

# MASTEROPPGAVE

Emnekode: AK306F - Masteroppgave i havbruk  
Navn / kandidatnr.: Ole-Martin Laugen

---

Utnyttelse av mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica* ved to innblandingsnivåer av preekstrudert biomasse sammenlignet med ingen forbehandling

---

Dato: 28.05.2021

Totalt antall sider: 63

# Innholdsfortegnelse

Innholdsfortegnelse .....	i
Forord .....	iv
Abstract .....	v
Sammendrag .....	vi
1.0 Introduksjon .....	1
1.1 Generelt om akvakultur .....	1
1.2 Produksjon av atlantisk laks .....	1
1.3 Produksjon av atlantisk laks i Norge .....	2
2.0 Bakgrunn .....	4
2.1 Produksjon av laksefôr ved hjelp av ekstruderings teknologi .....	4
2.2 Fôringredienser i akvakultur .....	5
2.2.1 Marine råvarer utgjør en mindre andel av fôr til laks .....	5
2.4 Plantebaserte ingredienser i fôr til atlantisk laks .....	7
2.4.1 Andre alternative fôringredienser til laksefôr .....	9
2.4.1.1 Biprodukt av kyllingmel .....	9
2.4.1.2 Blodmel .....	10
2.4.1.3 Mel fremstilt av bakterier .....	11
2.4.1.4 Insekter som fôringrediens .....	11
2.5 Mikroalger i akvakultur .....	11
2.5.1 Næringsprofil til mikroalger .....	13
2.5.2 Aminosyresammensetning .....	13
2.5.3 Fettsyresammensetning .....	14
2.5.4 Andre biokjemiske komponenter fra mikroalger .....	14
2.6 Fordeler ved bruk av mikroalger .....	15
2.7 Utfordringer ved bruk av mikroalger .....	16
2.8 Studiets hypotese og mål .....	16

Hypoteser .....	17
3.0 Material og metode.....	18
3.1 Forsøksfôret.....	18
3.2 Fisk og innledende fôringsregime .....	20
3.3 Uttak av forsøksindivid for prøvetaking og analyser .....	21
3.4 Kjemiske analyser .....	22
2.4.1 Fuktighetsanalyse .....	22
2.4.2 Askeanalyse.....	23
2.4.3 Fettanalyse av fôr og gjødsel.....	23
2.4.4 Proteinanalyse .....	23
3.5 Kalkulasjoner og statistiske analyser .....	24
4.0 Resultater.....	26
4.1 Vekt helfisk .....	26
4.2 Lengde.....	27
4.3 Spesifikk vekstrate (SGR).....	28
4.4 Vektøkning i prosent .....	29
4.5 Fôrintak, fôrfaktor, protein effektivitetsrate og kondisjonsfaktor .....	30
4.6 Kjemisk sammensetning .....	31
4.7 Fettsyresammensetning .....	32
5.0 Diskusjon.....	35
5.1 Effekt av fôr på vekst .....	35
5.2 Effekt av fôr på kjemisk sammensetning .....	37
5.3 Effekt av fôr på fettsyresammensetning .....	38
6.0 Konklusjon .....	42
7.0 Litteraturliste .....	44

## Liste over figurer

Figur 1: Fôrfaktor hos ulike dyrearter. Illustrasjon hentet fra Skretting. ....	2
Figur 2: Salg av laks og regnbueørret i Norge (SSB, 2020) .....	3
Figur 3: Endringer i fôrsammensetningen fra 1990-2016 (Ytrestøyl et al., 2015) (Aas et al., 2019).....	5
Figur 4: Helfisk vekt (gjennomsnitt $\pm$ SD av sluttvekt) av laksen fôret med ulike nivå av mikroalger (Nannochloropsis Oceanica.).....	26
Figur 5: Helfisk vekt (gjennomsnitt $\pm$ SD) av laksen fôret med ulike nivå av mikroalger (Nannochloropsis Oceanica). ....	27
Figur 6: Spesifikk vekstrate (gjennomsnitt $\pm$ SD) hos atlantisk laks fôret med ulike nivå av mikroalger (Nannochloropsis Oceania).....	28
Figur 7: Total vektøkning i prosent (%) hos atlantisk laks fôret med ulikt nivå av mikroalgen (Nannochloropsis Oceanica) .....	29

## Liste over tabeller

Tabell 1: Ingredienser i forsøksfôr vist i prosent. ....	19
Tabell 2: Estimert sammensetning av forsøksfôr. ....	20
Tabell 3: Analysert kjemisk sammensetning og energiinnhold av de ulike forsøksfôrene.....	20
Tabell 4: Fôrfaktor, proteineffektivitetsrate og kondisjonsfaktor hos atlantisk laks fôret med ulikt nivå av mikroalgen (Nannochloropsis Oceanica) .....	30
Tabell 5: Kjemisk sammensetning og energi innhold av helfisk laks (Gjennomsnitt $\pm$ SD) fôret med dietter med ulikt nivå mikroalger (Nannochloropsis Oceania).....	31
Tabell 6: fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i filetene hos atlantisk laks (Salmo Salar L) fôret med de ulike forsøksfôrene.....	34

## Forord

Denne oppgaven er en avsluttende del av masteroppgave i akvakultur (AK306F), oppgaven teller 60 av totalt 120 studiepoeng. Den skal sluttstilles over 2 år ved masterstudiet på Nord Universitet. Forsøket ble gjennomført under akvakulturgruppen på fakultet for biovitenskap og akvakultur (FBA).

Jeg vil begynne med å takke min hovedveileder Mette Sørensen for at jeg fikk delta på hennes prosjekt, samt hjelpsomhet og støtte gjennom studiet og med denne masteroppgaven. Jeg vil også takke Anjana Palihawadana for å ha lært meg svært mye om laboratoriesikkerhet, laboratorieprotokoller og for at du har brukt mye av din tid til å vise meg hvordan laboratorieanalysene skal gjennomføres. Ditt gode humør har gjort tiden på laboratoriet til en lek. Det har vært en flott opplevelse å få være med på møter og delta i mange interessante diskusjoner med dere. Tilbakemeldingene deres har bidratt til å gjøre meg til en dyktigere student.

Jeg har møtt mange flotte mennesker i løpet av mine studieår og vil takke alle, spesielt Benedikte, Brandon og Vilde for gode stunder og samtaler. Jeg har møtt mange flinke mennesker med verdifull kunnskap om laboratoriearbeid og akvakultur generelt.

Vil også takke Stina for hennes tilstedeværelse under koronatiden og for smittende arbeidsmoral de gangene jeg har stått stille. Sist, men ikke minst min far og mor for støtte og motivasjon over årene som har gått.

Jeg vil takke mine veiledere på Nord Universitet, Mette for hennes veiledning gjennom prosjektet. Tilbakemeldingene fra dere har vært med på å utvikle meg som student, slik at jeg har blitt bedre til å strukturere og skrive en bedre oppgave.

Jeg håper at du vil finne det du trenger når du leser denne forskningsartikkelen. Hvis du har noen spørsmål eller kommentarer, ta kontakt.

Bodø, 21. Mai, 2020

Ole-Martin Laugen

## Abstract

Norway is the world's largest producer of Atlantic Salmon (*Salmo Salar L*), a quality food product. The industry needs environmentally friendly solutions to overcome some of its challenges, and one of the recent focus areas has been sustainable feed resources. Microalgae is one of the suggested solutions. The use of microalgae in fish feed is dated back to early 2010. Microalgae is not a consistent biomass and there are individual differences in nutrition quality among the various species. It is therefore a need to investigate the nutritional potential for different species. Even though some feed producers use microalgae derived feed ingredients, such as oil, in fish feed there is still lack of knowledge about use of whole biomass. The aim of this study was to investigate the effect of pre-processing and levels of incorporation of *Nannochloropsis Oceanica* in salmon feed. Fish meal and fish oil was replaced with microalgae at 7.5% and 15% pre-processed and 15% without pre-processing. Biometric data (weight, length) was measured at start of the experiment and after termination (9 weeks). Samples to analyze chemical composition and fatty acid composition were also collected at the same time points. The start weight ranged from  $141.7\text{g} \pm 27.8\text{g}$  –  $142.0\text{g} \pm 27.2\text{g}$  at start of the experiment, and there were no mortalities. Final weights ranged from  $356.5\text{ g} \pm 5.53\text{g}$  to  $315.6\text{ g} \pm 7.0\text{ g}$ . The control group had significantly higher final weight compared to the other groups, and there were no significant differences between incorporation level or between the processed and unprocessed groups. Significant growth rate (SGR) and thermal growth coefficient (TGC) were significantly higher in the control group compared to the groups fed with microalgae. Feed intake (FI) was significantly higher in the groups fed 15% microalgae compared to group fed 7.5% microalgae and control group. Feed conversion ratio (FCR) was significantly higher in the control group compared to the groups fed with microalgae. Protein efficiency rate (PER) was significantly higher in the control group and group fed 7.5% microalgae compared to groups fed 15% microalgae. Condition factor (CF) was significantly higher in control group compared to 15 % microalgae groups, also higher than group fed 7.5% microalgae but not significant. Chemical composition varied among the groups fed different experimental feeds. Groups which had microalgae incorporated in the feed had a beneficial fatty acid profile with significantly higher content of PUFA compared to the control group. Levels of EPA and DHA were also significantly higher compared to the control. The results at 7.5% microalgae are more favourable than 15%. The results showed no advantages by pre-processing the microalgae at 15% incorporation in the feed.

## Sammendrag

Norge er verdens største produsent av atlantisk laks (*Salmo Salar L*), et kvalitets matprodukt. Oppdrettssektoren trenger miljøvennlige løsninger for å løse noen av utfordringene, og en av de senere fokusområdene er bærekraftige fôrressurser. Bruk av mikroalger har pågått siden tidlig 2010-tallet. Mikroalger er ikke en konsistent biomasse og forskjellige arter varierer i kvalitet på næringsstoffer. Det er derfor et behov for å undersøke næringspotensialet i forskjellige arter. Selv om noen fôrprodusenter bruker fôringredienser basert på mikroalger, som olje til fiskefôr mangler det fortsatt kunnskap om bruk av hel biomasse. Målet med denne studien var å undersøke effekten av forprosessering og nivåer av innblanding av *Nannochloropsis Oceanica* i laksefôr. Fiskemel og fiskeolje ble erstattet med den forprosesserte mikroalgen ved 7.5% og 15% og 15 % uten forprosessering. Biometriske data (Vekt, lengde) ble målt ved start av forsøket og ved avslutning (9 uker). Prøver for å analysere kjemisk sammensetning og fettsyresammensetning ble også tatt ved samme tidspunkt. Vekten varierte fra  $41,7 \text{ g} \pm 27,8 \text{ g}$  -  $142,0 \text{ g} \pm 27,2 \text{ g}$  ved starten av eksperimentet, og det var ingen dødelighet. Sluttvekten varierte fra  $356,5 \text{ g} \pm 5,53 \text{ g}$  til  $315,6 \text{ g} \pm 7,0 \text{ g}$ . Kontrollgruppen hadde signifikant høyere sluttvekt sammenlignet med gruppene som hadde mikroalgen i fôret, og det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene som fikk mikroalgen i fôret. Spesifikk vekstrate (SGR) og vekstfaktor 3 (TGC) var signifikant høyere i kontrollgruppen sammenlignet med gruppene fôret med mikroalgen. Forinntak (FI) var signifikant høyere i gruppene som hadde 15% innblanding av mikroalgen i fôret sammenlignet med gruppen som hadde 7.5% innblanding og kontrollgruppen. Fôrfaktoren (FCR) var signifikant høyere i kontrollgruppen sammenlignet med gruppene som fikk mikroalgen i fôret. Proteineffektivitetsraten (PER) var signifikant høyere i kontrollgruppen og gruppen som hadde 7.5% av mikroalgen sammenlignet med gruppene som hadde 15% av mikroalgen. Kondisjonsfaktor (CF) var signifikant høyere i kontrollgruppen sammenlignet med gruppene som hadde 15% innblanding, også høyere enn gruppen som fikk 7.5% mikroalge, men ikke signifikant. Kjemisk sammensetning varierte blant gruppene som fikk forskjellige forsøksfôr. Gruppene som hadde mikroalgen i fôret hadde en gunstigere fettsyreprofil med signifikant høyere innhold av PUFA sammenlignet med kontrollgruppen. Nivåer av EPA og DHA var også signifikant høyere i gruppene som fikk mikroalgen i fôret sammenlignet med kontrollgruppen. Resultatene ved 7.5% innblanding av mikroalgen var gunstigere enn ved 15%. Resultatene viste ingen fordeler med å forprosessere mikroalgen ved 15% innblandingsnivå.

Key words: Atlantic Salmon, microalgae, *Nannochloropsis Oceanica*, extrusion, pre-processing, growth, proximate composition, fatty acid composition.

Nøkkelord: atlantisk laks, mikroalge, *nannochloropsis oceanica*, ekstrudering, forprosessering, vekst, kjemisk sammensetning, fettsyresammensetning.



## Liste over forkortelser

ANOVA	Variansanalyse
BL	Kroppslengde fisk
Cm	Centimeter
DHA	Docosahexaensyre (Docosahexaenoic acid)
EAA	Essensielle aminosyrer
EPA	Icosapentaensyre (Eicosapentaenoic acid)
FAO	Food and Agriculture organization
g	Gram
K	Kondisjonsfaktor
Kg	Kilogram
L	Liter
M	Mean (Gjennomsnitt)
mm	Millimeter
MUFA	Enumettet fettsyre (mono unsaturated fatty acid)
<i>p</i> – Verdi	Sannsynlighet ( $\alpha$ -nivå)
PUFA	Flerumettet Fettsyre (poly unsaturated fatty acid)
SD	Standardavvik
SFA	Mettet fettsyre (saturated fatty acid)
Sp.	Species (norsk = art)
T	Tid (dager)
W	Vekt

# 1.0 Introduksjon

## 1.1 Generelt om akvakultur

Verdensbefolkningen var ved inngangen av 2021 7,8 milliarder, og den forventes å øke til 8,5 milliarder fram mot 2030 (FN, 2020). Hvordan man skal kunne forsyne alle med mat, og især sunn mat vil bli en sentral problemstilling. Befolkningsøkningen har ført til en økt etterspørsel av fisk, da fisk er en meget god kilde til proteiner og fett.

Fiskeri og akvakultursektoren har ekspandert betydelig over de siste tiårene som følge av økt etterspørsel. Totalproduksjon, kjøp og salg satt en rekord i 2018. Siden tidlig 1990 har fangsten i fiskeri økt med 14% og akvakulturproduksjon økt med hele 527%. Etterspørsel av fisk har økt med 122% (FAO, 2020). Bærekraftig utvikling av havbruk og effektiv fiskeriforvaltning er avgjørende for å opprettholde økende produksjon. Suksessen som er oppnådd med god fiskeforvaltning i noen land og regioner har imidlertid ikke vært tilstrekkelig til å reversere den globale trenden med overfiske. Det er god dokumentasjon på at kunnskapsbasert forvaltning i fiskeri gjør at fiskebestander holdes på et ønsket nivå, og kan også bidra til at bestandene kan øke.

På steder der fiskeriforvaltningen ikke fungerer eller er ineffektiv, er fiskebestanden truet og situasjonen kan forverres. Selv om 78,7% av all fangst fra havfisket kommer fra biologisk bærekraftige bestander, viser de ulike fiskeriforvaltningene et presserende behov for å breie ut og tilpasse kunnskapsbasert forvaltningspolicy (FAO,2020). Det må gjøres mer for å sikre at fiskeri og havbruk over hele verden er bærekraftig.

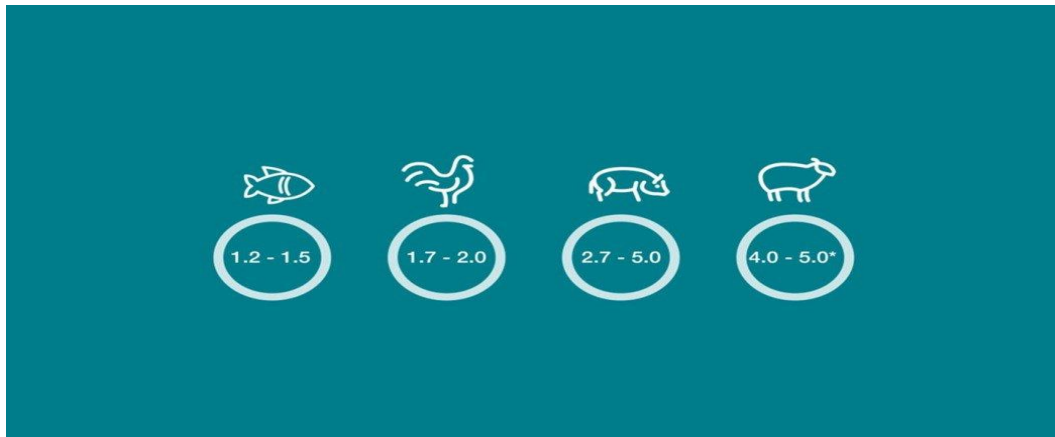
Det er forventet at akvakultur kommer til å øke fremover, noe som vil føre til økende etterspørsel etter fôringredienser som brukes i dag. Prisen på fiskemel og fiskeolje øker. Det har fått næringen til å se etter andre fôrressurser. Noen av de lovende alternativene til fisk som fôringrediens er per dags dato alger, insekter og soya.

## 1.2 Produksjon av atlantisk laks

Akvakulturproduksjon av atlantisk laks er datert tilbake til før 1900-tallet (FAO, 2004). Over 50 % av globalt akvakulturmarked består av oppdrettet atlantisk laks (*Salmo salar L*) (Solar, 2009). I 2014, var totalproduksjonen på 2.3 millioner tonn. Selv om dette er relativt lite sammenlignet med andre arter er atlantisk laks et høyverdiprodukt på det globale fiskemarkedet. Fisk som karper, barber og annen fisk innen karpefamilien har en samlet

produksjon på 28.3 millioner tonn i 2017 (FishStat, FAO, 2020). Verdens totale akvakulturproduksjon på akvatiske dyr var i 2018 på 82.1 millioner tonn.

Oppdrett av atlantisk laks er bærekraftig sammenlignet med produksjon av kjøtt fra landdyr. Karbonavtrykket til oppdrettet laks er 2.9 kg karbon per kg spiselig produkt (Winther et al., 2009). Dette tallet er vesentlig lavere enn hos terrestriel kjøttproduksjon av kylling, svin og ku (Clune et al., 2017).

