyslengdene i studien varierte fra 0-300 minutter. Deres maksimale eksponeringstid på 300 minutter ville vært tilsvarende 72 minutter med UVB-lyset brukt i denne studien ($\frac{300\text{min}}{4,2} = 72\text{min.}$). Det ble observert liten forskjell mellom vitamin D₃ innholdet i egg fra høner som var eksponert for 180 minutter UVB lys, og egg fra høner som var eksponert for 300 minutter UVB lys. Ved 180 minutter lå nivåene på $25,9 \mu\text{g}/100\text{g}$ TS eggeplomme og ved 300 minutter lå nivåene på $28,6 \mu\text{g}/100\text{g}$ TS eggeplomme. Det gir en forskjell på 10 %, og er lavere enn forskjellen funnet i denne studien mellom 2x30 minutter og 4x30 minutter. I studien til Kühn *et al.* (2015) var de usikre på om lenger eksponeringstid enn 300 minutter ville gjøre noe større utslag på vitamin D₃ nivåene. I vår studie, hvor maksimal eksponeringstid var 120 minutter, som tilsier omtrent 500 minutter med UVB lysene brukt i Kühn *et al.* (2015) sitt forsøk, kan vi se at vitamin D₃ innholdet fortsatte å øke. Det trengs eventuelt flere forsøk med lenger eksponeringstider for å finne ut om det kan gi større utslag på vitamin D₃ innholdet i egg. Man må da ta i betraktning fordeler og ulemper med UVB lys som virkemiddel. Det vil være en engangskostnad å kjøpe inn lampene, men ved bruk av lampene ved lenger eksponeringstider kan det føre til høyere kostnader og redusert levetid for lampene. Man må dermed se på om det veier opp for den positive økningen av vitamin D₃ i eggeplommen. Det kan heller ikke utelukkes negative påvirkninger på hønene av langvarig eksponering for UVB. Dette skal diskuteres senere i oppgaven.

Mattila *et al.* (2004) utførte et forsøk med berikelse av vitamin D₂ og vitamin D₃ i dietten til verpehøner. Ved å bruke to ulike mengder vitamin D₃ (6000 og 15 000 IE/kg fôr) kunne de se tydelig økning i vitamin D₃ innholdet i eggeplommen i forhold til kontrollen som hadde fått tilsatt 2 500 IE/kg fôr (P. Mattila *et al.*, 2004). I dette forsøket oppnådde de verdier på 2,5-5,0 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ eggeplomme for kontrollen, mens for høner som fikk 6000 eller 15 000 IE vitamin D₃/kg fôr varierte vitamin D₃ innholdet i eggeplommen fra henholdsvis 9,1-13,6 og 25,3-33,7 $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ eggeplomme. Kontrolleggene lå på omtrent samme vitamin D₃ nivå som kontrolleggene i vår studie. Hønene i vår studie fikk 2750 IE/kg fôr. Hønene som fikk 15 000 IE vitamin D₃/kg fôr fikk høyere verdier enn vi klarte å oppnå med våre UVB doser, mens hønene som fikk 6000 IE vitamin D₃/kg fôr lå noe under verdiene vi oppnådde med 2x30 minutter UVB, og på ca. samme verdier som ved 2x15 minutter med UVB lys.

Denne studien viste at høner eksponert for UVB lys tredoblet innholdet av vitamin D₃ i egget ved 2x30 minutter med UVB lys om dagen. Ved 4x30 var det en liten, men signifikant økning. Ett egg (60g spiselig vare) vil i disse tilfelle inneholde omkring 2,6(+/-0,56) µg vitamin D₃ etter 2x30 minutter med UVB belysning, og 2,9 µg vitamin D₃ etter 4x30 minutter med UVB belysning. Det vil si at et egg dekker 27 %/29 % av den daglige anbefalingen av vitamin D₃ på 10µg/dag. For høner som ikke var eksponert for UVB vil et egg inneholde omkring 0,9 µg vitamin D₃. Dermed kan egg påvirket av UVB lys være en god kilde til vitamin D i kosten. I Norge er det svært viktig med inntak av vitamin D via kosten, da det er lite sol deler av året. I tillegg er det også mer innendørsaktivitet blant deler av befolkningen. Det er også en fordel at et enkelt produkt ikke dekker hele den anbefalte dagsmengden, da for høyt inntak av vitamin D kan være toksisk. Økt nedbrytning av vitamin D i huden ved UVB stråling kan være en delvis forklaring på den minkende effektiviteten til vitamin D berikelse i egg via UVB lys (Kühn et al., 2015). I tillegg vil dette forhindre ukontrollert lagring av vitamin D i egget, og dermed garantere forbrukeres sikkerhet med tanke på vitamin D toksisitet.

Når vi ser på variasjonen i vitamin D₃ innhold innenfor hver behandling, kan vi se at det var størst variasjon i mai. Det var færre egg innhentet i mai enn for de andre periodene, og dermed kan usikkerheten bli større. Det var også høy variasjon i august, da lyseksponeringen var høyest. Dette tyder på at ved lenger eksponeringstid vil vitamin D₃ nivåene ligge mindre stabilt enn ved f.eks. 2x30 minutter. For å øke sikkerheten burde det vært flere gjentak. Dersom de høyest rangerte hønene var mest i front ved fôrtroa og dermed godt eksponert for UVB lys, mens de lavest rangerte hønene holdt seg mer i bakgrunnen, vil trolig forskjellene mellom dem kunne bli tydeligere ved flere eksponeringer om dagen. Dermed vil de hønene som oppholder seg nærmest UVB lyset få høyere vitamin D₃ innhold i eggene, mens de som oppholder seg lenger unna eller ikke får like stor tilgang til UVB lyset, holde seg på et lavere nivå. I Kühn *et al.* (2015) ble det observert størst variasjon blant hønene som var eksponert for 300 minutter UVB lys. Dette samsvarer med vår studie, og er dermed en indikasjon på at lengre eksponeringstider for UVB lys gir høyere variasjon.

Den laveste mengden i august (4x30) blir overlappet av høyeste mengde vitamin D₃ for de andre periodene. Det er også i august vi finner den største forskjellen mellom høyeste og laveste nivå av vitamin D₃ med 51 % forskjell. Dette tyder igjen på at det er stor variasjon i vitamin D₃ innholdet i eggene fra hønene som er eksponert for 4x30 minutter med UVB lys.

Når vi ser på variasjonene mellom bur, var standardavviket i august høyest. Standardavvikene varierte fra 0,36-0,72, en forskjell på 0,36. For å få ned variasjonen ville det vært en idé å gå inn å se på plassering og dosering av UVB lysene. Vi kan også se ut i fra resultatene at bur nr. 7 var det buret med høyest gjennomsnittlig vitamin D₃ innhold, og bur nr. 3 var buret med lavest gjennomsnittlige vitamin D₃ innhold. Dette kan tyde på at plassering av lamper på bur nr. 3 burde sjekkes for eventuell feilplassering eller dosering.

Variasjonene presentert som standardavvik innad i burene strakk seg fra 0,09 til 1,65, hvilket er en forskjell på 1,56. Det er usikkert om den store variasjonen kommer av tilfeldig variasjon eller andre faktorer. Med et større datasett og flere gjentak kunne man sett nøyere på dette.

Variasjonen kan komme av ulik eksponering for UVB lys for de ulike hønene. Selv om lampene ble slått på ved fôring trenger ikke det nødvendigvis å bety at alle hønene gikk til fôrtroa for å spise. Det kan også ha vært høner som lå nede og dermed dekket bena med fjærene. På den måten vil de ikke ha blitt eksponert for UVB lyset i lik grad som for høner som stod oppreist. Dermed kan noen ha fått mindre UVB-lys enn andre. I tillegg kan det være en medvirkende faktor at lysrørene som var montert var kortere enn selve buret. Hønene på yttersidene ville dermed ikke fått like mye UVB lys som de som holdt seg på midten.

Det ble også sett på forskjellen mellom laveste og høyeste vitamin D₃ innhold i prosent innad i burene. Ytterpunktene ble begge funnet i bur nr. 3, hvilket kan tyde på at det er avvikende høner i dette buret. En teori kan være at høner er forskjellige når det kommer til syntetisering av vitamin D, og at ikke alle høner er like kapable til å danne vitamin D, eller at ikke alle høner har like stor grad av 7-dehydrokolesterol (7-DHC) i huden.

Den begrensende faktoren for vitamin D₃ syntese er 7-DHC. Det er funnet at huden på beina til hønene inneholder mye 7-DHC, sammenliknet med andre områder, særlig områder dekket av fjær (Schutkowski et al., 2013). Dermed vil det trolig være best å plassere UVB lysene under fôrtroene slik det er gjort i dette forsøket. På den måten vil det lyse direkte på bena til hønene. Det ble observert tydelig brunere ben og rødere kammer på hønene som var eksponert for UVB lys enn for kontrollhønene. Det er trolig en effekt av UVB lyset. Schutkowski *et al.* (2013) viste 190 ganger så mye 7-DHC på ben enn i kammen (Schutkowski et al., 2013). Dermed vil det være nærliggende å tro at effekten av UVB lys på kammen med tanke på vitamin D₃ er minimal, men at det har påvirkning på pigmenteringen.