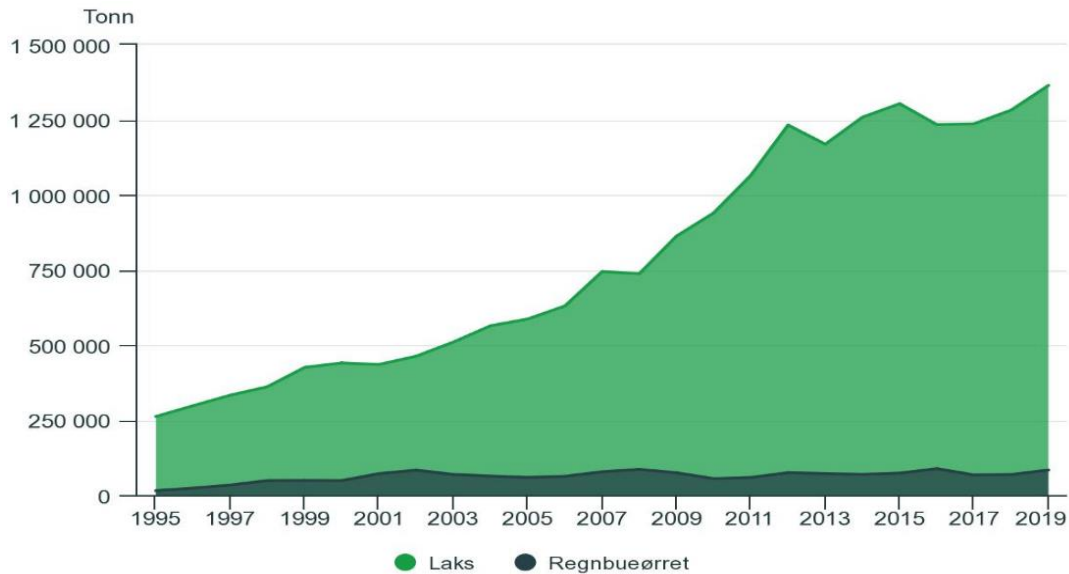


Figur 1: Førfaktor hos ulike dyrearter. Illustrasjon hentet fra Skretting.

Atlantisk laks er også overlegent landdyr når det gjelder til nyttegjøring av næring i fôr (Protein, lipider og energi) (Ytrestøyl et al., 2015). Andre bærekraftsindikatorer i laksenæringen som fisk inn/fisk ut rate (FIFO) så vel som «Forage Fish Dependency Ratio» (FOFDR) har også vist stor forbedring de siste tiårene (Ytrestøyl et al., 2015).

### 1.3 Produksjon av atlantisk laks i Norge

Norsk lakseoppdrett startet sent på 1960- tidlig 1970-tallet (Ford, 1984). Oppdrett av atlantisk laks i Norge begynte som en tilleggsnæring hos bønder i kystdistriktene. Flere tiår senere har fisk blitt den en av de viktigste eksportartiklene i Norge rett etter råolje og naturgass (SSB, 2020). Fra oppdrettsnæringen oppsto og frem til i dag har det skjedd svært store endringer i mengden fisk som blir produsert. På 1990 tallet ble det produsert rundt 150,000 tonn, til sammenligning ble det produsert mer enn 1.35 millioner tonn i 2019. Med dette sørger laks for 95% av totalt volum av akvakulturproduksjonen i Norge (SSB, 2020). Denne økningen i produksjon og salg er presentert i figur 2 og er som tidligere nevnt en av grunnene til at man ser etter alternative fôrråvarer.



Figur 2: Salg av laks og regnbueørret i Norge (SSB, 2020)

I 2019 var den totale produksjonen av atlantisk laks i Norge på 1.36 millioner tonn med en førstehåndsverdi på 68 milliarder kroner. (SSB, 2020). Norge er verdens største produsent av atlantisk laks med 55.3 % av det globale markedet, etterfulgt av Chile, Skottland, og Canada med markedsandeler på henholdsvis 25.4%, 7,6% og 6%.

Suksesshistorien ved produksjonen av Norsk atlantisk laks kan tilskrives flere utviklingstrekk. De viktigste nyvinningene var innføringen av avl gjennom familiesелеksjonsprogram, utvikling av høykvalitetsfôr, vaksiner og sykdomsforebygging, forbedret oppdrettsledelse, samt tilgang til smolt (Liu et al., 2011). Utviklingen av den norske akvakulturindustrien er også karakterisert av forskning og innovasjon fostret av et sterkt samarbeid mellom forskere og industrien (Ford, 1984).

Produksjon av norsk atlantisk laks er sett på som en av de mest bærekraftige proteinprodusentene i verden sammenlignet med andre produsenter i resten av verden (FAIRR, 2020). Streng regulering og sterkt innovasjonsfokus fokus for å løse utfordringer rundt bærekraft, fiskevelferd, rømming, forurensing, sykdomsforebygging og tilgang på fôrressurser, har bidratt til bærekraftig utvikling i produksjonen av norsk atlantisk laks. Forbrukere over hele verden vurderer laks som et høyverdig matprodukt. Til tross for høyere markedspriser har store forbedringer av produksjonsteknologi, klekkeri og foredling gitt atlantisk laks både en sterk inntjening og markedsposisjon sammenlignet med andre fiskearter som produseres ved lavere kostnadsnivå og i større kvanta. Samtidig med økt produksjon, ser man en økt bevissthet hos forbrukerne. Konsumenter ønsker å kjøpe laks som er produsert med høy etisk standard og minimalt økologisk fotavtrykk (Verbeke et al., 2007).

## 2.0 Bakgrunn

En sterk vekst i produksjonen av atlantisk laks har økt behovet for fôr. I 2020 er behovet forventet å ligge på 3,672,00 tonn (Tacon og Metian, 2008). Laksens fôr er dominert av planteingredienser både i Norge og globalt. Utskiftning av fiskemel med planteingredienser har vært hovedtrenden i norsk laksefôr gjennom de siste 15-20 årene.

### 2.1 Produksjon av laksefôr ved hjelp av ekstruderings teknologi

Fiskefôrteknologi i Norge er datert til 1970-tallet hvor det første pelletfôret ble introdusert til laks i akvakultur (Talbot og Rosenlund, 2002). Pelletert fôr har hatt mange fordeler sammenlignet med å fôre med råfisk. Introduksjonen av ekstrudert fiskefôr på 1980-tallet endret laksefôrindustrien betydelig.

Ekstruderingsprosessering er den dominerende praksisen for produksjonen av fôr til atlantisk laks (FAO, 2004). Ekstrudering av fiskefôr fremstilles ved at protein (fiskemel eller liknende), fett (fiskeolje og planteolje) og karbohydrat (maismel eller hvetemel) blandes sammen med mineraler, vitaminer og vann, og presses gjennom et rør (en ekstruder) der det er høyt trykk og om lag 90 grader celsius. Karbohydratene sørger da for at fôrblendingen klistrer seg sammen, og fôret formes til en sylinderformet fôrbit, en pellet, når den presses ut gjennom dyser i enden av ekstruderen. Gjennom ekstrusjonsprosessen, blir de pre-kondisjonerte fôringrediensene oppvarmet og knadd gjennom et sylinderformet rør med en eller to roterende skruer. Røret med skruene er ekstruderen. Ingrediensene blir etter hvert presset gjennom matrisen og kuttet av roterende kniver ved ekstruderens utløp (Levic and Sreedanovi, 2010). I denne prosessen blir fôrmiksen utsatt for høy temperatur over en kort periode. Denne prosessen sørger for gelatinisering av stivelsen og denaturering av protein som begge er viktige for å binde pelleten og den endelige strukturen.

Sluttkvalitet av det ekstruderte fôret er bestemt av temperaturen i tillegg til andre parametere (for eksempel tid og ingredienssammensetning). Senere på 1990-tallet ble det introdusert vakumisert oljeimpregnering som tillot produksjon av høyenergi laksefôr. Bruken av høyenergifôr har ført til en forbedret proteinutnyttelse, vekstytelse, økt fordøyelighet av energi og forbedret fôrfaktor (FCR) i oppdrettet atlantisk laks.

Fôret produseres i størrelser tilpasset fisken. Ekstrudert fiskefôr har flere fordeler sammenlignet med konvensjonelt dampelletert fôr. Pelletene er mer slitesterke, varmelabile anti-næringsstoffer blir inaktiverte (som feks lektiner), og prosessen er effektiv for å inaktivere

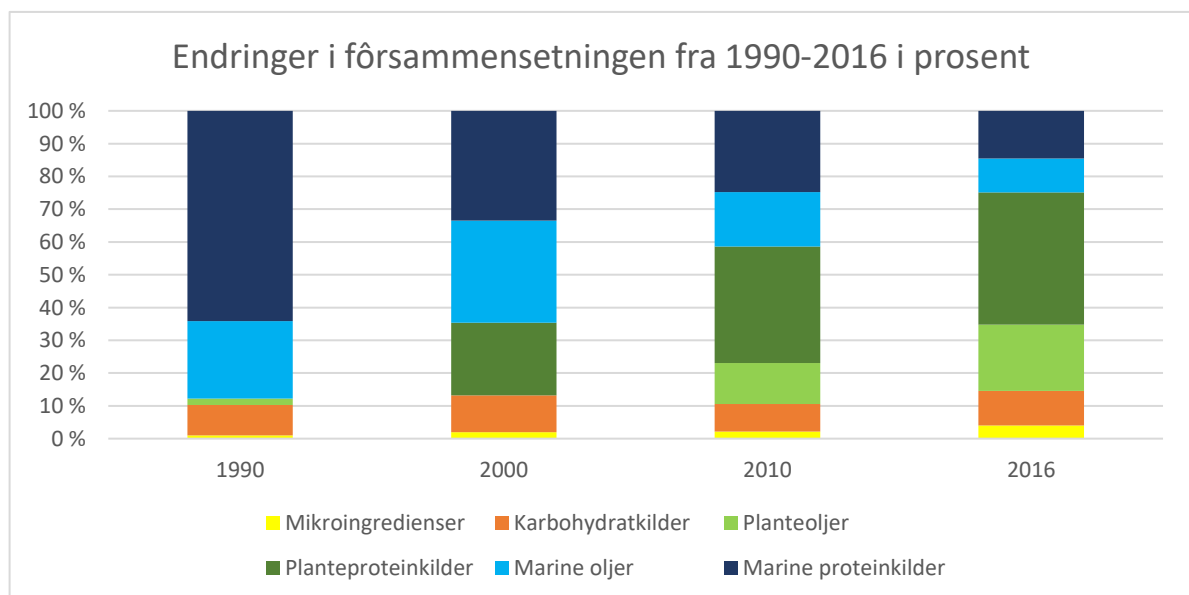
mikroorganismer som bakterien *Salmonella* (Levic and Sredanovi, 2010). De fleste av disse gunstige effektene er resultater av ekstrusjonsprosessering og forholdene som blir brukt under ekstrudering.

## 2.2 Fôringredienser i akvakultur

Intensiv akvakulturproduksjon avhenger av eksterne fôrforsyninger og fôret utgjør nå 50% av de totale kostnadene innen akvakulturproduksjon (FAO, 2020). Fisken trenger et fôr som tilfører næringsstoffene den trenger for å vokse. Dette gjøres ved å kombinere forskjellige ingredienser for å møte næringsbehovet.

I fiskeoppdrett representerer fôr den største produksjonskostnaden (Tacon and Metian, 2008). Produksjon av sammensatt fôr er basert på nøye seleksjon av fôringredienser fra bærekraftige ressurser til lavest mulig pris. Fiskefôrindustrien søker konstant etter nye ingredienser for å redusere avhengigheten av få ressurser. I global akvakulturpraksis blir et bredt spekter av ingredienser brukt.

### 2.2.1 Marine råvarer utgjør en mindre andel av fôr til laks



Figur 3: Endringer i fôrsammensetningen fra 1990-2016 (Ytrestøyl et al., 2015) (Aas et al., 2019)

Fiskemel og fiskeolje var nøkkelingredienser i fiskefôr, selv om det har er et ønske og en trend å erstatte disse ingrediensene med plantebaserte alternativer (Ytrestøyl et al., 2015) (Aas et al.,

2019). Historisk har fiskemel og fiskeolje vært brukt fordi dette var en prisgunstig råvare og hadde i tillegg god næringsprofil. Fiskemel har høyt proteininnhold, balansert aminosyreprofil, unik fettsyresammensetning (tilfører EPA og DHA) og unike aminosyrekomponenter som eksempelvis Taurin. I tillegg bidrar fiskemel til god smakelighet. Fiskemel gir god vekst hos fisken og forbedrer fiskehelsen betraktelig (Miles and Chapman, 2015). I tillegg sørger høyere smakelighet for effektivt fôrintak. Fraværet av karbohydrater og anti-næringsstoffer sørger for god fordøyelighet og opptak av næring, høy vekstytelse og til og med helsebringende effekter gjennom immunmodulerende aktivitet (Miles and Chapman, 2015). God fordøyelighet og høy retensjon av næringsstoffer bidrar til mindre vannforurensing på grunn av mindre gjødsel og har dermed en positiv effekt på marint miljø.

Bruken av fiskemel og fiskeolje i fiskefôr er begrenset på grunn av tilgjengelighet og pris. Tilgjengeligheten i fremtiden er ikke ventet å forbedre seg, fiskeolje og fiskemel blir en stadig mer presset ressurs. Fiskemel er ofte produsert av små pelagisk fisk (ansjos, pollok, menhaden) som ikke vanligvis blir brukt til menneskelig konsum. Et nøkkelproblem er at majoriteten av verdens fiskeressurser er fullt utnyttet. Dette begrenser fremtidig vekst av fiskemelproduksjon. Den største produsenten av fiskemel og fiskeolje er Peru. Peruanske ansjos foredles til fiskemel og fiskeolje. I 2007 utgjorde det henholdsvis 41% og 30,6 % av globalt råstoff til fiskemel og fiskeolje (Tacon et al., 2011).

Fangsten til fiskeriene varierer mye grunnet ulike forhold. Fiskeriene er sårbare for naturfenomener. Blant annet skapte El-Nino en reduksjon i fangsten av ansjos. Dette skapte ringvirkninger i markedet og en reduksjon i produksjonen av fiskemel og fiskeolje. Det er også en økende trend at små pelagisk fisk blir brukt direkte til humant konsum. Som en følge av dette bør økende konkurranse for marine ressurser bli møtt smart, og økt bruk av fiske bi-produkter deriblant produksjon til fiskemel og fiskeolje kan være en løsning (Olsen and Hasan, 2012). Ifølge Aas et al. (2019) var 405,921 tonn eller 25% av alle fôringrediensene brukt i oppdrett i Norge fra marine kilder.

De marine ingrediensene som brukes i fiskemel i norsk lakseoppdrett er råstoff som sild, makrell og kolmule. Fangstkvote regulerer fisket på disse artene. Fiskemelssammensetningen varierer fra år til år avhengig av fangstkvote av ulike arter. Produsentene av fiskemel og fiskeolje har nå begynt å bruke marine bi-produkt til fiskemel og olje. Bruken av marine biprodukt økt fra 29700 tonn i 2008 (Chamberlain, 2011) til 137800 tonn i 2013 (Olafsen et al., 2014). I 2013 kom ca. 25% av fiskemel og fiskeoljen som brukes av norske oppdrettere fra biprodukt (Ytrestøyl et al., 2015) (Aas et al., 2019).

Nye ingredienser fra lavere trofisk nivå (zooplankton) har fått økt oppmerksomhet. Ingredienser fra lavere trofisk nivå inkluderer zooplankton fra både arktiske og antarktiske farvann. Selv om tilgjengeligheten av zooplankton er høy, er fangstteknologi og prosessering en begrensende faktor for storskala bruk av zooplankton. Det er et stort potensial for å bruke Antarktisk krill (*Euphausia superba*) for å erstatte fiskemel og fiskeolje i fiskefôr. Delvis innblandings (25%) av krillmel har forbedret vekstresponsen og fordøyelighet av næringsstoffer (Olsen et al., 2010) i atlantisk laks. Sørensen et al. (2011a) skriver imidlertid at tilstedeværelsen av fluor og kobber kan være en begrensende faktor. Bærekraftproblemer på grunn av overfiske er en av de store flaskehalsene for storskala bruk av krillmel i produksjonen av atlantisk laks.

Prisen på fiskemel og fiskeolje er i stor grad avhengig av tilgjengelighet. Økende konkurranse har resultert i økte priser. Ved å finne alternative ingredienser har akvakulturindustrien funnet en løsning for å erstatning av fiskemel og fiskeolje.

Mangel på fiskemel og fiskeolje for å møte kravet til en voksende akvakulturindustri har stimulert forskning og innovasjon i fôrsektoren. På verdensbasis er det et bredt spekter av ingredienser som kan brukes til marint fôr. Blant annet insektbaserte ingredienser, mikrobielle ingredienser, genetisk modifiserte ingredienser (GMO) og planteingredienser. Tacon et al (2011) har gitt en oversikt på hovedingrediensene som blir brukt til forskjellig fiskearter. En oppdatert oversikt på de mest brukte ingrediensene i produksjon av atlantisk laks ble også utgitt av Ytrestøyl et al. (2015), Shepherd et al. (2017) og Aas et al. (2019).

## **2.4 Plantebaserte ingredienser i fôr til atlantisk laks**

Fôringredienser fra planter har en del fordeler sammenlignet med fiskemel og fiskeolje. Det er på grunn av at plantebaserte ingredienser er mer tilgjengelig og har fordelaktig pris. Begrensningene ved bruk planteingredienser i fiskefôr begrunnes med ernæringsmessige forhold som; innhold av anti-næringsstoffer, ubalansert aminosyreprofil, lavere innhold av protein og høyere innhold av karbohydrater. Planteoljene med det største potensialet til bruk i akvakulturfôr er rike på flerumettede fettsyrer. Ulempen med planteolje sammenlignet med fiskeolje er mangelen på EPA og DHA. Det er en økende bekymring for langtidseffekten av lave nivåer av disse fettsyrene på fiskehelse (Rosenlund et al., 2016, Sissener et al., 2016). Fordøyeligheten av planteingredienser varierer med innblandingsnivå, opprinnelse, anti-næringsstoffer og prosesseringsmetoder.