5.2 Skallkvalitet

Det ble funnet signifikant forskjell mellom bredde, eggvekt og skalltykkelse. Da forskjellene imidlertid var små, er det rimelig å tro at det var liten effekt. For eggvekt ble det observert høyest vekt for eggene fra høner som var eksponert for UVB belysning.

I et forsøk utført av Kühn *et al.* (2014) så de på vitamin D₃ innholdet i egg fra verpehøns som fikk tre ulike behandlinger. De fikk enten gå utelukkende utendørs, innendørs eller en blanding. Kühn *et al.* (2014) fant at eggvekten var høyest for de hønene som kun hadde gått innendørs, og at skalltykkelsen var høyest for de som hadde gått utendørs, men det ble ikke påvist signifikante forskjeller. I vår studie var eggvekten høyest for de hønene som var eksponert for UVB lys, og skalltykkelsen var høyest for kontrollhønene. Det ble funnet signifikante forskjeller for både skalltykkelse og eggvekt i vår studie. I forsøket til Kühn *et al.* (2014) vil det være flere faktorer som spiller inn, blant annet at hønene var frittgående og dermed er i større aktivitet enn hønene i vår studie.

Kühn *et al.* (2015) som undersøkte ulike UVB lyslengder, kunne ikke finne signifikant påvirkning av UVB lys på verken eggvekt, skalltykkelse eller knekkstyrke.

Mengde og skalltykkelse er funnet å være relatert til knekkstyrke. I tilfeller der skallvekt, prosent eggeskall og skalltykkelse er god, men knekkstyrke er relativt dårlig, ligger sannsynligvis forklaringen i skallets ultrastruktur, eller hvor god oppbyggingen av skallet er (Roberts, 2004).

I masteroppgaven til Amatya (2018) ble det sett på effekt av UVB lys på skallkvalitet og produksjonsresultater. Dette var de samme hønene brukt i vår studie. Her ble det brukt 2x30 minutter UVB lys per dag over tre måneder, og det ble ikke funnet signifikante effekter av UVB lyset på hverken skallkvalitet eller produksjonsparametere. Han fant, i likhet med Kühn *et al.* (2014) og Kühn *et al.* (2015) at eggvekten var noe høyere for eggene fra høner som ikke var eksponert for UVB lys.

Når vi ser på eggvekt gjennom hele innsettet viser resultatene at eggvekt i gjennomsnitt per høne/uke var lavere for UVB behandlingen enn for kontrollene. Dette er trolig et mer riktig resultat enn eggvekten brukt i skallkvalitetsanalysene grunnet et større datasett. Her spiller også alderseffekten inn, ved at hønene legger større egg med økende alder.

Lys har innvirkning på hønenes verpesyklus. Dersom hønene eksponeres for mye lys tidlig, vil de også begynne å verpe tidligere. Dermed vil total eggmengde øke. Derimot vil størrelsen på eggene være mindre, enn om de begynner å verpe senere (Morris, 2004). Dette gjelder også ved lengre lysdag gjennom innsettet. Det er ønskelig at eggene kommer opp i størrelse raskt, og at hønene fortsetter å gi store egg. Lewis *et al.* (1999) viste i et forsøk at høner som hadde lenger

lysdager (14 timer lys:10 timer mørke) startet å verpe tidligere enn kontrollhøner med kortere lysdag (Lewis, Morris, & Perry, 1999).

Dersom UVB lyset har gitt hønene en høyere samlet lux enn ved kun det vanlige taklyset, kan dette ha vært en medvirkende faktor til at eggvekten har vært noe lavere for hønene som har vært eksponert for UVB lys.

Schutkowski *et al* (2013) fant at produksjonsresultater, skallkvalitet og skjelettkvalitet forble uendret dersom hønene ikke fikk tilsatt vitamin D₃ i fôret, men isteden ble eksponert for UVB lys. På den måten vil UVB lyset veie opp for manglende tilsetninger i fôret. Dersom det var tilsatt vitamin D₃ i fôret, i tillegg til at hønene ble eksponert for UVB lys ble det ikke funnet forbedringer i produksjonsresultater og skallkvalitet, og konkluderte dermed med at UVB lys i tillegg til vitamin D tilsetning i fôret ikke ville ha noe å si.

Schutkowski *et al* (2013) fant at i løpet av de to første ukene av eksperimentet var skalltykkelse signifikant påvirket av vitamin D₃ i fôret. Knekkstyrken til eggene (betegnet som stabilitet i artikkelen) ble tydelig lavere utover i forsøket for eggene fra hønene som verken hadde fått UVB lys eller vitamin D₃ i fôret. Etter fire uker, altså på slutten av forsøket, lå knekkstyrken signifikant lavere enn for kontrollene. I og med at knekkstyrken til eggene i vår oppgave ikke viste noen signifikante forskjeller mellom UVB belysning og kontroller, vil det være nærliggende å tro at hønene får tilført tilstrekkelig med vitamin D₃ i fôret. På den måten vil ikke utslaget være av betydning ved eksponering for UVB lys.