Soyabønner som alternativ har blitt introdusert som et plantebasert alternativ (Naylor et al., 2009). Denne planten er en kilde til næringsstoffer som protein og dermed aminosyrer som fisken trenger for å vokse (Naylor et al., 2009). Forskning har vist at innblandingsnivået av ekstrahert soyabønneemel på 20%-30% skaper redusert fordøyelighet av fett hos laksearter (Refstie et al., 2000, Storebakken et al., 2000). Ekstrahering av soya er en prosesseringsmetode som man har gått bort fra. Den er erstattet av soyaproteinkonsentrat, og denne kilden utgjorde i 2016 19% av fôret til atlantisk laks (Aas et al., 2019). Andre kilder som rapsolje har også vist seg å være egnet. Rapsolje er høyt fordøyelig hos laks sammenlignet med andre kilder som eksempelvis palmeolje. Rapsolje har også et fordelaktig n-3/n-6 forhold sammenlignet til andre planteoljer (Sørensen et al., 2011a). En studie gjort på modifisert rapsolje har også gitt lovende resultater i form av enda gunstigere fettsyresammensetning sammenlignet med vanlig rapsolje (Ruyter et al., 2019)

Innblanding av planteingredienser i laksefôr relatert til helse- og vekstrespons har blitt undersøkt av ulike forfattere (Król et al., 2016, Skov et al., 2012, Van den Ingh et al., 1996). Król et al. (2016) konkluderte med at fisker i laksefamilien uten noen evolusjonsmessig tilpasning til plantebasert fôr, viste negative effekter på helse og vekst når det var innblanding av plantebaserte ingredienser. Disse responsene kan skyldes anti-næringsstoffer, ubalanserte fettsyre- og aminosyreprofiler. Anti-næringsstoffer kan forstyrre fordøyelse, opptak, metabolisme og følgelig også utnyttelse av fôret. For eksempel er bruk av ekstrahert soyabønneemel assosiert med morfologiske endringer i distaltarmen (Storebakken et al., 2000). Høyere innblandingsnivå av planteoljer har også demonstrert morfologiske og histopatologiske endringer. Disse faktorene kan ha negativ effekt på tarmhelse i Atlantisk laks (Moldal et al., 2014).

Selv om planteingredienser har spesifikke begrensninger ved høyt innblandingsnivå kan moderne prosesseringsteknologi som enzymatisk behandling, løsemiddelrensing og ekstruderingssteknologi brukes til å eliminere anti-næringsstoffer. Planteavl kan også brukes for å utvikle plantearter som har lavt nivå av anti-næringsstoffer og forbedret kvalitet for karnivor fisk. Også andre metoder for å forbedre fôr kvaliteten utvikles. Eksempler på dette er luftklassifikasjoner og fraksjonering som kan brukes til å produsere proteinkonsentrater.

I tillegg til at plantebaserte ingredienser i fiskefôr har ernæringsmessige utfordringer så er for eksempel soyabønner som fôringrediens blitt kritisert for sin miljømessige, næringsmessige og økonomiske bærekraft (Lock, Arsiwalla, & Waagbø, 2016). I denne sammenhengen har andre

erstatninger blitt etterlyst av forbrukerne. Med rundt 5.5 millioner estimerte arter (Stork, 2018) er insekter ofte fremstilt som fremtidens proteinkilde hos både mennesker og dyr. Av plantebaserte fôringredienser, så er mikroalger anerkjent som en av de med mest potensiale i fremtidens fiskefôr (Tibbetts, 2018). Selv om tilgang og pris er noe som hindrer hyppigere bruk i dag.

#### ***2.4.1 Andre alternative fôringredienser til laksefôr***

Et alternativ til plantebaserte fôringredienser er biprodukt fra landdyr. Biproduktene inkluderer, blodmel, kjøtt og benmel, kylling biprodukt mel og fjærmel. Biprodukter fra dyr er brukt over hele verden i forskjellige akvakulturpraksiser. Disse produktene har større variabilitet i næringssammensetning og lavere fordøyelighet sammenlignet med plantebaserte alternativer. Næringssammensetningen til disse produktene avhenger mye av prosesseringsmetodene som blir brukt under framstilling.

Bruk av foredlede dyreprodukter i produksjonen av atlantisk laks er datert tilbake til 1930-tallet. Bruken var begrenset til enkelte deler av verden, for eksempel Nord-Amerika, sent på 1980-tallet på grunn av fordøyelighetsproblemer (Bureau, 2006). Optimalisering av produksjonsteknologien gjennom de siste tiårene gjør at man ikke lengre har disse problemene. Men i 2001 ble bruken av biprodukter fra dyr forbudt i den Europeiske Union for å unngå spredning av Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE/kugalskap). Fra 2013 har biprodukt fra kylling og svin, inklusiv fjærmel og blodprodukter blitt unntatt fra forbudet og kan nå bli brukt i animalsk fôr i Europa.

##### ***2.4.1.1 Biprodukt av kyllingmel***

Det er forskjellige biprodukt fra kyllingnæringen som kan brukes som fôringredienser, blant annet kyllingnakker, rene tarmer og underutviklede egg. Næringssammensetningen i biprodukt fra kylling kan variere i forhold til biprodukt-substratet og prosesseringsforholdene. Vanligvis inneholder kylling biprodukt mer mettet fett og ikke-essensielle aminosyrer sammenlignet med henholdsvis fiskeolje og fiskemel.

Kun få studier har undersøkt potensialet til biprodukt fra kylling som mel i fôr til atlantisk laks (Hatlen et al., 2015). Den observerte proteinfordøyeligheten av kyllingbiproduktmel lå på 77% når fôret besto av 50% av dette proteinet. Hatlen et al. (2015) vurderte at lav

proteinfordøyelighet kunne forklares av suboptimale prosesseringsforhold (høy temperatur) eller suboptimal næringssammensetning. Andre studier med salmonider fôret med biprodukt av kylling rapporterte høyere proteinfordøyelighet (Bureau et al., 1999, Cheng and Hardy., 2002, Dong et al., 1993). Fordøyelighet av protein basert på biprodukt fra kylling kan variere avhengig av kilden (Cheng and Hardy., 2002). I noen tilfeller kan fordøyelighetskoeffisienter være bedre sammenlignet med fiskemel (Sugiura et al., 1998). Senere forskning har også vist at bruk av mel fra fjærfe og blod fra svin kan resultere i helsefordeler som reduserte nivå av triglyserider i lever og en trend av bedret tarmhelse (Liland et al., 2014). Mettede fettsyrer begrenser bruken av kyllingmel i fôr til kaldtvanns akvakultur. På grunn av dette er det kun proteinfraksjonen som har et potensiale, mens fettfraksjonen bør være begrenset (Skrede et al., 2011).

#### *2.4.1.2 Blodmel*

Blodmel er et biprodukt fra landdyr som er sett på som kosteffektivt og en høyt fordøyelig proteinkilde for akvakulturarter. Ferskt biprodukt fra dyr i slaktehus kan bli foredlet til forskjellige melprodukter basert på helblod, hemoglobin og plasma. Vanlig praksis for å produsere blodmel inkluderer soltørking, ringtørking, spraytørking og ovnstørkemetoder.

De forskjellige prosesseringsmetodene har en stor virkning på næringsmessig kvalitet på blodmel. Varmeskader i produksjonen av blodmel reduserer biotilgjengeligheten av næring. Spraytørking er foretrukket tørkemetode og resulterer i høyere fordøyelighet av næringsstoffer og forbedret biotilgjengelighet av næring sammenlignet med andre tørkemetoder.

Aminosyreprofilen til blodmel har vanligvis et høyt innhold lysin, valin og leucin som gjør at det blir mer ugunstig som fiskefôr (Forskningsrådet, 1993, Sørensen et al., 2011a). Blodmel inneholder høyt innhold av Jern (Fe), det virker som en pro-oksidant som kan redusere pigmentering i Atlantisk laks (Rørvik et al., 2003). Innblandingsnivå på 4.1% blodmel i fôret viste positive effekter på vekst av immunitet i en vekstfase (parr) hos atlantisk laks (Gisbert, 2013). Bruken av blodmel kan også forebygge katarakt (grå stær) i atlantisk laks, mest på grunn av det høye innholdet av histidin (Breck et al., 2003).

#### *2.4.1.3 Mel fremstilt av bakterier*

Mel av bakterielt fremstilt protein er i likhet med animalske kilder sett på som en alternativ ingrediens i fiskefôr. I de siste årene har det vært en stor oppmerksomhet på mel fremstilt av bakterier som fôringrediens til atlantisk laks. Den kjemiske sammensetning av mel fremstilt av bakterier avhenger av type bakterie, prosesseringsforhold og substratforhold (Sørensen et al., 2011a). En vanlig prosesseringsmetode er spraytørking. Den kan gi melet et innhold på 70% råprotein og 10% råfett (Aas et al., 2006). Aminosyresammensetningen i mel fremstilt av bakterier ligner fiskemel, med unntak av at det er høyere på tryptofan og lavere på lysinkonsentrasjon (Skrede et al., 1998). Fett utgjør ca. 10%, og sammensetningen av fettsyrer er dominert av C 16:0 og C 16:1 (Øverland et al., 2005). Høyt innhold av nukleinsyre, opp til 10% av tørrstoff, kan også ha negative effekter på fiskefysiologien ved å forhøye urinsyrenivåene i plasma (Aas et al., 2006). Et av problemene assosiert med mel fremstilt fra bakterier er redusert biotilgjengelighet av næring på grunn av rigide cellevegger. Romarheim et al. (2011) har rapportert at mel fremstilt av bakterier produsert med naturlig gass kan forebygge soyabønneindusert enteritt i atlantisk laks.

#### *2.4.1.4 Insekter som fôringrediens*

En studie gjort av Belghit et al (2018) viste at det var mulig å tilsette 600 g kg<sup>-1</sup> insektmel i kombinasjon med insektolje i fôret til atlantisk laks i ferskvannsfasen uten noen negativ effekt på vekstparametere, fôrutnyttelse, fordøyelighet og kjemisk sammensetning av helkropp. Mel fra svart soldatflue virket å være en god kilde til aminosyrer, og har høy biotilgjengelighet for aminosyrer til atlantisk laks. Kjemisk sammensetning ble heller ikke påvirket ved bruk av dette insektbaserte fôret. Man burde derimot være oppmerksom på de lave konsentrasjonene av taurin i insektmel fra svart soldatflue, da de kan ha effekt på lipid metabolisme og lipidlagring.

## **2.5 Mikroalger i akvakultur**

Mikroalger er en av de mest aktuelle fôringrediensene til atlantisk laks. Mikroalger spiller en avgjørende rolle i både ferskvann og saltvannsakvakultur. Fordelene med denne fôrkilden er høy tilgjengelighet. Kostnadene ved å fremstille er akseptable og mest sannsynlig kan reduseres ved utvikling av fremstillingsmetoder.

Mikroalger inneholder et stort antall mikroskopiske encellede alger og forekommer i både ferskvann og saltvann. Selv om kultivering av mikroalger kan dateres tilbake til sent 1800-tall / tidlig 1900-tall, ble den første mikroalgekultiveringen ifm. akvakultur startet i 1910 (Del Campo et al., 2007). Siden da har kultivering av mikroalger til akvakulturbruk hatt økende interesse. I de seneste årene har alger i utviklingen av bio-drivstoffteknologi også fremskyndet utviklingen i bruk av mikroalger som en fôringrediens i akvakultur (Gong et al., 2017). Produksjon av et levende fôrprodukt som trenger næring må man ha tilgang til fôrkilder for det aktuelle organismen. Dette må være lett tilgjengelig, kostnadseffektivt og fortrinnsvis bærekraftig. Det er mulig å bruke slam fra lukkede merder og landanlegg som fôr for mikroalgene, dette sørger for en bedre utnyttelse av ressurser. Næringsstoffene i slammet kan være fordelaktig for algenes vekst, men det høye saltinnholdet kan dog vært et problem fordi det fører til uttørking (Ossenkamp, 2018).

Både prosesserte mikroalger og fersk mikroalge hatt en viktig rolle i fôr til laks i larvestadiet. Flere dyr som marine skjell, marine gastropoder (øresnegl, trompetsnegl), og flere arter reke og zooplankton avhenger av mikroalger. På grunn av fordeler som god næringsprofil, antioksidantaktivitet, høy vekstrate og passende størrelse, har mikroalger blitt populært i larve akvakultur (Roy and Pal, 2015). Flere arter av mikroalger blir brukt til startfôring i klekkeri, som *Isochrysis* sp., *Chaetoceros* sp., *Teraselmis* sp. Og *Pavlova* sp. Disse artene kan brukes alene eller i blandinger. Zooplankton blir fôret med mikroalger som *Pavlova* sp. Og *Isochrysis* sp. for å berike dem med DHA. Berikede zooplankton blir deretter brukt som startfôring av fisk i larvestadiet.

Mikroalger i fôr har fortsatt utfordringer, og flere forsøk er essensielt for å kunne forstå effektene til mikroalger på vekst, næringsopptak, fôr kvalitet, helse hos fisk og endeproduktets kvalitet (Glencross et al., 2007; Ringø et al., 2014).

Celleveggene hos mikroalgene byr på utfordringer da de gjør biotilgjengeligheten av næringen lavere. Dette er forsøkt løst ved pasteurisering, frysing, frysetørking og mekaniske behandlingsmetoder som f.eks. kulemøller for å knuse celleveggene. Dette resulterte i opptil 4 ganger større biotilgjengelighet av mikroalgen *N. gaditana* i Tilapia arten *Oreochromis nioticus* (Teuling et al., 2019).

Som en erstatning for fiskeolje har blant annet mikroalgen *Schizochytrium* sp. blitt forsket på som en mulig ingrediens i laksefôr. Det kan virke som *Schizochytrium limacinum* har et stort potensial som alternativ kilde for omega 3 fettsyrer (Kousoulaki et al., 2020). Kousoulaki et al. (2016) har undersøkt potensialet av mikroalgen *Schizochytrium* sp. som erstatning for fiskeolje.

Funnene deres tyder på at inntil 5% innblanding av spraytørket biomasse kan erstatte fiskeolje uten negative effekter hos atlantisk laks.

Utfordringer knyttes til flere forhold for å optimalisere storskala produksjon av mikroalger; valg av mikroalgearter, prosesseringsmetoder for å bryte ned cellevegger og innblandingsnivå i fôret. Det foregår forsøk og utvikling av teknologi innenfor alle disse områdene.

### ***2.5.1 Næringsprofil til mikroalger***

Den kjemiske sammensetningen til enkelte mikroalger viser at de kan ha et potensiale som fôr for atlantisk laks (Becker, 2007; Shields and Lupatsch, 2012; Tibbetts, 2017; Tibbetts, 2018). Disse mikroorganismene er gode kilder til aminosyrer, n-3 flerumettede fettsyrer (n-3 PUFAs) og astaxanthin (Shah et al., 2018).

Mikroalger inneholder et vidt spekter av kjemiske forbindelser som karbohydrater, lipider, proteiner, vitaminer og andre varierte bioaktive komponenter. Nærings sammensetning kan variere betraktelig avhengig av de forskjellige kultiveringsforholdene, arter som er uegnet, forskjellige stammer, form og størrelse, fordøyeligheten og biokjemisk sammensetning.

Det er blitt bevist i nyere forskning at ekstrudering er effektivt for å knuse cellevegger på *Nannochloropsis* og dermed gjøre innholdet mer biotilgjengelig til videre bruk (gong et al., 2017; Wang et al., 2018).

Ved å bevise at på at man kan bruke kostnadseffektive metoder for å gjøre næringsinnholdet til mikroalger anvendbart, kan det medføre at lakseindustrien i større grad ser muligheten til å satse på mikroalger (Teuling et al., 2017; Tibbetts et al., 2017).

### ***2.5.2 Aminosyresammensetning***

Aminosyrer i fiskefôr er viktige for proteinsyntesen, fôrutnyttelse, vekst, stressrespons, immunitet og overlevelse (Li et al., 2009). Aminosyresammensetning av de fleste mikroalger er på linje med fiskemel og andre fôrkilder av protein. Studier viser at et stort spekter av mikroalger har et relativt likt aminosyremønster. Det kan observeres små variasjoner for aminosyrene cystein og methionin (Brown, 1991., Roy and Pal, 2015). Videre følger aminosyresammensetningen til alger samme mønster som andre akvatiske dyr som østers og reker (Brown, 2002). Dette taler for at mikroalger kan være en god kilde til aminosyrer for forskjellige akvakulturarter.

### 2.5.3 Fettsyresammensetning

I mikroalgenes fettsyreprofil finner man enumettede (MUFA), flerumettede (PUFA) og mettede (SFA) fettsyrer. Fettsyresammensetningen kan variere mellom de forskjellige algertypene. Variasjoner i kultiveringsforholdene (temperatur, næringskonsentrasjon og lys) påvirker cellesyklus, lipidklassesammensetning og membranfluiditet av mikroalger som igjen bestemmer fettsyresammensetningen (Napolitano, 1999).

Det er en korrelasjon mellom de ulike algegruppene og fettsyresammensetningen til tross for disse forskjellene Brown (2002). Mikroalger kan være en lovende kilde av PUFA i fiskefôr. Grønnalger (*Chlorophyta*) f.eks. *Scenedesmus* sp. har vanligvis mangel på PUFA sammenlignet med andre mikroalgeklasser, for eksempel *Nannochloropsis* sp. (*Eustigmatophyceae*) og *Chryptomonas* sp. (*Cryptophyceae*) (Brown, 2002).

### 2.5.4 Andre biokjemiske komponenter fra mikroalger

Mikroalger er også rike på andre typer biomolekyler som pigmenter og ernæringsforbindelser. Pigmenter som astaxantin, lutein, og betakarotenoider er viktige for hud og kjøttfargen i regnbueørret og salmonider (Del Campo et al., 2007, Sommer et al., 1992). Lutein bidrar til forebygging av katarakt og forbedring av immuniteten ved antioksidantaktivitet i oppdrettede arter (Yaakob et al., 2014). Andre forbindelser som beta 1-3 glukcan fra mikroalger stimulerer uspesifikk immunitet og kan mulig ha positiv effekt på spesifikk immunitet for forskjellige fiskearter som for eksempel Rohu (Misra et al., 2006, Sahoo and Mukherjee, 2001) og regnbueørret (Skov et al., 2012). Det er et skille mellom mikroalger og landbaserte planteingredienser på grunn av forekomsten av taurin. Taurinrike fôringredienser forbedrer vekst og overlevelse, og reduserer mottakelighet for sykdommer i karnivor fisk (Salze og Davis, 2015).

Vitamininnholdet i mikroalger varierer mellom artene. En omfattende studie av Brown og Miller (1992) viste at denne variasjonen stort sett ble observert i askorbinsyreinnholdet i mikroalger. Økt reproduktiv ytelse, redusert oksidativ skade, samt sykdomsresistens ble vist ved innblanding av askorbinsyre i salmonidfôr (Sandnes et al., 1984). Med dette perspektivet har askorbinsyrerike alger som *Chaetoceros gracilis*, *T. pseudomona* et stort potensial som fôringrediens i akvatisk dyrefôr.

## 2.6 Fordeler ved bruk av mikroalger

Mikroalger er en mulig kilde til både protein og fett i fôr til akvatiske dyr. Kultiverte mikroalger blir brukt hos flere oppdrettede arter som beinfisk, skalldyr og andre kommersielt viktige arter (Shields and Lupatsch, 2012). I senere tid har flere studier blitt utført for å evaluere mikroalger som fiskefôr. Mikroalgene har blitt brukt ferske eller tørket som en substitutt for fiskemel i pelletert fôr (FAO, 2009). Flere studier gir en utmerket database for valg av algearter i akvakultur (Borowitzka, 1997). Potensialet til de forskjellige mikroalger i fiskefôr har blitt forsket på i forskjellige studier. Fordøyeligheten av ulike mikroalger varierer hos ulike fiskearter. Studier med atlantisk røye (*Salvelinus alpinus*) og atlantisk laks (*Salmo salar L*) fôret med *Spirulina* sp. ved 30% innblandingsnivå viste en fordøyelighet av protein på henholdsvis 82% og 84.7% (Burr et al., 2011). Videre viste en innblanding av 6% *Phaeodactylum tricornutum* i fôr til atlantisk laks en fordøyelighet på 90% (Sørensen et al., 2016). Det forskes også på mikroalger som fôr til andre dyrearter. For den karnivore arten mink (*Mustela vison*) var fordøyeligheten på proteinene i mikroalgene *Nannochloropsis oceania*, *Phaeodactylum tricornutum* og *Isochrysis* sp. estimert til henholdsvis 35.5%, 79.9% og 18.8% (Skrede et al., 2011).

Innblanding av mikroalger i fiskefôr kan ha positiv effekt på næringsutnyttelse og vekstytelsen til fisk. I et studium av Olvera-Novoa et al. (1998) ble det funnet at 20% innblanding av *Spirulina maxima* i fôr til tilapiaarten *Oreochromis mossambicus* økte fôrutnyttelse, vekstytelse og næringsutnyttelse. Tibaldi et al. (2015) rapporterte også at fôr med frysetørket *Isochrysis* sp. ved 20% innblanding økte proteineffektivitetsraten og fôrfaktor (FCR) i europeisk havabbor. På den andre siden hadde 11%-15% innblandingsnivå av *Schyzochytrium* sp. i fôret til atlantisk laks vist signifikant vekstreduksjon og fôrutnyttelse (Kousoulaki et al., 2015, Sprague et al., 2015). Disse funnene antyder at innblandingsnivå, type alge og fiskeart påvirker resultatene. Innblanding av ulike mikroalgearter i kommersielt fiskefôr burde derfor undersøkes og testes enkeltvis på de gjeldende fiskeartene. Eksperimenter bør utformes for å bestemme fordøyelighet, næringsretensjon og effekt på fiskevekst og helse når man bruker mikroalger i fiskefôr.



## 2.7 utfordringer ved bruk av mikroalger

Selv om mikroalger er en lovende fôringrediens med mange fordeler, kommer den ikke helt uten utfordringer. Chacón-Lee et al (2010) snakker om biologiske utfordringer slik som den kjemiske sammensetningen. Kjemisk sammensetning av mikroalger er en ikke konstant faktor den varierer stor mellom ulike stammer og batchkulturer. Ulike miljøparametere som temperatur, pH, mineralinnhold i vann, lyseksponering og uro kan påvirke kjemisk sammensetning, som igjen kommer an på typen dyrkningsmetode som brukes, om den er åpen eller lukket, innendørs eller utendørs.

Andre store utfordringer er kostnadene i flere av leddene til produksjonen av mikroalger. Kultivering, høsting, tørking og prosessering er noen av disse produksjonsleddene hvor det er mangel på effektiv teknologi (Chacón-Lee et al., 2010).

## 2.8 Studiets hypotese og mål

Det er viktig å vite hvor mye mikroalger man kan tilsette i fôret uten å påvirke laksens vekst og helse negativt. Flere studier har undersøkt potensialet til *Nannochloropsis Oceanica*. som en fôringrediens. Få tidligere studier har derimot rapportert effekten til *Nannochloropsis Oceanica* som fôringrediens til atlantisk laks. Tidligere forsøksrapporter viser at bruk av mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica*. opp til 10% i fôr hos atlantisk laks ikke har noen negativ effekt på vekst, fordøyelighet av næringsstoffer og retensjon av næringsstoffer.

Dette forsøket var designet for å studere om utnyttelsen av mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica* kunne forbedres gjennom bruk av ekstrudering av algebiomassen. Ekstrudering har vist å gi høyere utnyttelse av næringsstoffer og ble av den grunn brukt i forsøket. Det var to mål med forsøket. Det første målet var å undersøke effekten av økende innblandingsnivå av en pre-ekstrudert mikroalge på fordøyelighet, vekst, fôrutnyttelse kjemisk sammensetning, i helkropp og fettsyresammensetning i filet. Mål 2 var å undersøke om pre-ekstrudering førte til bedre utnyttelse av mikroalgen. Det ble produsert fire forsøksfôr; ett fiskemelsbasert kontrollfôr og tre forskjellige fôr hvor fiskemelet ble erstattet med pre-ekstruderte mikroalger i to ulike innblandingsnivå (7.5%, 15%) eller hele celler 15%. De to førstnevnte (7.5% og 15%) er ekstruderte mikroalger, og sistnevnte (15%) er ikke-ekstruderte mikroalger. Kontrollgruppen fikk 10% fiskemel i dietten.

Følgende forsøksspørsmål skal besvares.

- Hvordan vil vekst og fôrutnyttelse til laksen bli påvirket ved ulike innblandingsnivå av mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica*?
- Hvordan vil innblanding av mikroalgen (*Nannochloropsis Oceanica*) påvirke kjemisk sammensetning av helkropp og fettsyresammensetning av filet
- Er det noen effekt av å fôre laksen en prosessert sammenlignet med en uprosessert mikroalge (*Nannochloropsis Oceanica*) sammenlignet ved innblandingsnivå på 15%

### **Hypoteser**

**H0:** Ingen effekt ved forprosessering av mikroalgene i fôret

**H1:** Forprosessering av mikroalgene i fôret øker biotilgjengeligheten av næringsstoffene

### 3.0 Material og metode

I dette kapittelet skal material og metode beskrives. Dette fôringsforsøket ble godkjent av det nasjonale forsøksdyrutvalget (FDU: Forsøksdyrutvalget ID) i Norge. FDU: ID:5887.

#### 3.1 Forsøksfôret

Det ble laget fire ulike forsøksfôr for å teste effekten av forprosessering og innblandingsnivå av mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica*.

CTRL =	Kontroll = Ingen innblanding av mikroalger
NEL =	<i>Nannochloropsis</i> Extruded Low (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert <i>Nannochloropsis Oceanica</i> )
NEH =	<i>Nannochloropsis</i> Extruded High (15% innblandingsnivå av ekstrudert <i>Nannochloropsis Oceanica</i> )
NWH =	<i>Nannochloropsis</i> Whole High (15% innblandingsnivå av <i>Nannochloropsis Oceanica</i> )

Fire tilnærmet isoproteiske (42-44% av tørrstoff) og isolipidiske (28-30% av tørrstoff) fôr ble produsert. Ingrediens sammensetning er vist i Tabell 1. Estimert og analysert kjemisk sammensetning er vist i tabell 2 og tabell 3. Det ble laget ett kontrollfôr og Tre forsøksfôr. Kontrollfôret inneholdt 10% fiskemel og ingen *Nannochloropsis sp.*, og de tre andre fôrene inneholdt henholdsvis 7,5% og 15% ekstruderte mikroalger og 15% ikke-ekstruderte mikroalger.

Testalgen mikroalge *N. Oceanica* (inneholdt 2.8% fuktighet, 36.6% protein, 14.3% fett, 9.4% fiber, 22.8% aske, 17.5 KJ g<sup>-1</sup> energi, 2.1% lysin og 0.9% methionin) ble produsert i lukkede fotobioreaktorer av Allma®, Lisboa, Portugal). Etter høsting og tørking ved sentrifugering ble biomassen spraytørket ved Alfarm (Pataias, Portugal) og markedsført av Allmicroalgae – Natural Products® (Lisboa, Portugal). SPAROS LDA (Olhão, Portugal) utførte ekstruderingsbehandling av mikroalgen og laget forsøksfôrene. Mikroalgene ble forbehandlet ved å sende de gjennom en ekstruder før de ble mikset med andre ingredienser og dermed ble til forsøksfôr. Forekstruderingen av algene ble utført på følgende måte:

*N.Oceanica* (98.5%) pulver ble blandet med hvetemel (1.5%) i en dobbelheliks mikser (model 500L, TGC Extrusion, France). Blandingen ble så sendt gjennom en pilotskala dobbelskrue ekstruder (model BC45, CLEXTRAL, Frankrike) med en skrudiameter av 55.5 mm for å produsere pellets (2.0 mm i diameter). Ekstruderingsforholdene var som følger: mater hastighet 65 kg/t; skruerhastighet 243 rpm; damptilførsel i kondisjonsrør 3%; vanntilførsel i ekstruder

1 295 ml/min; temperatur ekstruder 3 112-113°C; fuktighet ved åpning 26%. De ekstruderte algepelletene ble tørket i en vibrerende «fluidized» bed-tørke (model DR100, TGC Extrusion, Frankrike). Den kjemiske sammensetningen av forekstrudert *N. Oceanica* + Hvetemel var 3.3% vann, 36.4% protein, 14.2% lipider, 9.3% fiber, 22.6% aske, 17.4 KJ g<sup>-1</sup> av energi, 2.0% lysin and 0.9% methionin.

Forsøksfôret ble produsert ved å blande alle pulveringrediensene og forekstruderte alge pelletene i en dobbelheliks blender (model 500L, TGC Extrusion, Frankrike) og malt (under 400µm) i en mikropulveriserer hammer mølle (model SH1, Hosokawa-Alpine, Tyskland). Fôr (pelletstørrelse 3.0 mm) ble laget med en dobbelskrue-ekstruder (model BC45, Clextral, Frankrike) med en skruediameter på 55.5 mm. Ekstruderingsforholdene for forsøksfôret var: materhastighet (80-89 kg/t), skruerhastighet (235-244 rpm), vanntilsetning (Ca. 230 ml/min), temperaturen i tønne 1 (34-36 °C), temperatur tønne 3 (124-127°C). Ekstruderte pellets ble tørket på en vibrerende væske seng tørker (model DR100, TGC Extrusion, Frankrike). Etter kjøling ble oljen tilført ved vakuüm «coating» (700 mbar, i tilnærmet 50 sek) (model PG-10VCLAB, Dinnissen, Nederland). Direkte etter «coating» ble fôret pakket i forseglede plastikkbøtter og sendt til Nord Universitets forsøksstasjon, Bodø, Norge for å prøves i fôringsforsøket.

Tabell 1: Ingredienser i forsøksfôr vist i prosent.

Ingredienser, %	CTRL	NEL	NEH	NWH
	%	%	%	%
Fishmeal LT70 (NORVIK)	10	6.6	5	5
<b>Nannochloropsis - Ekstrudert</b>		<b>7.5</b>	<b>15</b>	
<b>Nannochloropsis - Helceller</b>				<b>15</b>
Potetkonsentrat	12	12	11.5	11.5
Soyaproteinkonsentrat (Soycomil)	12	12	11.5	11.5
Erteproteinkonsentrat	12	12	11.5	11.5
Hvetegluten	8.5	8.5	8.37	8.37
Korngluten	7	7	7	7
Hvetemel	14	10.67	7.27	7.27
Sardinolje - Sopropeche	9.65	9.25	8.8	8.8
Rapsolje	9.65	9.25	8.8	8.8
Soya lecithin - Pulver	0.5	0.5	0.5	0.5
Mikronæringsstoffer	4.7	4.73	4.76	4.76
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Mikronæringsstoffer og markør: Vitamin & Mineral Premix PV01, Antioksidant væske (Naturrox), MCP, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptofan, DL-Methionin, ZEOFeed, Yttrium oksid.

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

Tabell 2: Estimert sammensetning av forsøksfôr.

Beregnet Fôr, %	CTRL	NEL	NEH	NWH
Rå protein, % feed	48.04	48.03	48.04	48.04
Rå fett, % feed	21.20	21.20	21.21	21.21
Fiber, % feed	1.29	1.92	2.52	2.52
Stivelse, % feed	10.03	9.06	8.43	8.43
Aske, % feed	6.23	7.30	8.59	8.59
Bruttoenergi, MJ/kg feed	21.99	21.78	21.56	21.56

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

Tabell 3: Analysert kjemisk sammensetning og energiinnhold av de ulike forsøksfôrene.

Kjemisk sammensetning	CTRL	NEL	NEH	NWH
Tørstoff	941	895	949	939
g/kg tørstoff				
Rå protein	480	490	491	489
Rå fett	229	202	215	219
Aske	68	86	102	104
bruttoenergi	24.2	25.2	22.6	23.6

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

### 3.2 Fisk og innledende fôringsregime

Forsøket tar utgangspunkt i prinsippene for et RCT-studie (*Randomized Controlled Trial*) som er en vitenskapelig metode for å undersøke effekt av en bestemt type tiltak. I dette tilfellet er det ulike forvariasjoner. Det ble gjort forsøk på tre ulike foralternativ, og studien tok derfor i utgangspunkt i fire forsøksgrupper, hvorav den ene er kontrollgruppe. Kontrollgruppe er forutsetning for å måle effekt i denne typen studier. Det som videre er viktig for forsøket er at de ulike gruppene har like egenskaper og miljøforhold. Dette gjør at andre faktorer enn fôret ikke påvirker eller i liten grad kan påvirke resultatet.

Forsøket er utført på atlantisk laks (*Salmo Salar L*). 1-åringer av atlantisk laks ble hentet fra Salten smolt, Breivik, Salten, Norge. Laksen er fra en Salmobreedstamme fra selskapet

Salmobreed AS, Bergen, Norge. Den ble holdt på forskningsstasjonen i Mørkvedbukta ved Nord Universitet i ca 3 måneder. Fisken ble fôret med Ewos micro 40 (EWOS, Bergen, Norge) under holdeperioden/før forsøksstart.

På starten av forsøket ble 1200 fisk tilfeldig plassert i forsøksenhetene. Det ble brukt 5 kar for hver behandling i forsøket. Fisken ble sultet i 2 dager før distribusjonen til forsøkestankene, og deretter satt på forsøksfôret slik at alle gruppene hadde sammenlignbart utgangspunkt.

Forsøket ble utført i et gjennomstrømningsanlegg. Totalt 20 sirkulære glassfibertanker (800L og 0,9 m dype) ble brukt under forsøket (A-plast, Skodje, Norge). Oppdrettstankene er koniske med topp- og bunndiameter på henholdsvis 1 m og 0,9 m. Den kjegleformede bunnen med ca 22 graders skråning sørger for effektiv oppsamling av avføring og fôrrester. Hver tank var forsynt med sjøvann pumpet fra en dybde på 250 meter i Saltenfjorden. Under forsøket ble vannets «flow rate» holdt på 1000 L i timen, og hadde en gjennomsnittstemperatur og gjennomsnittssalinitet på henholdsvis 7.1°C og 3,4%. Oksygenmetningen var i gjennomsnitt 88%, aldri under 75 %, og ble målt i utløpsvannet. En 24-timers fotoperiode ble vedlikeholdt under fôringsperioden. Fisken ble fôret «ad libitum» ved å bruke automatiske fôringsautomater (Arvo Tech T-drum 2000 feeder, Finland). Fôringsautomanten er utstyrt med en 1 g doseringstrommel, kontrollskap og medfølgende programvare (ArvoTec, Huutokoski, Finland). Det ble fôret ut ved to tidspunkt hver dag, fra klokken 08:00-09:00 og 14:00-15:00 gjennom den 68 dager lange forsøksperioden. Etter hver fôring ble uspist fôr som havnet i vannavløpet fanget opp i en 17 L avfallssamler montert på siden av glassfibertankene (Aquatic Eco-Trap, Pentair Aquatic Eco-Systems1, F1, USA).

### **3.3 Uttak av forsøksindivid for prøvetaking og analyser**

Fisken ble individuelt veid og målt i lengde ved begynnelse og slutt av eksperimentet. Før «handling» ble laksen bedøvd ved å bruk tricainemethanesulfonate (MS 222, 140 mg/L). Seks individ per forsøkestank ble humannt avlivet med et hardt slag mot kraniet. Fisken ble deretter pakket i plastikkposer og holdt fryst i -40 °C til analyser. Totalt sett ble det brukt 120 fisker som er 10% av den samlede forsøkspopulasjonen på 1200 laks.

Uttak av forsøksindividene ble gjort for å beregne helkroppssammensetning ved kjemisk analyse. Gjødsele ble samlet fra individuell fisk ved stryking, og samlet for å få nok materiale til kjemisk analyse.

### **3.4 Kjemiske analyser**

Forsøksindividene må prepareres før analyser. Laksene fra hver tank ble homogenisert ved å bruke en industriell «food processor» (Foss Tecator, 2096 homogenizer, Hilleroed, Danmark) før analyse av helkroppssammensetning. Både gjødselprøver og helkroppsprøvene ble frysetørket (VirTis benchtop, Warminster, PA, USA) i 72 timer før den kjemiske analysen ble utført.