I og med at det er marginale forskjeller på skallkvaliteten for kontrollhøner og høner som har vært eksponert for UVB lys, kan man anta at mengden vitamin D₃ i fôret er tilstrekkelig, og at UVB lys dermed ikke vil påvirke dette i noen særlig grad. I fôret til hønene brukt i forsøket er det tilsatt 2750 IE, hvilket er opp mot maksimumsverdiene. Den samme mengden vitamin D₃ ble brukt gjennom hele innsettet. Kalsiuminnholdet økes fra 3,70 % i starten av innsettet (19-44 ukers alder), og til 4,10 % mot slutten (64-77 ukers alder). Fosfornivåene minker fra 0,44 % i starten av innsettet til 0,38 % mot slutten. Anbefalinger for fosfor i fôret til høner er 0,35-0,45 %. Det er viktig med optimaliserte mengder av disse vitaminene og mineralene, i og med at de påvirker hverandre i stor grad, og på bakgrunn av skallkvalitetsresultatene kan det antas at dette er optimale verdier.

Det vil være nærliggende å tro at ved bruk av dietter med for lite vitamin D₃ til å dekke behovet, kan bruk av UVB lys kompensere for mangelen av vitamin D₃ via fôret med syntese av vitamin D₃ i huden.

5.3 Skjelettkvalitet

Det var signifikant forskjell på tibiavekt, Seedor index (bentetthet) og askeinnhold for skjelettkvalitetsparameterne. I likhet med verdiene for skallkvalitet var forskjellene små, og det vil også her være rimelig å tro at effekten er liten.

I denne oppgaven er det brukt Seedor index som et mål på bentetthet, og beregnes som benets vekt delt på lengden. Jo høyere verdi på Seedor index jo høyere regnes tettheten til benet å være. Det ble funnet at tettheten i ben var signifikant høyere for kontrollhønene enn for hønene som var eksponert for UVB lys.

Bentettheten er funnet å være lavere når eggproduksjonen øker, (Almeida Paz & Bruno, 2006) grunnet større behov for kalsium til eggeskallet.

Når vi kun tar i betraktning resultatene fra skallkvalitetsanalysene, kan dette forklares ved at eggene til hønene eksponert for UVB er større enn eggene til kontrollhønene. Dermed har de hatt behov for mer kalsium tilført til skallet. Om bentettheten minker på grunn av dette avhenger av kalsiumtilførselen via føret.

Det ble funnet at vekt på tibia fra UVB eksponerte høner, både før og etter tørking, var signifikant forskjellig fra kontrollhønene. Kontrollhønene hadde høyere tibiavekt, og nedgangen i vekt ved tørking var omtrent det samme for begge behandlingene. Da kontrollhønene hadde høyere tibiavekt vil det være en forklaring på at bentettheten også var høyere for disse. Et litteratursøk gjort på vitamin D₃ og effekt på tibia ga få resultater. Frost *et al.* (1990) fant at tibiavekt og benstyrke ved egglegging og ti timer etter egglegging, økte med tilsetning av vitamin D₃ og 1,25(OH)₂D₃ (Frost, Roland Sr, & Untawale, 1990).

Kalsiumhomeostase er viktig for vedlikehold av skjelettkvaliteten. I og med at forskjellene mellom skjelettkvalitet for kontrollhøner og høner eksponert for UVB lys er små, vil det være nærliggende å tro at kalsium og vitamin D tilførselen via føret er tilstrekkelig.

Det var 45 % av kontrollhønene og 36 % av hønene eksponert for UVB lys som fikk påvist kjølbeinsdeformasjoner. Av disse var det høyere grad av alvorlighet for kontrollhønene enn for hønene eksponert for UVB lys. Det er usikkert om det er grunnet UVB lyset at resultatene er bedre for hønene eksponert for UVB lys, eller om det er tilfeldige variasjoner. Fleming *et al.* (2004) fant i sin studie at høner med skader på kjølbeina, også har større sannsynlighet for svakere skjelett (Fleming, McCormack, McTeir, & Whitehead, 2004). I og med at det ble funnet så små forskjeller for tibia, og kjølbeinssvakheter ofte er knyttet opp mot svakheter i skjelettet, vil det være nærliggende å tro at det er tilfeldige variasjoner som ligger bak resultatene for kjølbeinsskadene.