Fisken, forsøksfôr og frysetørket gjødsel ble fint malt i en morter og homogenisert før analyse av tørrstoff (105°C i 20 timer; ISO 6496:1999), råprotein (Kjeldahl Auto System, Tecator Systems, Höganäs, Sweden; ISO 5983:1987), rå fett gjennom Ethyl acetate ekstraksjon (Norsk standard), aske (Kremmering i en ovn ved 540°C i 16 timer; ISO (5984:2002) og energi (IKA C200 bomb calorimeter, Staufen, Tyskland; ISO 9831:1998). Yttrium i både fôr og gjødsel ble analysert ved å bruke induktivt koblet plasmamassespektrometri (ICP-MS) av Eurofins (Moss, Norge; NS-EN ISO 11885). Alle prøvene ble analysert med duplikater som en kvalitetssikring.

Totalt fettinnhold i gjødsel ble analysert ved å bruke Soxhlet-metoden med syrehydrolyse (Soxtec HT 6209, Tecator, Höganäs, Sweden; modifierer AOAC metode 053.020), av Eurofins® (Moss, Norge). Fettsyresammensetning av fisk og fôr ble målt ved gasskromatografi (GC) av metyl-ester derivater av fettsyrene av lipidene ekstrahert fra prøvene. Til dette ble de homogeniserte prøvene lyofilisert i 72 timer før lipidene ble ekstrahert og analysert i duplikater. Totalt lipidinnhold fra prøvene ble ekstrahert i henhold til metoden fra Bligh and Dyer (1959). Fettsyre metyl ester (FAMES) ble forberedt i henhold til AOCS offisielle metode Ce 1b-89. FAMES ble separerte og kvantisert ved bruk av Scion 436 GC utstyrt med en flamme ioniserings detektor, en splittløs injektor og en DB-23-kolonne (Agilent technologies, 248 Santa Clara, USA). Standardblanding av FAMES ble brukt til identifisering og kvantifisering av vanlige fettsyrer i prøvene (GLC, Nu-Chek Prep, Elysian, MN, USA).

#### **2.4.1 Fuktighetsanalyse**

Tørrstoffanalyse av fôr og helkropp ble utført ved å bruke en elektrisk ovn som holder 105°C i 20 timer. Prøvene på 5 g (+/- 0.5 g) og ble veid og tørket i en forhandsveid aluminiumskopp. Prøvene ble så avkjølt i en eksikkator før sluttveing. Metoden ble gjort i henhold til EN14918/15400/ISO1928.

### **2.4.2 Askeanalyse**

Aske (Mineral innhold) ble utvunnet ved å brenne fôr og homogenisert helkropp i en askeovn i 16 timer ved 540°C til konstantvekt. Ca. 5 g av homogeniserte fiskeprøver (5 g av fôr og 0.5 g av gjødsel) ble brukt for å bestemme mineralinnhold. Ved denne temperaturen blir alt organisk materiale i prøven brent, og man sitter igjen med aske (Uorganiske mineralsalter). (NS/EN ISO/IEC 17025:2005). Prosent aske ble beregnet med vektdifferanse før og etter behandlingen.

### **2.4.3 Fettanalyse av fôr og gjødsel**

Totalt fettinnhold av frysetørkede fôr og gjødselprøver ble gjort i henhold til etylacetatmetoden (Norsk standard). Metodens hensikt etylacetat for å ekstrahere fett fra prøvene, og bestemme mengden fett ved å veie inndampede alikvoter av løsningen. Prøvematerialet på  $10 \pm 0.5$  g ble kvernet sammen med 20 g vannfri natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) til en homogen masse med morter og skål. Etter homogeniseringen ble prøvene overført til 100 ml borsilikatglass med lokk. Prøven ble deretter tilsatt 50 ml etylacetat, og satt til å blandes på et risteapparat i 60 minutter. Innholdet i ferdigblandede prøver ble så enkeltvis filtrert gjennom et filterpapir (31- 50  $\mu\text{m}$ , Schleicher & Scüli) over til en glasskolbe, og deretter ble 20 ml fra hvert glass pipettert med en glasspipette over i fordampningsskåler som på forhånd hadde blitt merket og veid. Fordampningsskålene ble satt i et dampbad til etylacetaten hadde fordampet. Etter fordampingen ble skålene plassert i en ovn som holdt 105 °C for å fordampe eventuelle gjenværende vann og etylacetatrester. Etter 15 minutter ble skålene tatt ut av ovnen og plassert i en desikkator for nedkjøling. Når prøveskålene ble romtemperert, ble siste veiing utført. Fettinnhold (g) og fettprosent (%) ble beregnet ut fra følgende likning:

$$\text{Fettinnhold}(\%) = \left( \frac{13000 \times \text{fettinnhold}}{40 - 2.17 \times \text{fettinnhold (g)} \times \text{prøvevekt (g)}} \right)$$

I likningen er 10300 en konstant faktor og  $40 - 2.17$  er en kalibrert faktor.

### **2.4.4 Proteinanalyse**

Innhold av protein i prøvene ble bestemt ved bruk av Kjeldal-metoden. Prøver av helkropp ble homogenisert. Homogenisert helkropp, fôr og gjødsel ble så målt med Kjeldahl metoden (NS/EN ISO/IEC 17025:2005).



Kjeldahl-metoden måler nitrogeninnholdet i prøvematerialet, og deretter blir proteinmengden kalkulert ved å bruke en omregningsfaktor (6.25). Prøver på  $1 \pm 0,0001$  g ble veid i et nitrogenfritt veieskip (Whatman, GmbH, Germany). Prøvene ble sammen med veieskipet overført til Kjeldahl-rør og Kjeltabs bestående av kopparsulfat og kaliumsulfat samt 15 ml svovelsyre tilsatt. Prøvene deretter varmet opp til  $420\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 45 minutter og står siden til avkjøling frem til de når romtemperatur. Kjeldahl-røret ble så plassert inn i Kjeltec auto 2300 analyser (Foss Tecator AB, Hoganas, Sweden) for analyse av nitrogeninnhold etter forhåndsinnstilling av prøvevekt på analyseapparatet. 2.4.5 Yttrium

For analyse av markør i fôr og gjødsel ble frysetørkede prøver på 150-200 mg brent ved  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$  over natten i glass ampuller i en scintillator. Når prøvene var nedkjølt ble 5 ml HCl:HNO<sub>3</sub>, 2:1(v/v) tilsatt og prøvene ble kokt til fargeløst. Når nedkjølt, ble noen dråper vann tilsatt; prøvene ble oppløst i 1.25 ml HNO (konsentrert) og utvannet til 25 ml destillert vann. Konsentrasjonen ble målt ved å bruke en ICAP-AES spektrometer (Model 1100, Thermo Jarrell/Ash, Franklin, MA, USA) hos Eurofins miljøtestings lab, Norge/Moss.

### 3.5 Kalkulasjoner og statistiske analyser

Resultatene av fiskevekst ble vurdert basert på forskjellige indekser, avledet ved å bruk av følgende utregninger som er gjengitt under.

$$\text{Feed conversion ratio (FCR)} = \frac{\text{Total feed intake in dry basis (g)}}{\text{Weight gain (g)}}$$

Fôrfaktor (engelsk: Feed Conversion Rate) viser forholdet mellom hvor mye vekt en fisk øker per kilogram fôr fisken får. Beregningene ble gjort ved bulkveing av fisken ved forsøksslutt og ved å holde nøye kontroll på fôrforbruket.

$$\text{Protein efficiency ratio (PER)} = \frac{\text{Weight gain (g)}}{\text{Total protein ingested (g)}}$$

Protein effektivetsrate (engelsk: Protein efficiency ratio) viser forholdet mellom gram i kroppsvektøkning til gram med protein konsumert over en tidsperiode.

$$\text{Significant growth rate (SGR)} = \left( \frac{\text{Ln}(W_f) - \text{Ln}(W_i)}{d} \right) \times 100$$

Hvor,  $W_f$ = endelig kroppsvekt hos fisk (g/fisk),  $W_i$ = startvekt av fisk (g/fisk). d er antall fôrdager.

SGR (engelsk: Significant Growth Rate), spesifikk vekstrate, er et mål på hvor mye fisken vokser per dag i prosent av kroppsvekt. Denne ligningen tar ikke høyde for temperaturen. Beregningene ble gjort ved måling av enkeltindividene ved forsøksstart og forsøksslutt.

$$\text{Thermal growth coefficient(TGC)} = \frac{(W_f)^{1/3} - (W_i)^{1/3}}{(T \times d)} \times 1000$$

Hvor,  $W_f$ = endelig kroppsvekt hos fisk (g/fisk),  $W_i$ = startvekt av fisk (g/fisk). T er temperaturen i °C og d er antall fôrdager.

Vekstfaktor 3 (engelsk: Thermal growth coefficient) er et mål på vekstytelsen til fisken med hensyn til døgngrader. Beregningene ble gjort ved måling av enkeltindividene ved forsøksstart og forsøksslutt.

$$\text{Vekst Weight gain (\%)(WG)} = \left( \frac{W_f - W_i}{W_i} \right) \times 100$$

Hvor,  $W_f$ = endelig kroppsvekt hos fisk (g/fisk),  $W_i$ = startvekt av fisk (g/fisk).

Vektøkning (engelsk: Weight Gain) er et mål på vektøkningen til fisken i prosent fra startvekt til sluttvekt. Beregningene ble gjort ved måling av enkeltindividene ved forsøksstart og forsøksslutt.

$$\text{Condition factor (CF)} = \left( \frac{100 \times W}{FL^3} \right)$$

W = (engelsk: Weight) = Vekt. FL= (engelsk: Fork Lenght) Lengde fra snute til gaffel i cm.

Kondisjonsfaktor (engelsk: CF = Condition Factor) beregnes ved bruk av Fultons formel, og den er uttrykt som forholdet mellom vekt og lengde.

Alle statistiske analyser ble utført ved bruk av SPSS 2.0 programvare for windows.

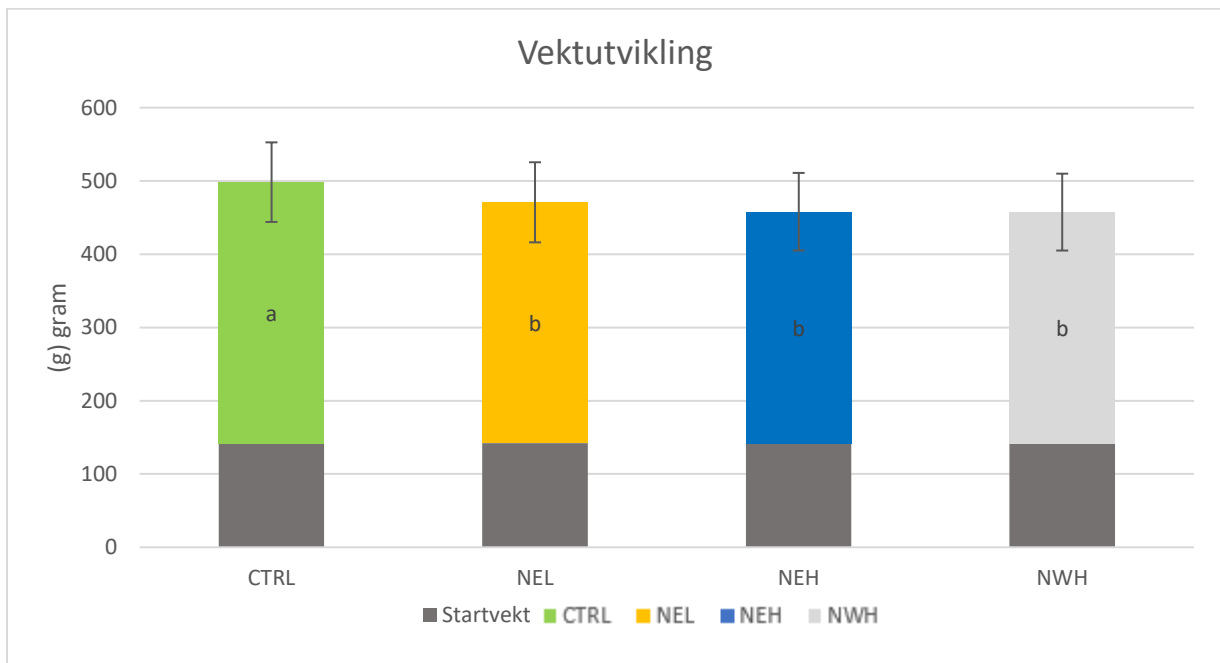
Dataene ble normalitetstestet (Shapiro-Wilk normality test) og likhet av varians (Levene's test). For parametriske data ble enveisanalyse av varians (ANOVA) brukt. Deretter, Tukeys multiple comparison test, ble brukt for å identifisere de signifikante forskjellene mellom gjennomsnittet til de ulike gruppene i eksperimentet. For ikke-parametriske data, Kruskal-Wallis test, etterfulgt av Duncan's multiple sammenlignings test for å dechifferere de signifikante forskjellene mellom gruppene.  $p < .05$  ble brukt for å indikere forskjell.

## 4.0 Resultater

### 4.1 Vekt helfisk

Vekt helfisk er presentert i figur 4. Startvekten til laksen mellom de fire forsøksgruppene var tilnærmet lik. Vekten varierte fra  $141.7\text{g} \pm 27.8\text{g}$  –  $142.0\text{g} \pm 27.2\text{g}$  (Gjennomsnitt  $\pm$  SD) mellom gruppene (diettene) ved uke 0. Det var heller ingen vesentlig vektforskjell på individene innad i gruppene på starttidspunktet.

Vekten økte til  $356.5\text{g} \pm 5.5$ ,  $328.8\text{g} \pm 6.9\text{g}$ ,  $316.3\text{g} \pm 4.8\text{g}$  og  $315.6\text{g} \pm 7\text{g}$  ved sluttmåling for henholdsvis kontrollgruppen, NEL, NEH, og NWH. Dette tilsvarer en økning i vekt på mellom 2-2.5 ganger gjennom 9 uker. Gruppen fôret med kontrollfôret hadde signifikant høyere vekt.



Figur 4: Helfisk vekt (gjennomsnitt  $\pm$  SD av sluttvekt) av laksen fôret med ulike nivå av mikroalger (*Nannochloropsis Oceanica*).

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

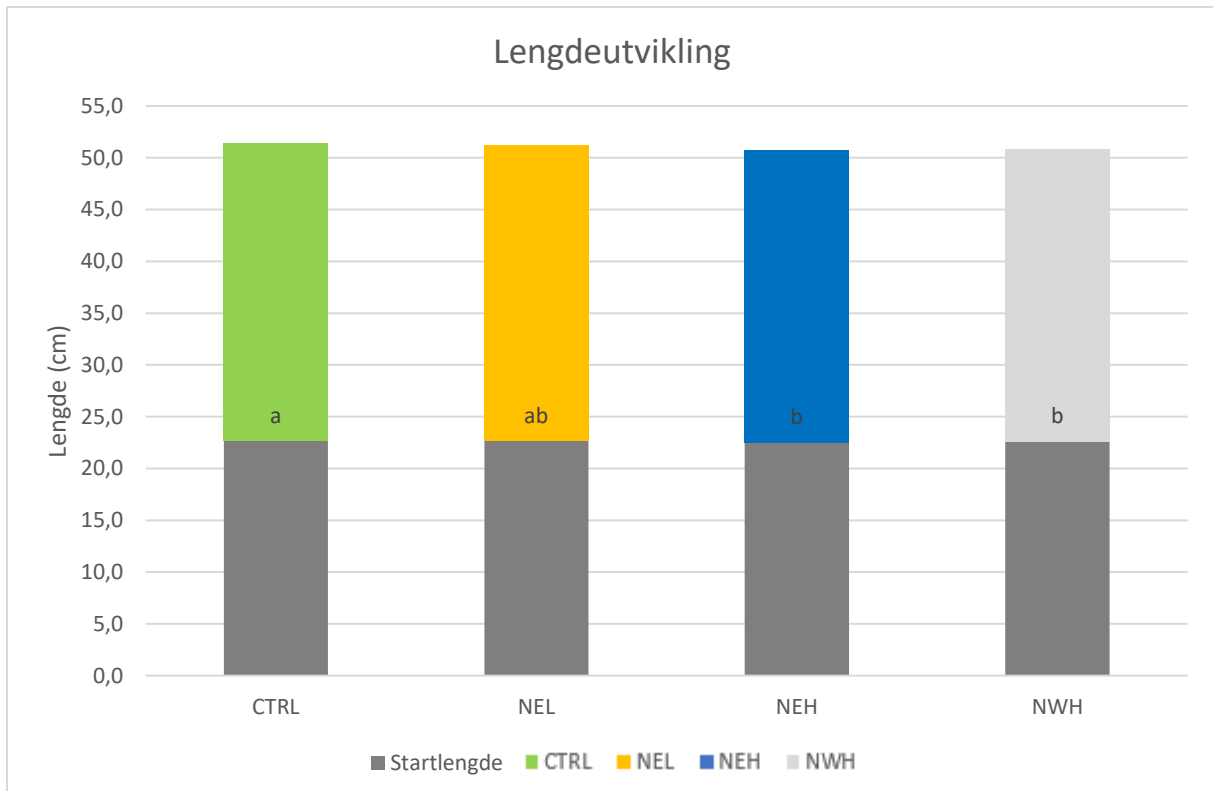
NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

a, b viser signifikante forskjeller.  $p < .05$ ,  $N = 5$

## 4.2 Lengde

Lengde er presentert i figur 5. Gjennomsnittlig lengde til laksen i forsøket varierte fra 22.56 cm  $\pm$  1.57 cm – 22.66 cm  $\pm$  1.51 cm for alle dietter ved uke 0. dette økte til 28.76 cm  $\pm$  1.71 cm, 28.54 cm  $\pm$  1.66 cm, 28.2 cm  $\pm$  1.66 cm og 28.2 cm  $\pm$  1.57 cm ved sluttmåling for henholdsvis kontrollgruppen, NEL, NEH og NWH. Statistisk signifikans ble funnet mellom kontrollgruppen og gruppene NEH og NWH ( $p < 0.033$ ).



Figur 5: Helfisk vekt (gjennomsnitt  $\pm$  SD) av laksen føret med ulike nivå av mikroalger (*Nannochloropsis Oceanica*).

*CTRL* = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

*NEL* = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

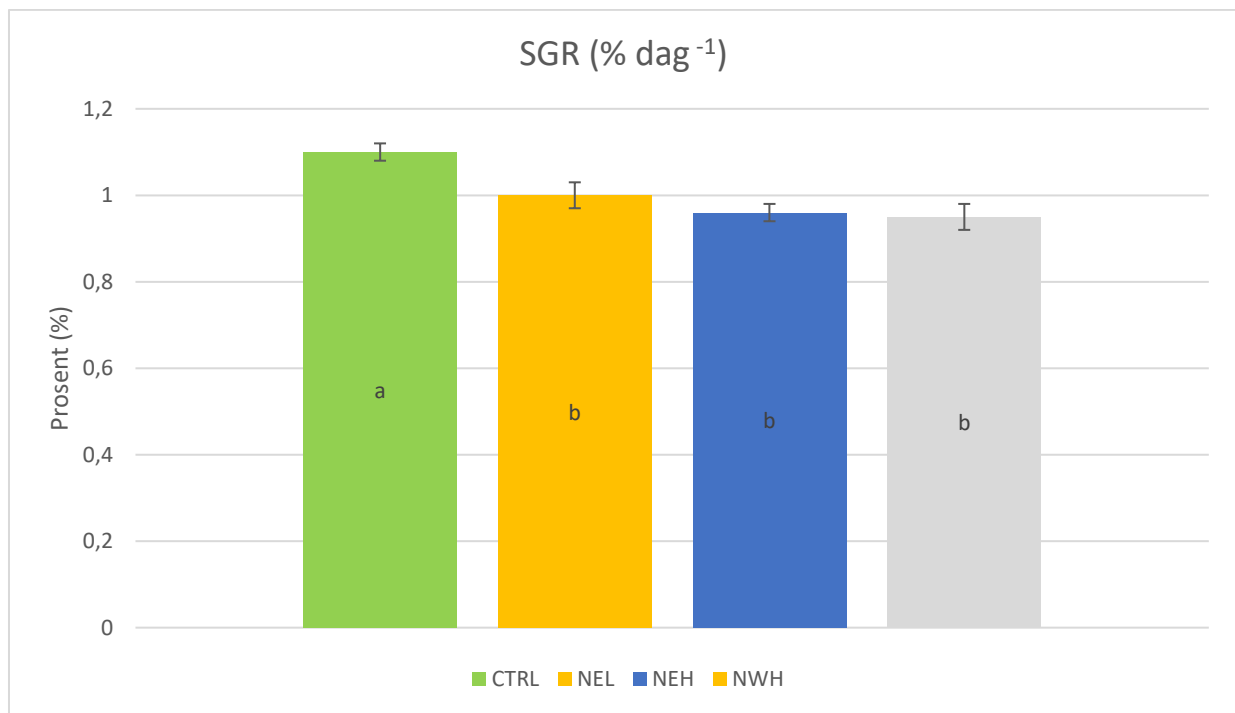
*NEH* = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

*NWH* = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

a, b viser signifikante forskjeller.  $p < .05$ ,  $N = 5$

### 4.3 Spesifikk vekstrate (SGR)

Spesifikk vekstrate er presentert i figur 6. Vekstraten i prosent daglig tilvekst (heretter – SGR) til laksen i forsøket varierte fra 0.95% - 1.1% for alle gruppene ved sluttmåling for henholdsvis kontrollgruppen, NEL, NEH og NWH. Kontrollgruppen hadde signifikant høyere prosentvis daglig tilvekst sammenlignet med de øvrige forsøksgruppene.



Figur 6: Spesifikk vekstrate (gjennomsnitt  $\pm$  SD) hos atlantisk laks føret med ulike nivå av mikroalger (*Nannochloropsis Oceania*)

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceania*)

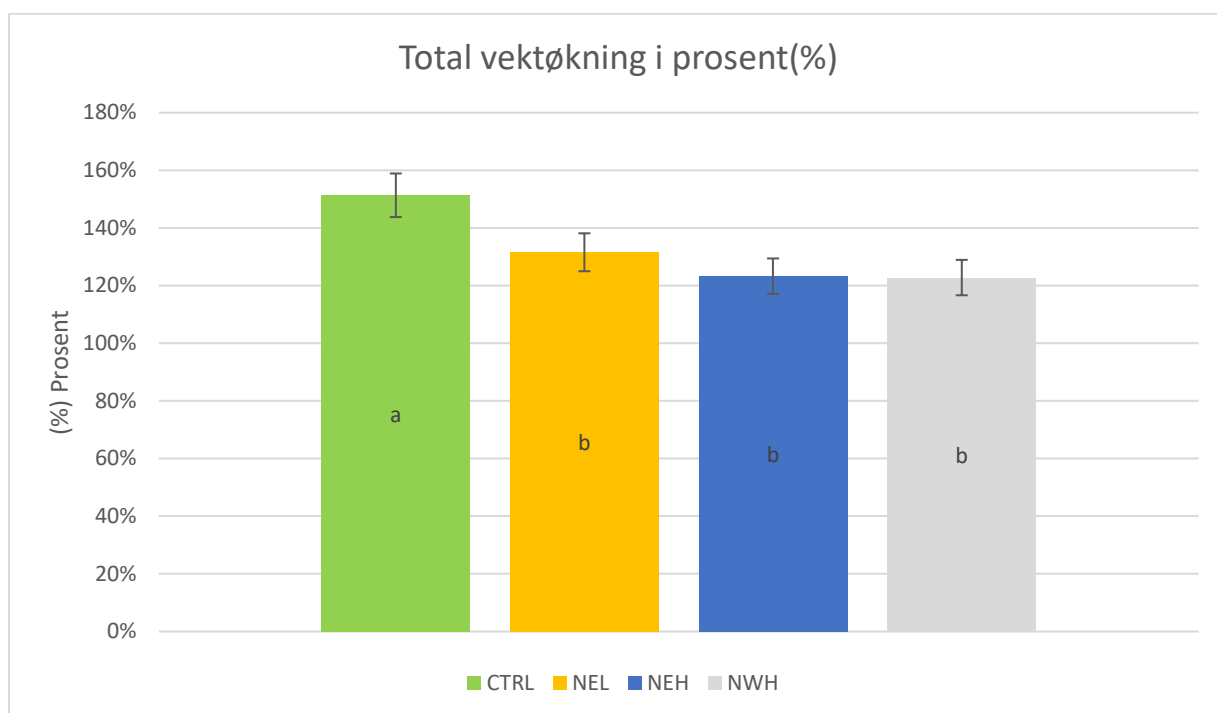
NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceania*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceania*)

a, b viser signifikante forskjeller.  $p < .05$ ,  $N = 5$

#### 4.4 Vektøkning i prosent

Total økning i vekt vist i prosent fra start til slutt i forsøket er presentert i figur 7. Veksten varierte fra 123% til – 151% mellom alle forsøksgruppene ved sluttmåling for henholdsvis kontrollgruppen, NEL, NEH og NWH. Det var ingen signifikant forskjell mellom forsøksgruppene NEL, NEH og NWH, men kontrollgruppen hadde signifikant høyere prosentvis vektøkning sammenlignet med de øvrige forsøksgruppene ( $p < 0.001$ ).



Figur 7: Total vektøkning i prosent (%) hos atlantisk laks føret med ulikt nivå av mikroalgen (*Nannochloropsis Oceanica*)

*CTRL* = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

*NEL* = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

*NEH* = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

*NWH* = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

a, b viser signifikante forskjeller.  $p < .05$ ,  $N = 5$

#### 4.5 Fôrinntak, fôrfaktor, protein effektivitetsrate og kondisjonsfaktor

Fôrfaktor, protein effektivitetsrate og kondisjonsfaktor presentert i tabell 4.

Fôrfaktoren var signifikant høyere i gruppene NEH og NWH sammenlignet med CTRL og NEL ( $p = .001$ ). Proteineffektivitetsraten var signifikant høyere i CTRL og NEL enn i de øvrige gruppene NEH og NWH ( $p < .001$ ). NWH hadde signifikant lavere kondisjonsfaktor enn gruppen CTRL.

Tabell 4: Fôrfaktor, proteineffektivitetsrate og kondisjonsfaktor hos atlantisk laks fôret med ulikt nivå av mikroalgen (*Nannochloropsis Oceanica*)

	CTRL	NEL	NEH	NWH	ANOVA P-value
FI	$0.52 \pm 0.01^a$	$0.51 \pm 0.00^a$	$0.56 \pm 0.00^a$	$0.55 \pm 0.00^a$	$< 0.001$
FCR	$0.73 \pm 0.02^b$	$0.75 \pm 0.01^b$	$0.85 \pm 0.02^a$	$0.85 \pm 0.03^a$	0.001
PER	$2.97 \pm 0.07^a$	$3.03 \pm 0.05^a$	$2.54 \pm 0.05^b$	$2.56 \pm 0.08^b$	$< 0.001$
CF	$1.48 \pm 0.01^a$	$1.44 \pm 0.01^{ab}$	$1.42 \pm 0.02^{ab}$	$1.41 \pm 0.02^b$	0.044

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

a, b viser signifikante forskjeller.  $p < .05$ ,  $N = 5$

#### 4.6 Kjemisk sammensetning

Tabell 5 viser helfisk gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD, det er verdier for tørrstoff, væskeinnhold, råprotein, råfett og aske. Fuktighet (%) av tørrstoff var signifikant høyere i NWH sammenlignet med kontrollgruppen, NEL og NEH ved sluttmålingen ( $p = 0.017$ ). Det var ingen signifikant forskjell mellom CTRL, NEL og NEH, men protein innholdet i NWH var signifikant høyere enn i de øvrige forsøksgruppene ( $p = 0.031$ ). NEL hadde signifikant lavere fettinnhold sett i forhold til gruppene CTRL, NEH og NWH ( $p = 0.032$ ).

Tabell 5: Kjemisk sammensetning og energi innhold av helfisk laks (Gjennomsnitt  $\pm$  SD) fôret med dietter med ulikt nivå mikroalger (*Nannochloropsis Oceania*).

	Kontroll		NEL		NEH		NWH		ANOVA p-verdi
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	
Vann (%) av tørrstoff	68.46 <sup>b</sup>	0.37	68.89 <sup>b</sup>	0.12	68.49 <sup>b</sup>	0.4	69.89 <sup>a</sup>	0.28	0.017
Protein	55.93 <sup>b</sup>	0.92	55.75 <sup>b</sup>	0.47	56.62 <sup>b</sup>	0.8	58.7 <sup>a</sup>	0.46	0.031
Fett	37.85 <sup>a</sup>	1.24	34.53 <sup>b</sup>	0.53	37.47 <sup>a</sup>	0.81	38.21 <sup>a</sup>	0.74	0.032
Aske	6.37	0.18	6.88	0.16	6.73	0.21	6.76	0.13	0.237
Energi (Kj/g)	26.04	0.19	25.93	0.13	25.93	0.10	26.19	0.27	0.730

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceania*)

NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceania*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceania*)

a, b viser signifikante forskjeller.  $p < .05$ ,  $N = 5$



#### 4.7 Fettsyresammensetning

Fettsyresammensetningen i fisken er presentert i tabell 6. Mettet fett (**SFA**) var signifikant høyere i kontrollgruppen enn alle de øvrige forsøksgruppene ( $p < .001$ ). Den dominerende fettsyren er palmitinsyre (C16:0) deretter stearinsyre (C18:0) og myristinsyre (C:14). Innholdet av palmitinsyre (C16:0) og stearinsyre (C18:0) er signifikant høyere i CTRL sammenlignet med NEL, NEH og NWH ( $p < .001$ ). For behensyre (C22:0) var CTRL signifikant lavere enn NEL ( $p < .001$ ).

For Enumettede fettsyrer (**MUFA**) var NEH og NWH signifikant lavere enn hos CTRL og NEL gruppen ( $p = .001$ ). Den dominerende fettsyren er Elaidinsyre (C18:1n-9) suksedert av Palmitolsyre (C:16: 1 n-9) og Vaksensyre (C18:1n-7). Palmitolsyre (C:16: 1 n-9) innholdet viste signifikante forskjeller mellom samtlige grupper hvor høyeste verdi var i NWH etterfulgt av NEH, NEL og CTRL ( $p = .001$ ). Innhold av Elaidinsyre (C18:1n-9) var signifikant lavere i gruppene NEH og NWH i forhold til NEL, og CTRL hadde signifikant høyere verdi enn NEL ( $p = .001$ ). Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene på nivåene av vaksensyre (C18:1n-7) og gadolsyre (C20:1n-11).

Kontrollgruppen hadde signifikant lavere innhold av Flerumettede fettsyrer (**PUFA**) enn NEL, NEH og NWH ( $p = .002$ ).

Flerumettede n-6 fettsyrer var signifikant høyere i gruppene CTRL og NEL sammenlignet med de øvrige forsøksgruppene NEH og NWH ( $p < .001$ ). Den dominerende n-6 fettsyren er Linolsyre (C18:2n-6). Gruppene CTRL og NEL hadde signifikant høyere nivå Linolsyre (C18:2n-6) enn de øvrige forsøksgruppene. Eikosadiensyre (C20:2n-6) var i CTRL signifikant høyere enn i forsøksgruppene NEL, NEH og NWH.

Nivåene av n-3 fettsyrer var signifikant høyere i forsøksgruppene NEL, NEH og NWH sammenlignet med CTRL ( $p < .001$ ). Den dominerende n-3 fettsyren er Docosahexaensyre (C22:6n-3, DHA) etterfulgt av Eikapentaensyre (C20:5n-3, EPA) og Stearidonsyre (C:18: 4n-3). Innholdet av Linolensyre (C18: f3n-3) var signifikant høyere i CTRL og NEL enn i gruppene NEH og NWH ( $p < .001$ ). For Stearidonsyre (C:18: 4n-3) var innholdet i gruppene NEL og NEH signifikant høyere sammenlignet med NWH, CTRL var signifikant lavere enn

NWH. Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene på nivåene av eikosatraensyre (C20:4n-3). Nivået av fettsyrene Eikosapentaensyre (C20:5n-3, EPA) og Docosapentaensyre (C22:5n-3, DHA) var signifikant lavere i gruppene CTRL og NEL sammenlignet med NEH og NWH. Docosahexaensyre (C22:6n-3) var signifikant høyere i CTRL sammenlignet med de andre forsøksgruppene NEL, NEH og NWH( $p < .001$ ).

Kontrollgruppen og NEL hadde signifikant høyere innhold av n-6 enn NEH og NWH. Det var ingen signifikant forskjell i mengde **EPA+DHA** mellom NEL, NEH og NWH, men innholdet i kontrollgruppen var signifikant lavere enn i forsøksgruppene ( $p < .001$ ).

Tabell 6: fettsyresammensetning (% av totale fettsyrer) i filetene hos atlantisk laks (*Salmo Salar L*) føret med de ulike forsøksfødrene

Fettsyre %	CTRL	NEL	NEH	NWH	p-verdi ANOVA
Mettede fettsyrer					
C14:0	2.81 ± 0.02	2.78 ± 0.02	2.77 ± 0.02	2.81 ± 0.02	0.288
C16:0	13.10 ± 0.1 <sup>a</sup>	12.15 ± 0.12 <sup>b</sup>	12.25 ± 0.07 <sup>b</sup>	12.33 ± 0.11 <sup>b</sup>	< 0.001
C:18	3.33 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.85 ± 0.02 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.04 <sup>b</sup>	< 0.001
C22:0	1.54 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.86 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.66 ± 0.06 <sup>bc</sup>	< 0.001
ΣSFAs	20.78 ± 0.14 <sup>a</sup>	19.73 ± 0.12 <sup>b</sup>	19.61 ± 0.07 <sup>b</sup>	19.66 ± 0.15 <sup>b</sup>	< 0.001
Enumettet fettsyrer					
C16:1n-9	3.55 ± 0.02 <sup>d</sup>	3.74 ± 0.02 <sup>c</sup>	3.88 ± 0.01 <sup>b</sup>	4.06 ± 0.02 <sup>a</sup>	< 0.001
C18:1n-9	34.82 ± 0.18 <sup>a</sup>	34.35 ± 0.15 <sup>b</sup>	33.75 ± 0.11 <sup>c</sup>	33.34 ± 0.18 <sup>c</sup>	< 0.001
C18:1n-7	3.21 ± 0.01	3.20 ± 0.01	3.20 ± 0.01	3.20 ± 0.01	0.789
C20:1n-11	2.64 ± 0.10	2.72 ± 0.13	2.57 ± 0.09	2.84 ± 0.08	0.301
ΣMUFAs	44.23 ± 0.14 <sup>a</sup>	44.03 ± 0.14 <sup>a</sup>	43.41 ± 0.14 <sup>b</sup>	43.44 ± 0.20 <sup>b</sup>	0.001
n-6 Flerumettede fettsyrer					
C18:2n-6	12.91 ± 0.09 <sup>a</sup>	12.90 ± 0.07 <sup>a</sup>	12.67 ± 0.05 <sup>b</sup>	12.57 ± 0.05 <sup>b</sup>	< 0.001
C20:2n-6	0.91 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.01 <sup>b</sup>	< 0.001
Σn-6 FAs	13.82 ± 0.08 <sup>a</sup>	13.78 ± 0.08 <sup>a</sup>	13.51 ± 0.04 <sup>b</sup>	13.4 ± 0.05 <sup>b</sup>	< 0.001
n-3 Flerumettede fettsyrer					
C18:3n-3	3.79 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.74 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.65 ± 0.02 <sup>b</sup>	3.61 ± 0.04 <sup>b</sup>	< 0.001
C18:4n-3	0.92 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.13 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.02 <sup>b</sup>	< 0.001
C20:4n-3	0.78 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.77 ± 0.00	0.867
C20:5n-3	4.04 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.26 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.55 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.66 ± 0.13 <sup>a</sup>	< 0.001
C22:5n-3	1.46 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.41 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.52 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.01 <sup>a</sup>	< 0.001
C22:6n-3	8.57 ± 0.14 <sup>b</sup>	9.93 ± 0.15 <sup>a</sup>	9.76 ± 0.14 <sup>a</sup>	9.78 ± 0.26 <sup>a</sup>	< 0.001
Σn-3 FAs	19.54 ± 0.20 <sup>b</sup>	21.23 ± 0.15 <sup>a</sup>	21.35 ± 0.19 <sup>a</sup>	21.42 ± 0.40 <sup>a</sup>	< 0.001
ΣPUFAs	33.36 ± 0.28 <sup>b</sup>	35.01 ± 0.12 <sup>a</sup>	34.86 ± 0.23 <sup>a</sup>	34.82 ± 0.39 <sup>a</sup>	0.002
EPA+DHA	12.60 ± 0.17 <sup>b</sup>	14.19 ± 0.16 <sup>a</sup>	14.31 ± 0.18 <sup>a</sup>	14.44 ± 0.38 <sup>a</sup>	< 0.001

Engelsk: SFAs, Saturated fatty acids; MUFAs, Monounsaturated fatty acids; n-6 PUFAs, Omega-6 polyunsaturated fatty acids; n-3 PUFAs, Omega-3 polyunsaturated fatty acids; PUFAs, Polyunsaturated fatty acids.