5.4 Produksjonsresultater

Som vi kan se av produksjonsresultatene, ligger kontrollhønene høyere enn hønene eksponert for UVB lys i verpeprosent, og har også mindre variasjon. Mellom uke 33-36 har begge grupper et kort fall i verpeprosent. Mens kontrollgruppa holder seg relativt stabilt etter dette, ser vi flere korte fall utover i produksjonen for hønene eksponert for UVB lys. Rundt uke 57-59 ser vi et kraftig fall, og et noe mindre fall rundt uke 65-67. Schutkowski *et al.* (2013) fant ikke signifikant effekt av UVB lys på verpeprosent i sin undersøkelse. Det ble observert noe minkende verpeprosent mot slutten av eksperimentet for hønene som verken var eksponert for UVB lys eller hadde fått tilført vitamin D i føret (Schutkowski *et al.*, 2013). Droppene i vår studie kan komme av at høner som har fått UVB lys er mer påvirkelige for små endringer enn kontrollhønene. Etter en gjennomgang av resultatene ble det funnet at en dag i uke 58 var det samlet inn 0 egg fra hønene som hadde fått UVB belysning. Dette kan være en registreringsfeil, og vil være en feilkilde.

Kühn *et al.* (2015) observerte ingen forskjeller i verken fôrintak eller verpeprosent for høner eksponert for UVB lys og kontrollhøner.

Det var høyere dødelighet blant hønene som ikke var eksponert for UVB lys. Dette kan være tilfeldig variasjon, og det vil være vanskelig å trekke en konklusjon uten gjentak.

Det ble funnet høyere andel klink- og knekkegg hos hønene som var eksponert for UVB lys. I forhold til teorien om at skallkvaliteten øker med optimal tilførsel av vitamin D₃ og kalsium vil dette være motstridende. Det er nærliggende å tro at det er tilfeldig variasjon, da forskjellene ikke er store. Etter knekkstyrketesten ble det også konstatert at det ikke var signifikante forskjeller mellom knekkstyrken til de to gruppene. Dette støtter opp under at det var tilfeldige forskjeller.

I forsøket til Mattila *et al.* (2004) nevnt tidligere i oppgaven hvor de utførte et forsøk med berikelse av vitamin D₂ og vitamin D₃ i dietten til verpehøner ble det ikke sett forskjeller på produksjonsparametere, og heller ingen skader på indre organer ved obduksjon på slutten av forsøket (P. Mattila *et al.*, 2004).

Det er både styrker og svakheter ved denne studien. Blant annet kunne det vært samlet inn flere egg til hver analysering. Hadde det vært bedre tid ville det også kunne vært mulig å gjøre skallkvalitetsanalyser etter hver innsamling, og ikke bare analyser av vitamin D₃ innholdet. Det ville muligens vært en idé å forlenge intervallene, slik at vitamin D₃ nivåene kunne komme seg opp i samme nivå som før vi endret tider, da det kunne virke som nivåene brukte

lenger tid enn 4 uker på å stabilisere seg. På den måten kunne muligens utslagene på 4x30 minutter med UVB lys vært annerledes.

Det ville også vært interessant å gjøre flere målinger på skjelettkvalitet. Flere studier har blant annet undersøkt knekkstyrke på tibia og kjølbein. På den måten kunne disse resultatene blitt sammenliknet, og man kunne dermed fått et større grunnlag for diskusjon.

I og med at kontrollhøner og høner eksponert for UVB lys var plassert i ulike rom, kan det ha vært en påvirkning fra rommet som kan ha ført til den noe lavere verpeprosenten for UVB hønene. Et eksempel på en faktor som kan påvirke verpeprosent kan være varmestress. I tillegg kan UVB lyset ha ført til stress, og kan være en mulig forklaring på lavere produksjonsresultater. I starten av pilotforsøket til Løvkvam-Køster ble det forsøkt satt på UVB lys før fôring, og det ble observert tydelige reaksjoner fra hønene. Videre i forsøket ble UVB lysene satt på 1-2 minutter etter fôringsstart, og det ble heretter ikke observert reaksjoner fra hønene. Det var plassert kameraer inne hos hønene slik at de kunne observeres uten forstyrrelser.

Effekt av etasje er også en faktor som kunne vært interessant å se på. Hønene i de øverste burene får mer lys enn hønene i underetasjen. Hønene som ble eksponert for UVB lys var alle plassert i underetasjen. Dermed ville det vært en mulighet å undersøke om det er forskjeller mellom høner i de ulike etasjene. En svakhet ved dette eksperimentet var at eggene brukt i vitamin D analysene og skallkvalitetsanalysene var hentet fra ulike etasjer. UVB hønene var plassert i underetasjen, mens kontrollhønene var i overetasjen. Dermed kan en ikke utelukke etasjepåvirkning.