CTRL = Kontroll = ingen innblanding av mikroalger

NEL = *Nannochloropsis Extruded Low* (7.5% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NEH = *Nannochloropsis Extruded High* (15% innblandingsnivå av ekstrudert *Nannochloropsis Oceanica*)

NWH = *Nannochloropsis Whole High* (15% innblandingsnivå av uprossesert *Nannochloropsis Oceanica*)

a, b viser signifikante forskjeller.  $p < .05$ ,  $N = 5$

Verdier er uttrykt som gjennomsnitt ± SE ( $n = 5$  replikater av forsøksenheter). Verdier i samme rad med forskjellige opphevede bokstaver indikerer signifikante forskjeller ( $p < .05$ )

## 5.0 Diskusjon

På grunn av begrenset tilgang på fiskemel og fiskeolje brukes det i dag alternative råvarer i fôr til ulike arter (Gatlin et al., 2007; Hardy, 2010). For Atlantisk laks, så har marine råvarer fram til nå i hovedsak blitt erstattet med planteråvarer (Ytrestøyl et al., 2015; Aas et al., 2019), men ulike typer mikroalger kan også være gode alternativer som delvis kan brukes som protein og fettingredienser i fiskefôr (Gong et al., 2019; Gong et al., 2020; Kiron et al., 2016; Kousoulaki et al., 2016; Kousoulaki et al., 2020; Sørensen et al., 2016; Sørensen et al., 2017).

### 5.1 Effekt av fôr på vekst

Forsøksgruppene hadde lav dødelighet og fisken viste god appetitt gjennom forsøket. Resultatene i dette forsøket viste at å erstatte fiskemel med *Nannochloropsis Oceanica* på henholdsvis 7,5% og 15% ga en negativ effekt på sluttvekt, vektøkning, prosent daglig tilvekst og vekstfaktor 3. Disse funnene har likhetstrekk til et annet studie hvor *Nannochloropsis Oceanica* blir tilsatt fôret atlantisk laks (Sørensen et al., 2017) selv om forfatterne kun rapporterte en numerisk reduksjon i vekt. Gong et al. (2019) fant også negativ effekt på vekstparametere ved 20% innblanding av mikroalgen *Scenedesmus* sp.. Lave innblandingsnivåer, mellom 3-6 % av *P. tricornutum* (Sørensen et al., 2016) ga ingen negative effekter på vektøkning og prosent daglig tilvekst hos atlantisk laks. Gruppen av fisk som ble fôret mikroalger i fôret viste likevel ikke signifikante numeriske reduksjon i vektøkning, %-vis vektøkning og spesifikk vekstrate, ved økende innblanding. Forprosesseringen av mikroalgen virket ikke ha noen effekt på vekst mellom gruppene som fikk 15% innblanding i fôret (NEH, NWH). Dette kan forstås slik at prosesseringen ikke utgjør noen forskjell ved et innblandingsnivå på 15% *Nannochloropsis Oceanica*. På grunn av de store kontrastene i resultater virker det være vanskelig å sammenligne forskjellige mikroalgearter på tvers av studier. Det er grunn til å tro at ulike forhold som art, størrelse, fôrformulering, næringsinnhold i fôr og biotilgjengelighet er faktorer som spiller inn når man sammenligner ulike mikroalger i fôr hos ulike fiskearter.

Resultatene i forsøket vårt, basert på numeriske forskjeller i tilvekst, indikerer at det er innblandingsnivået av mikroalgen som utgjør en forskjell på vektøkningen, og ikke prosesseringen. Det hadde derfor vært en fordel å ha med en gruppe i forsøket som ble fôret med 7.5 % innblanding med uprosesserte mikroalger for å kunne teste til hypotesen med større

sikkerhet. Også lavere innblandingsnivå ville vært interessante for å se hvordan de eventuelt påvirker vekstparametere. Designet ble imidlertid valgt basert på resultater fra andre forsøk hvor resultater har pekt på at det er gunstig å forprosessere mikroalgene med en enkelt-skrue ekstruder for å øke tilgjengeligheten og ekstraksjon av kjemiske forbindelser i mikroalger (Wang et al., 2018).

Det ble observert forskjeller i fôrintak (FI) mellom de ulike forsøksgruppene. Gruppene som hadde høyeste innblandingsnivå av mikroalgen i fôret hadde signifikant høyere verdier sammenlignet med de øvrige gruppene. Dette kan tyde på at det ikke var noen negativ effekt på smakeligheten av fôret, og/eller at de kompenserte for lav biotilgjengelighet. Gruppen (NWH) som fikk uprosessert mikroalge ved innblandingsnivå 15% og gruppen (NEH) som fikk forprosessert mikroalge hadde høyere fôrfaktor sammenlignet med gruppen (NEL) som ble fôret ved 7.5% innblanding av forprosessert mikroalge og kontrollgruppen (CTRL). Høyere fôrfaktor i gruppene kan tyde på lav biotilgjengelighet av mikroalgene sammenlignet med CTRL og NEL som hadde høyere nivå av fiskemel. Det var ingen forskjell i fôrfaktor mellom gruppene ved høyeste innblandingsnivå som fikk prosessert og uprosessert fôr.

Fôrfaktor (FCR) var høyere hos forsøksgruppene som fikk 15% innblanding av både forprosessert og uprosessert mikroalge i fôret. Dette tyder på at gruppene som fikk høy innblanding av mikroalgen i fôret nyttegjorde seg mindre effektivt av næringsstoffene sammenlignet med gruppen som fikk 7.5 % innblanding av mikroalger og kontrollgruppen. Dette kan komme av at kontrollgruppen og gruppen som fikk minst innblanding av mikroalgen i fôret også hadde større innblandingsnivå av fiskemel og fiskeolje. I motsetning til observasjonene i dette forsøket, fant Kousoulaki et al. (2015) positiv effekt av forprosessering av mikroalger. Årsaken til dette kan være flere. Mikroalgen blir prosessert både ved en kule mølle og ved ekstrudering, slik at også den «uprosesserte» mikroalgen har fått en form for bearbeiding som kan redusere forskjellene mellom de prosesserte fôrene og det «uprosesserte» fôret.

Proteineffektivitetsraten (PER) var signifikant høyere hos kontrollgruppen og gruppen med lavest innblandingsnivå av mikroalger sammenlignet med gruppene som fikk størst mengde mikroalger i fôret. Dette forteller at proteinet i fôret som inneholder større mengder av mikroalgen ikke har like stor biotilgjengelighet. Andre studier viser lavere proteineffektivitetsrate enn det som ble resultat i dette forsøket (2.54- 3.03) (Gong et al., 2019, Kiron et al., 2016, Sørensen et al., 2016). Resultater fra gruppene med lavest fôrfaktor er likevel

innenfor (2-2.7) som er rapportert i de sistnevnte studiene.

Kondisjonsfaktoren (CF) er fiskens kondisjon og forteller om formen til fisken. Kondisjonsfaktoren er uttrykt ved fiskens vekt i forhold til lengde. Kondisjonsfaktoren var signifikant høyere hos fisken som fikk kontrollfôret sammenlignet med gruppen som fikk uprosesserte mikroalger i fôret. På resultatene kan man se en trend hvor høyere innblanding av mikroalgen medfører lavere kondisjonsfaktor. Her ser man også at den prosesserte mikroalgen har marginalt større verdi enn den uprosesserte. I studien til (Sørensen et al., 2016) kan man se samme trend hvor høyere innblandingsnivå av mikroalger fører til lavere kondisjonsfaktor. Lavere verdier ble funnet i studien (Kiron et al., 2016) hvor verdiene gikk fra 1.05-1.06. Tallene er noe lavere i dette forsøket sammenlignet med det overnevnte studiet, og kan komme av flere årsaker som alder, kjønn, næringsstatus og sesongvariasjoner (Mazumder et al., 2016).

## **5.2 Effekt av fôr på kjemisk sammensetning**

Den kjemiske sammensetningen av helfisk blir ofte målt i fôringsforsøk fordi det sier noe om effekten av ulike fôr (Silva og Chamul, 2000). Slik kan man prøve å forstå hvordan man kan erstatte forråvarer uten å endre den kjemiske sammensetningen til fisken. men sier også noe om fysiologiske forhold og helsestatus (Saliu, Joy & Catherine, 2007; Silva og Chamul, 2000). Endringer i den kjemiske sammensetningen kan vise en helsepåvirkning (Saliu, Joy Catherine, 2007).

Vanninnholdet var signifikant større i gruppen (NWH) som fikk uprosesserte mikroalger i fôret sammenlignet med de øvrige gruppene (CTRL, NEL, NEH). Denne observasjonen sammenfaller med en ikke signifikant lavere vekt på fisken, og at de kjemiske analysene blir påvirket av vekt på fisk. Nivåene av vann synker gradvis som fisken vokser og vil erstattes med lipider (Shearer, 1994).

Proteininnholdet til fisken i forsøket var høyere hos gruppen (NWH) som hadde uprosesserte mikroalger i fôret noe som kan tale for at prosessering av mikroalgen fører til mindre retensjon av proteiner. Resultatene i dette forsøket er i samsvar med (Sørensen et al., 2016) og (Kiron et al., 2016) hvor høyeste verdi av protein ble funnet i gruppen som hadde fått høyest andel av mikroalger i fôret.

Gruppen (NEL) som fikk fôret med minst innblandingsnivå av mikroalgen hadde signifikant lavere fettinnhold sammenlignet med både kontrollgruppen (CTRL) og gruppene (NEH, NWH)

fôret med høyest innblanding av mikroalgen. Gruppen (NWH) med uprosesserte mikroalger hadde de største gjennomsnittlige lipidverdiene. Lipidnivåene i dette studiet er høyere enn nivåene i andre lignende forsøk hvor mikroalger er brukt som ingrediens i fiskefôr hos atlantisk laks (Sørensen et al., 2016; Kiron et al., 2016). Det kan se ut som økt innblanding av mikroalgen fører til høyere fettprosent. Det er vanskelig å forklare hvorfor fettnivåene hos gruppen (NEL) som fikk 7.5% innblanding i fôret er signifikant lavere sammenlignet med de øvrige gruppene. Det lavere nivået er trolig ikke en analysefeil fordi verdien er et gjennomsnitt av samleprøver av fisk fra fem kar, og variasjonen i analyseresultater var lav.

I nivåer av aske ble det ikke funnet noen resultater som var signifikant forskjellige fra hverandre, men man kan se at kontrollgruppen har noe mindre innhold av aske sammenlignet med gruppene som fikk mikroalgen i fôret. Dette er noe over nivåene Sørensen et al. (2016) og Kiron et al. (2016) rapporterte i sine studier, men likheten er at kontrollgruppen i forsøkene har lavere askeinnhold sett i forhold til forsøksgruppene som ble fôret med mikroalger.

Energiinnhold i helfisk mellom de forskjellige gruppene i forsøket var kun marginalt forskjellige, men det er verdt å merke seg at kontrollgruppen (CTRL) og gruppen (NWH) som fikk uprosesserte mikroalger hadde noe høyere verdier.

Det kan tyde på at ved et innblandingsnivå på 15% så vil prosessering av mikroalgen utgjøre liten til ingen forskjell på kjemisk sammensetning av helfisk. Angående innblandingen av mikroalgens påvirkning på øvrige parametere ved kjemisk sammensetning derunder fett, aske og energi var det ingen endringer av signifikant betydning mellom gruppene som fikk høyest innblanding av mikroalgen.

### **5.3 Effekt av fôr på fettsyresammensetning**

Lipider er en svært viktig ingrediens i fôret til laks, den er kilde til energi i tillegg til at den er nødvendig for å transportere andre fettløselige forbindelser som caratenoid pigment, fettløselige vitaminer og det er viktige forløpere til hormoner, samt å sikre andre fysiologiske funksjoner som membranfluiditet (Arts & Kohler, 1995). Laksen sitt krav til essensielle fettsyrer er ikke godt kjent, men ble undersøkt av (Ruyter, Røsjø, Einen & Thomassen, 1999) hvor de fant at laks fôret med 20:5n-3 og 22:6n-6 hadde bedre vekst. Alle fôrvariantene i dette forsøket var tilnærmet iso-lipidske, men grunnet ulikt innhold av fettsyrer i fôret, som en følge av ulike råvarer, blir sammensetningen av fettsyrer forskjellig mellom fisk fôret ulike forsøksfôr. I laks

er sammensetningen av fettsyrer i kjøttet sterkt forbundet med lipidsammensetningen i fôret (Sissener, 2018; Sprague et al., 2016).

Verdiene av mettede fettsyrer (SFA) var større hos fisken som hadde fått større andel fiskemel og fiskeolje i fôret. Gong et al. (2019) sin studie har likhetstrekk til dette forsøket hvor mikroalgen *Scenedesmus* sp. ved innblandingsnivå på 10% og 20% i fôret reduserte mengden mettede fettsyrer i helkropp. I motsetning til funn i dette forsøket, fant Kousoulaki et al. (2015) at mettede fettsyrer i filet økte etter 12 uker hos gruppene som hadde fått *Schizochytrium* sp. Det er verdt å merke at atlantisk laks i Kousoulaki et al. (2015) hadde en større vekt (797g-824g). I et 12 ukers forsøk utført av Knutsen et al. (2019) på flekksteinbit (*anarhicas minor*) ble det brukt mikroalge *Nannochloropsis Oceanica* med innblandingsnivå (7.5, 15%). I samsvar med våre funn rapporterte også Knutsen et al. (2019) en lavere verdi av mettet fett i filetene til gruppene som fikk mikroalgen.

For enumettede fettsyrer (MUFA) var det signifikante forskjeller mellom gruppene (NEH, NWH) som fikk høyest innblanding av mikroalgen i fôret sammenlignet med kontrollgruppen og gruppen som fikk lavest nivå av mikroalgen. Resultatene hos Knutsen et al. (2019) viser samme trend som i dette forsøket hvor mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica* i fôret til fører til marginalt lavere verdier av enumettede fettsyrer. Kousoulaki et al (2015) sitt forsøk viste høyere verdier av MUFA i gruppene som hadde fått mikroalge *Schizochytrium* sp. i fôret sammenlignet med kontrollgruppen og står i kontrast til vårt forsøk hvor verdiene var lavere. Gong et al. (2019) viser også reduksjon av MUFA når atlantisk laks blir fôret med *Scenedesmus* sp. ved et innblandingsnivå på henholdsvis 10% og 20%.

Sum flerumettede fettsyrer (PUFA) viser i signifikante forskjeller mellom kontrollgruppen (CTRL) og de øvrige gruppene (NEL, NEH, NWH) som hadde mikroalgen i fôret. N-6 flerumettede fettsyrer var i likhet med enumettede fettsyrer signifikant lavere hos gruppene (NEH, NWH) som hadde 15% innblanding av mikroalgen i fôret sammenlignet med de øvrige gruppene. N-3 flerumettede fettsyrer viste signifikante forskjeller mellom kontrollgruppen (CTRL) og gruppene (NEL, NEH, NWH) som hadde mikroalgen i fôret. Dette kan komme av de ulike fettkildene som ble gitt til de ulike gruppene, hvor kontrollgruppen fikk størst grad av fiskeolje. Forsøket til Gong et al. (2019) viser likhetstrekk til dette forsøket ved at nivåene av PUFA er merkbart høyere i gruppene som har fått mikroalge (*Scenedesmus* sp.) i fôret. Kousoulaki et al (2015) hadde i sitt forsøk høyeste innhold av PUFA i gruppen som fikk 6% mikroalge (*Schizochytrium* sp.) i fôret, som kan samsvare med vårt forsøks innblandingsnivå på 7.5%. Kousoulaki et al (2015) hadde også likheter ved at gruppen som hadde høyeste



innblandingsnivå (15% *Schizochytrium* sp.) hadde noe lavere PUFA-verdier sammenlignet med gruppene som fikk fôr med lavere innblandingsnivå (3%, 6% *Schizostyrium* sp.). Knutsen et al. (2019) rapporterte også i likhet med Kousoulaki et al. (2015), lavere innhold av PUFA i gruppene som fikk mikroalgen sammenlignet med kontrollgruppen.

Kontrollgruppen (CTRL) hadde signifikant lavere innhold av EPA og DHA sammenlignet med gruppene som fikk mikroalgefôr (NEL, NEH, NWH). Tendensen var at økende innhold av mikroalger førte til høyere EPA+DHA innhold i fisken. Den uprosesserte gruppen (NWH) hadde høyest nivå av DHA+EPA, men man skal være forsiktig med å trekke bombastiske konklusjoner om at dette var en effekt av forprosessering, siden standardavviket er ganske stort. Mikroalgene virker å ha en fettsyrespårende effekt på fetttsyrene EPA og DHA som blir foretrukket lagret i kjøttet fremfor andre PUFA. Resultatene til Kousoulaki et al (2015) viser tydelig økning av EPA og DHA i gruppene som fikk henholdsvis 3% og 6% av mikroalge i fôret, men en innblanding på 15% viste en marginal positiv effekt. I samsvar med vårt forsøk er det en stor økning på EPA og DHA i kousoulaki et al. (2015) på gruppen med 6% innblanding til vår på 7.5%, men gruppen ved 15% hadde ikke like stort fall i nivåene på disse fetttsyrene. Gong et al. (2019) viser signifikant høyere PUFA-nivå i gruppen som fikk 10% mikroalge (*Scenedesmus* sp.) i fôret. Sum EPA og DHA var i forsøket til Knutsen et al. (2019) i likhet med vårt forsøk høyere hos gruppen som hadde fått *Nannochloropsis Oceanica*, men forskjellene var ikke signifikante.

Fettsyresammensetningen til laksen hadde merkbare forskjeller etter forsøksslutt, og nivåer av flerumettede fettsyrer som EPA og DHA ble endret som følge av de ulike fôrformuleringene. Det var høyere verdier av mettede fettsyrer i kontrollgruppen (CTRL), mens verdiene av flerumettede fettsyrer var høyere i laksen som fikk mikroalger i fôret (NEL, NEH, NWH). EPA og DHA verdiene er stigende ved større innblandingsprosent av mikroalgen, og størst i den gruppen (NWH) som fikk uprosessert fôr. Høyere nivå av EPA i muskel er som forventet da EPA-nivået i mikroalgen *Nannochloropsis Oseanica* er høyt. Økningen av EPA -og DHA-nivåene i muskelen hos laks grunnet mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica* er svært gunstig sett fra et ernæringsmessig perspektiv. Forholdet mellom n-3 og n-6 fettsyrer er også fordelaktig i gruppene (NEL, NEH, NWH) som fikk mikroalgen i fôret. Det er bevist at n-3/n-6 forholdet er viktig for å redusere uttrykk av proinflammatoriske gener som kan føre til økt inflammasjonsrepons og dermed økt mottakelighet av sykdommer (Holen et al., 2018).

Nivåene av palmitolsyre (C:16:1n-9) viste signifikante forskjeller hos gruppene som fikk høyeste innblanding av mikroalgen. Steraidonsyre (C18:4n-3) var signifikant høyere hos

gruppen (NEH) som hadde prosesserte mikroalger ved 15% innblandingsnivå sammenlignet med den uprosesserte gruppen (NWH) på 15%. Signifikant ulik effekt som følge av prosesseringen av mikroalgen vistes kun ved disse to fettsyrene (palmitolsyre og steraidonsyre). Det kan tyde på at ved et innblandingsnivå på 15% så vil prosessering av mikroalgen ikke utgjøre noen vesentlig forskjell på sammensetning av fettsyrer i filet. At det ikke var større forskjeller med prosessering på fettsyrer som DHA og EPA var uventet fordi man tenker at prosessering øker biotilgjengeligheten av blant annet disse fettsyrene (Wang et al., 2018).

Innblanding ved begge nivå (7.5% og 15%) av mikroalgen viste påvirkning på fettsyresammensetning, det var endringer av signifikant betydning både av mettede, enumettede og flerumettede fettsyrer. Dette kan være et positivt funn etter som man ønsker et høyere nivå særlig av flerumettet fett og lavere nivå av mettet og enumettet fett.

## 6.0 Konklusjon

Fisk fôret kontrollfôr (CTRL) hadde signifikant høyere vekt (FBW), prosentvis vektøkning (WG), spesifikk vekstrate (SGR) og vekstfaktor 3 (TGC) sammenlignet med de øvrige gruppene (NEL, NEH, NWH) som fikk mikroalgen i fôret. Forinntak (FI) var signifikant høyere hos gruppene (NEH, NWH) med innblandingsnivå på 15% i forhold til CTRL og NEL. Fôrfaktor (FCR) var signifikant lavere hos gruppen (CTRL) fôret kontrollfôr og gruppen som fikk 7.5% innblanding av mikroalger i fôret sammenlignet med gruppene (NEH, NWH) som fikk 15% mikroalge i fôret. Proteineffektivitetsrate (PER) var signifikant høyere hos kontrollgruppen (CTRL) og gruppen med laveste innblandingsnivå (NEL) sammenlignet med gruppene (NEH, NWH) som fikk 15% innblandingsnivå mikroalger i fôret. Kondisjonsfaktor (CF) var signifikant høyere hos kontrollgruppen sammenlignet med gruppen som fikk uprosesserte mikroalger med 15% innblanding (NWH) og viste mindre forskjeller til gruppene som fikk fôrprosesserte mikroalger.

Kjemisk sammensetning varierte noe mellom forsøksgruppene, men det var i hovedsak NWH som skilte seg ut med høyere proteininnhold, og laveste innhold av fett ble registrert i gruppen NEL. Kontroll gruppen (CTRL) hadde signifikant høyere nivå mettet fett (SFA) sammenlignet med gruppene (NEL, NEH, NWH) som fikk mikroalgen i fôret. Enumettet fett (MUFA) var signifikant høyere i kontrollgruppen og gruppen (NEL) som hadde 7.5% innblanding av mikroalgen sammenlignet med gruppene (NEH, NWH) som fikk 15% innblanding. Flerumettet fett (PUFA) og derunder fettsyrene EPA og DHA hadde høyeste nivå i gruppene (NEL, NEH, NWH) sammenlignet med kontrollgruppen (CTRL). Forholdet mellom omega-3 og omega-6 var i gruppene NEL, NEH, NWH gunstigere sammenlignet med kontrollgruppen (CTRL) som ikke hadde mikroalgen i fôret.

Det ble ikke observert forskjeller av betydning mellom uprosesserte og prosesserte mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica* ved 15% innblandingsnivå i fôret. Hvis man legger til grunn 15% innblandingsnivå og de tilnærmet like resultater for prosessert og uprosessert mikroalge i denne studien kan det tyde på at det ikke er nødvendig å prosessere av mikroalger før pelletering. Det er imidlertid et for svakt grunnlag å trekke en slik konklusjon på. Det kunne vært interessant å se videre på om et innblandingsnivå på 7.5% med og uten forprosessering ville gitt et tilsvarende resultat. Fra et produksjonsmessig perspektiv hvis kunne vært interessant å se videre på 7.5 % innblanding uten forprosessering for å se om det er noe å hente i forhold til mindre kostnader ved prosessering. Andre metoder for prosessering kan være viktig å undersøke.

Det var forskjeller mellom gruppene ved forprosessert algeinnblanding *Nannochloropsis Oceanica* på henholdsvis 7.5% og 15%. Resultatene for sluttvekt, spesifikk vekstrate, vekstfaktor 3, fôrfaktor, proteineffektivitetsrate, kondisjonsfaktor, kjemisk sammensetning og fettsyrer ved innblandingsnivå på 7.5% skilte seg positivt fra den prosesserte mikroalgen 15% innblanding. Basert på funnene i dette studiet kan det tyde på at innblandingsnivåene både på 7.5% og 15% ikke fullt ut erstatter ingredienser basert på fiskemel og fiskeolje.

Resultatene i dette studiet viser at mikroalgen *Nannochloropsis Oceanica* ikke fullt ut kan erstatte fiskemel og fiskeolje i fôr til laks. Mikroalger som en fôringrediens er likevel en viktig ingrediens som kan bidra til en bærekraftig ressursforvaltning i fiskeoppdrett. Det vil være viktig for å redusere presset på de marine fôrressursene. Det er behov for mer kunnskap om hvordan ulike fiskearter responderer mikroalgers biokjemiske sammensetning. Biotilgjengelighet av næringsstoffene må testes på de utvalgte artene gjennom forsøk på vekst og fordøyelighet. Det gjenstår fortsatt forsøk med innblandingsnivå og prosessering for å optimalisere bruk av mikroalger i fôr. Kunnskap om prosesseringsmetoder for å redusere produksjonskostnader kan også bety noe for den økonomiske bærekraften.

## 7.0 Litteraturliste

- Aas, T. S., Grisdale-Helland, B., Terjesen, B. F. & Helland, S. J. 2006. Improved growth and nutrient utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing a bacterial protein meal. *Aquaculture*, 259, 365-376.
- Aas, T., Ytrestøyl, T., & Åsgård, T. (2019). Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports*, 15, 100216. doi: 10.1016/j.aqrep.2019.100216
- Arts, M. T., & Kohler, C. C. (2009). *Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency and immune response. Lipids in Aquatic Ecosystems*, 237–256. doi:10.1007/978-0-387-89366-2\_10
- Becker, E.W. (2007). “Micro algae as a source of protein”. *Biotechnology Advances*, 25 (2), 207-210
- Belghit, I., Liland, N. S., Waagbø, R., Biancarosa, I., Pelusio, N., Li, Y., . . . Lock, E.-J. (2018). Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 491, 72-81. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.016
- Borowitzka, M. A. (1997). Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology*, 9(5), 393. doi:10.1023/A:1007921728300
- Breck, O., Bjerkås, E., Campbell, P., Arnesen, P., Haldorsen, P. & Waagbø, R. 2003. Cataract preventative role of mammalian blood meal, histidine, iron and zinc in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) of different strains. *Aquaculture Nutrition*, 9, 341-350.
- Brown, M. R. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145, 79-99.
- Brown, M. R. & Miller, K. A. 1992. The ascorbic acid content of eleven species of microalgae used in mariculture. *Journal of Applied Phycology*, 4, 205-215.
- Brown, M. R. (2002). Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuicola*.
- Bureau, D. P. 2006. Rendered products in fish aquaculture feeds. In: Meeker, D. L. (ed.) *Essential rendering: all about the animal by-products industry*. Arlington, Virginia: Kirby Lithographic Company, 179-194.

- Bureau, D. P., Harris, A. M. & Cho, C. Y. 1999. Apparent digestibility of rendered animal protein ingredients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 180, 345-358.
- Burr, G. S., Barrows, F. T., Gaylord, G. & Wolters, W. R. 2011. Apparent digestibility of macronutrients and phosphorus in plant-derived ingredients for Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquaculture Nutrition*, 17, 570-577.
- Chacón-Lee, T. L., & González-Mariño, G. E. (2010). *Microalgae for “Healthy” Foods-Possibilities and Challenges*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 655–675. doi:10.1111/j.1541-4337.2010.00132.x
- Chamberlain, A. 2011. Fishmeal and Fish Oil – The Facts, Figures, Trends, and IFFO’s Responsible Supply Standard. International fishmeal & Fish oil organisation.
- Cheng, Z. J. & Hardy, R. W. 2002. Apparent Digestibility Coefficients of Nutrients and Nutritional Value of Poultry By-product Meals for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Measured in vivo Using Settlement. *Journal of the World Aquaculture Society*, 33, 458-465.
- Clune, S., Crossin, E., & Verghese, K. (2017). Systematic review of greenhouse gas emissions for different fresh food categories. *Journal of Cleaner Production*, 140, 766-783. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.082>
- Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6), 1163-1174.
- Dong, F. M., Hardy, R. W., Haard, N. F., Barrows, F. T., Rasco, B. A., Fairgrieve, W. T. & Forster, I. P. 1993. Chemical composition and protein digestibility of poultry by-product meals for salmonid diets. *Aquaculture*, 116, 149-158.
- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FAIRR Index 2019. <https://www.fairr.org>. (2019). Hentet 6 Mai 2021, fra <https://www.fairr.org/article/coller-fairr-protein-producer-index-2019/>.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2014A. The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome, Italy (223 pp.).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. Hentet fra <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome. Hentet fra <http://www.fao.org/3/a-i6583e.pdf>
- Ford, R. 1984. Norwegian salmon and trout farming. *Marine Fisheries Review*, 46, 44-47.
- Gisbert, M. 2013. Spray-dried plasma from porcine blood in diets for Atlantic salmon parrs. *International Aquafeed*, 7, 18-37.
- Forskningsrådet 1993. Nutrient Requirements of Fish, Washington, DC, National Academy Press.
- Gatlin III, D. M., Barrows, F. T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T. G., Hardy, R. W., ... & Wurtele, E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture research*, 38(6), 551-579.
- Gisbert, M. 2013. Spray-dried plasma from porcine blood in diets for Atlantic salmon parrs. *International Aquafeed*, 7, 18-37.
- Glencross, B. D., Booth, M., & Allan, G. L. (2007). A feed is only as good as its ingredients—a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture nutrition*, 13(1), 17-34.
- Gong, Y., Bandara, T., Huntley, M., Johnson, Z. I., Dias, J., Dahle, D., . . . Kiron, V. (2019). Microalgae *Scenedesmus* sp. as a potential ingredient in low fishmeal diets for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 501, 455-464. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.049>
- Gong, Y., Guterres, H. a. D. S., Huntley, M., Sørensen, M. & Kiron, V. 2017. Digestibility of the defatted microalgae *Nannochloropsis* sp. and *Desmodesmus* sp. when fed to Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, <https://doi.org/10.1111/anu.12533>.

- Hardy, R. W. (2010). *Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal*. *Aquaculture Research*, 41(5), 770–776. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02349.x
- Hatlen, B., Jakobsen, J. V., Crampton, V., Alm, M., Langmyhr, E., Espe, M., Hevrøy, E. M., Torstensen, B. E., Liland, N. & Waagbø, R. 2015. Growth, feed utilization and endocrine responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets added poultry by-product meal and blood meal in combination with poultry oil. *Aquaculture Nutrition*, 21, 714-725.
- Holen, E., Araujo, P., Sissener, N. H., Rosenlund, G., & Waagbø, R. (2018). *A comparative study: Difference in omega-6/omega-3 balance and saturated fat in diets for Atlantic salmon ( Salmo salar ) affect immune-, fat metabolism-, oxidative and apoptotic-gene expression, and eicosanoid secretion in head kidney leukocytes*. *Fish & Shellfish Immunology*, 72, 57–68. doi:10.1016/j.fsi.2017.10.040
- Kiron, V., Sørensen, M., Huntley, M., Vasanth, G. K., Gong, Y., Dahle, D. & Palihawadana, A. M. 2016. Defatted biomass of the microalga, *Desmodesmus* sp., can replace fishmeal in the feeds for Atlantic salmon. *Frontiers in Marine Science*, 3, 1-12
- Knutsen, H. R., Ottesen, O. H., Palihawadana, A. M., Sandaa, W., Sørensen, M., & Hagen, Ø. (2019). Muscle growth and changes in chemical composition of spotted wolffish juveniles (*Anarhichas minor*) fed diets with and without microalgae (*Scenedesmus obliquus*). *Aquaculture Reports*, 13, 100175. doi:https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2018.11.001
- Kousoulaki, K., Gerd, B., Mørkøre, T., Aleksei, K., Bæverfjord, G., Ytrestøyl, T., . . . Ruyter, B. (2020). Microalgal *Schizochytrium limacinum* Biomass Improves Growth and Filet Quality When Used Long-Term as a Replacement for Fish Oil, in Modern Salmon Diets. *Frontiers in Marine Science*, 7. doi:10.3389/fmars.2020.00057
- Kousoulaki, K., Mørkøre, T., Nengas, I., Berge, R. K., & Sweetman, J. (2016). *Microalgae and organic minerals enhance lipid retention efficiency and fillet quality in Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. *Aquaculture*, 451, 47–57. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.08.027



- Kousoulaki, K., Østbye, T.-K. K., Krasnov, A., Torgersen, J. S., Mørkøre, T. & Sweetman, J. 2015. Metabolism, health and fillet nutritional quality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing n-3-rich microalgae. *Journal of Nutritional Science*, 4, 24.
- Król, E., Douglas, A., Tocher, D. R., Crampton, V. O., Speakman, J. R., Secombes, C. J. & Martin, S. M. 2016. Differential responses of the gut transcriptome to plant protein diets in farmed Atlantic salmon. *BMC Genomics*, 17, 156
- Levic, J., & Sredanovic, S. (2010). Heat treatments in animal feed processing. In *2nd Workshop Feed-to-Food FP7 REGPOT-3. Extrusion technology in feed and food processing, Thematic Proceedings. Novi Sad, Serbia, 19-21 October, 2010* (pp. 1-24). Institute for Food Technology.
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J. & Wu, G. 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 37, 43-53.
- Liland, N. S., Hatlen, B., Takle, H., Venegas, C., Espe, M., Torstensen, B. E., & Waagbø, R. (2014). Including processed poultry and porcine by-products in diets high in plant ingredients reduced liver TAG in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition*, 21(5), 655–669. doi:10.1111/anu.12190
- Liu, Y., Olaf Olaussen, J. & Skonhøft, A. 2011. Wild and farmed salmon in Norway—A review. *Marine Policy*, 35, 413-418.
- Mazumder, S. K., Das, S. K., Bakar, Y. & Ghaffar, M. A. 2016. Effects of temperature and diet on length-weight relationship and condition factor of the juvenile Malabar blood snapper (*Lutjanus malabaricus*). *Journal of Zhejiang University. Science-B*, 17, 580-90
- Miles, R. D. & Chapman, F. A. 2015. The benefits of fish meal in aquaculture diets. Gainesville: University of Florida, IFAS extension.
- Misra, C. K., Das, B. K., Mukherjee, S. C. & Pattnaik, P. 2006. Effect of long term administration of dietary  $\beta$ -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255, 82-94.
- Moldal, T., Løkka, G., Wiik-Nielsen, J., Austbø, L., Torstensen, B. E., Rosenlund, G., et al. (2014). Substitution of dietary fish oil with plant oils is associated with shortened mid intestinal folds in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Veterinary Research*. Res. 10:60. doi: 10.1186/1746- 6148-10-60

- Napolitano, G. E. 1999. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In: Arts, M. T. & Bruce, C. W. (eds.) *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York: SpringerVerlag, 21-44.
- Naylor, R. L., Hardy, R. W., Bureau, D. P., Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A. P., Forster, I., Gatlin, D. M., Goldberg, R. J., Hua, K., & Nichols, P. D. (2009). Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15103–15110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905235106>
- Olafsen, T., Richardsen, R., Nystøyl, R., Strandheim, G. & Kosmo, J. P. 2014. Analysis of marine by-products 2013 English summary. SINTEF Fisheries and Aquaculture.
- Olsen, R. E., Waagbø, R., Ringø, E., Melle, W. & Lall, S. P. 2010. Alternative Marine Resources. In: Turchini, G. M., Keong Ng, W. & Tocher, D. R. (eds.) *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*. Boca Raton: CRC press, 267-324.
- Olsen, R. L. & Hasan, M. R. 2012. A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, 27, 120-128.
- Olvera-Novoa, M. A., Domínguez-Cen, L. J., Olivera-Castillo, L. & Martínez-Palacios, C. A. 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, (*Oreochromis mossambicus*), fry. *Aquaculture Research*, 29, 709-715.
- Ossenkamp, G. (2018). Mikroalger til fôr i eit miljøperspektiv. Hentet 10 November 2020, fra <https://img4.custompublish.com/getfile.php/4088656.2344.wnsamz7klap7pp/Fjordalg,+Gabriel+Ossenkamp.pdf?return=sfjfk.custompublish.com>
- Refstie, S., Korsøen, Ø. J., Storebakken, T., Baevefjord