Den største svakheten ved dette forsøket er mangelen på gjentak. For sikrere resultater vil det være nødvendig med flere forsøk.

6. Konklusjon

I denne oppgaven var det meningen å besvare hypotesene, 1) vitamin D₃ innholdet i egg vil øke med økt intensitet av UVB-lys og 2) UVB lyset vil ha positiv effekt på skallkvalitet, skjelettkvalitet og produksjonsresultater.

Ut ifra resultatene oppnådd på vitamin D₃ analyser vil det være mulig å konkludere med at UVB lys ved ulike tidsintervaller vil ha effekt på vitamin D₃ innholdet i egg. Kurven er ikke lineær, men flater ut ved lenger eksponeringstider, hvilket kan tyde på at lang eksponering vil ha mindre effekter enn kortere eksponering. Dermed kan det være nærliggende å tro at 2x30 minutter UVB belysning er den optimale belysningstiden.

Mangel på gjentak, i tillegg til medvirkende effekter av rom og etasje, gjør det vanskelig å si noe sikkert angående skallkvalitet, skjelettkvalitet og produksjonsresultater. Ut ifra resultater i denne oppgaven, og resultater fra andre studier, vil det være nærliggende å tro at UVB lys ikke har noen effekt på disse parameterne, og at vitamin D₃ innholdet i fôret er tilstrekkelig.

7. Referanser

- Åbro, A. (2009). *Eggeskall. I Store norske leksikon*. Hentet 10. april 2019 fra <https://snl.no/eggeskall>
- Almeida Paz, I., & Bruno, L. (2006). Bone mineral density. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 8(2), 69-73.
- Bagley, M. F. (2016). *Fjørfeboka* (2. utg. ed.). Bergen: Fagbokforl.
- Bar, A. (2008). Calcium homeostasis and vitamin D metabolism and expression in strongly calcifying laying birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(4), 477-490.
- Bar, A., & Hurwitz, S. (1987). Vitamin D metabolism and calbindin (calcium-binding protein) in aged laying hens. *The Journal of nutrition*, 117(10), 1775-1779.
- Bar, A., Razaphkovsky, V., & Vax, E. (2002). Re-evaluation of calcium and phosphorus requirements in aged laying hens. *British poultry science*, 43(2), 261-269.
- Casey-Trott, T., Heerkens, J., Petrik, M., Regmi, P., Schrader, L., Toscano, M. J., & Widowski, T. (2015). Methods for assessment of keel bone damage in poultry. *Poultry science*, 94(10), 2339-2350.
- Christakos, S. (2012). Recent advances in our understanding of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 regulation of intestinal calcium absorption. *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(1), 73-76.
- Dacke, C., Arkle, S., Cook, D., Wormstone, I., Jones, S., Zaidi, M., & Bascal, Z. (1993). Medullary bone and avian calcium regulation. *Journal of Experimental Biology*, 184(1), 63-88.
- Fleming, R., McCormack, H., McTeir, L., & Whitehead, C. (2004). Incidence, pathology and prevention of keel bone deformities in the laying hen. *British poultry science*, 45(3), 320-330.
- Frost, T., Roland Sr, D., & Untawale, G. (1990). Influence of vitamin D3, 1 α -Hydroxyvitamin D3, and 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 on eggshell quality, tibia strength, and various production parameters in commercial laying hens. *Poultry science*, 69(11), 2008-2016.
- Gregory, N., & Wilkins, L. (1996). Effect of age on bone strength and the prevalence of broken bones in perchery laying hens. *New Zealand veterinary journal*, 44(1), 31-32.
- Hester, P. Y. (2017). Improving Egg Production and Hen Health with Calcium. In *Egg Innovations and Strategies for Improvements* (pp. 319-329): Elsevier.
- Hincke, M. T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A. B., & McKee, M. D. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front Biosci*, 17(1266), 80.
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3), 266-281.
- Jakobsen, J., Clausen, I., Leth, T., & Ovesen, L. (2004). A new method for the determination of vitamin D 3 and 25-hydroxyvitamin D 3 in meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(6), 777-787. doi:10.1016/j.jfca.2003.10.012
- Jones, G., Prosser, D. E., & Kaufmann, M. (2012). 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of biochemistry and biophysics*, 523(1), 9-18.
- Jones, G., Strugnell, S. A., & DeLUCA, H. F. (1998). Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological reviews*, 78(4), 1193-1231.
- Kühn, J., Schutkowski, A., Hirche, F., Baur, A. C., Mielenz, N., & Stangl, G. I. (2015). Non-linear increase of vitamin D content in eggs from chicks treated with increasing exposure times of ultraviolet light. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 148, 7-13.
- Kühn, J., Schutkowski, A., Kluge, H., Hirche, F., & Stangl, G. I. (2014). Free-range farming: A natural alternative to produce vitamin D-enriched eggs. *Nutrition*, 30(4), 481-484.
- Lewis, P., & Gous, R. (2009). Responses of poultry to ultraviolet radiation. *World's poultry science journal*, 65(3), 499-510.
- Lewis, P., Morris, T., & Perry, G. (1999). Light intensity and age at first egg in pullets. *Poultry science*, 78(8), 1227-1231.
- Lupu, C., & Robins, S. (2013). Determination of a safe and effective ultraviolet B radiant dose in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): a pilot study. *Journal of avian medicine and surgery*, 269-279.

- Mattila, P., Lehtikainen, K., Kiiskinen, T., & Piironen, V. (1999). Cholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol content of chicken egg yolk as affected by the cholecalciferol content of feed. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 4089-4092.
- Mattila, P., Valaja, J., Rossow, L., Venäläinen, E., & Tupasela, T. (2004). Effect of vitamin D2- and D3-enriched diets on egg vitamin D content, production, and bird condition during an entire production period. *Poultry science*, 83(3), 433-440.
- Mattila, P. H., Valkonen, E., & Valaja, J. (2011). Effect of Different Vitamin D Supplementations in Poultry Feed on Vitamin D Content of Eggs and Chicken Meat. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011 v.59 no.15(no. 15), pp. 8298-8303. doi:10.1021/jf2012634
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal nutrition* (7th ed. ed.). Harlow: Prentice Hall.
- Mendes, A., PAZ, I. A., Vulcano, L., Takahashi, S., Garcia, R., Komiyama, C., & Balog, A. (2006). *Bone mineral density and bone quality characteristics of broiler breeders*. Paper presented at the EPC 2006-12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14 September, 2006.
- Morris, T. (2004). Environmental control for layers. *World's poultry science journal*, 60(2), 163.
- Nasr, M., Murrell, J., & Nicol, C. (2013). The effect of keel fractures on egg production, feed and water consumption in individual laying hens. *British poultry science*, 54(2), 165-170.
- Nasr, M. A., Nicol, C. J., & Murrell, J. C. (2012). Do laying hens with keel bone fractures experience pain? *PloS one*, 7(8), e42420.
- Nys, Y., Bain, M., & Van Immerseel, F. (2011). *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Volume 1: Egg Chemistry, Production and Consumption*: Elsevier.
- Nys, Y., & Guyot, N. (2011). Egg formation and chemistry. In *Improving the safety and quality of eggs and egg products* (pp. 83-132): Elsevier.
- Pike, J. W., & Meyer, M. B. (2012). The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Rheumatic Disease Clinics*, 38(1), 13-27.
- Pike, J. W., Zella, L. A., Meyer, M. B., Fretz, J. A., & Kim, S. (2007). Molecular actions of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on genes involved in calcium homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(S2), V16-V19.
- Proszkowiec-Weglarz, M., & Angel, R. (2013). Calcium and phosphorus metabolism in broilers: Effect of homeostatic mechanism on calcium and phosphorus digestibility. *The Journal of Applied Poultry Research*, 22(3), 609-627. Retrieved from <https://doi.org/10.3382/japr.2012-00743>. doi:10.3382/japr.2012-00743
- Riber, A. B., Casey-Trott, T. M., & Herskin, M. S. (2018). The influence of keel bone damage on welfare of laying hens. *Frontiers in veterinary science*, 5, 6.
- Roberts, J. R. (2004). Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *The Journal of Poultry Science*, 41(3), 161-177.
- Schutkowski, A., Krämer, J., Kluge, H., Hirche, F., Krombholz, A., Theumer, T., & Stangl, G. I. (2013). UVB exposure of farm animals: study on a food-based strategy to bridge the gap between current vitamin D intakes and dietary targets. *PloS one*, 8(7), e69418.
- Spiro, A., & Buttriss, J. L. (2014). Vitamin D: An overview of vitamin D status and intake in Europe. *Nutrition Bulletin*, 39(4), 322-350. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/nbu.12108>. doi:10.1111/nbu.12108
- Taylor, T., & Moore, J. (1954). Skeletal depletion in hens laying on a low-calcium diet. *British Journal of Nutrition*, 8(2), 112-124.
- Tian, X. Q., Chen, T., Lu, Z., Shao, Q., & Holick, M. F. (1994). Characterization of the translocation process of vitamin D3 from the skin into the circulation. *Endocrinology*, 135(2), 655-661.
- Veum, T. (2010). Phosphorus and calcium nutrition and metabolism. *Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals*, 94-111.
- Whitehead, C., & Fleming, R. (2000). Osteoporosis in cage layers. *Poultry science*, 79(7), 1033-1041.
- Wilkins, L., McKinstry, J., Avery, N., Knowles, T., Brown, S., Tarlton, J., & Nicol, C. (2011). Influence of housing system and design on bone strength and keel bone fractures in laying hens. *Veterinary Record*, vetrecd4831.

Vedlegg

Vedlegg 1: Standardisert metode for å skille eggeplomme fra eggehvite

Utstyr:

- Laboratorievekt med vindskydd
- Eggeskiller
- Beholder til rester
- Plastikkbeholder
- Frysetape
- Tusj

1. Hele egget ble veid på en laboratorievekt med vindskydd. Vekten ble notert.
2. Eggeskallet ble knust med et lite dunk i benkeplaten.
3. Eggeplomme og –hvite ble overført til en eggeskiller.
4. Innholdet ble overført fram og tilbake mellom to eggeskillere, slik at eggehviten kunne renne gjennom åpninger under og på siden. Totalt 4 forflytninger (ikke flere for at plommen ikke skulle bli for tørr og sprekke)
5. På undersiden av eggeskilleren ble eventuelle rester fra eggehviten fjernet manuelt.
6. Eggeplommen ble overført til en plastikkbeholder
7. Plastikkbeholderen ble nummerert med dato og burnummer. Dette ble gjort både på frysetape på lokket, samt på beholderen med en tusj.
8. Laboratorievekten ble nullstilt ved hjelp av plastikkbeholderen uten lokk.
9. Eggeplommen (plastikkbeholderen uten lokk) ble deretter veid. Vekten ble notert.
10. Ferdigveid eggeplomme ble plassert for seg.
11. Alle stegene ble gjentatt for hvert egg.
12. Da alle eggeplommene var klare ble de satt på -80°C for lagring.

Vedlegg 2: Prosedyre – analysering av vitamin D₃

Prøvepreparering og forsåpning

- Sette erlenmeyerkolbe på laboratorievækt og nullstille vekten
- Overføre tint eggeplomme i 250 mL erlenmeyerkolbe og veie. Vekten noteres.
- Tilsette magnet-rører
- Tilsette 20 mL askorbinsyre (10% w/v løst i destillert H₂O)
- Løs opp eggeplommen
- Tilsette:
 - 1 mL intern standard
(D₂ løst i Metanol) – tilsvarer 1 µg hvis C = 1 µg/mL)
 - 50 mL kaliumlut/KOH (50 % w/v, i destillert H₂O)
 - 100 mL Etanol (99%)

- Boble med N₂-gass i 30 sekunder
- Forsegl med parafilm
- Sett på røring over natten (romtemperatur)

Væske-væske ekstraksjon

- Prøven helles i 500 mL separasjonstrakt
- Ekstraher x2 med 150 mL petroleumseter:dietyl eter (1:1) i 2 min
 - Nederste fase (vandig) tappes ut og samples opp for ekstraksjon nr. 2
 - Øverste fase (eter) tappes ut og spares
- Kombiner eter-ekstraktene – vask med destillert H₂O til nøytral pH (5 x 50 mL)
 - Nederste fase kastes (vandig)
 - Øverste fase tørkes med Na₂SO₄ og filtreres med rundfilter
- Damp inn over natt i romtemperatur

Fastfase ekstraksjon

Mega Bond Elut Silica SPE, 2 g, 12 mL

- Kondisjoner: 20 mL heptan

- Påsett prøve
- Vask: 20 mL heptan
- Vask: 50 mL, 0,5 % isopropanol i heptan
- Eluere D₂ og D₃: 35 mL, 0,5 % isopropanol i heptan
- Damp inn, reløse i 2mL heptan

Semipreparativ Normal fase –LC

- Kolonne: Ascentis®Si(25cm x 4.6mm, 5µm)
- UV: 264 nm
- Mobilfase: heptan:isopropanol (99:1)
- Flow rate: 1mL/min
- Injeksjonsvolum: 0,5 mL
- Samle opp fraksjoner mellom 8 og 16 min
- Damp inn, reløse i 200 µL MeOH

Kvantifisering RP-LC

- Kolonne: SUPELCO SIL™LC-18 (15cm x 4.6mm, 5µm)
- UV: 264 nm
- Mobilfase: Metanol:H₂O (94:6)
- Flow rate: 1mL/min
- Injeksjonsvolum: 0,05mL
- Gradient pumpe, Ultimate 3000 (Dionex)
- Autosampler, Ultimate 3000 (Dionex)
- UV detektor, Ultimate 3000 Variable Wavelength detector (Dionex)
- Labdataprogram, Chromeleon (Dionex)



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway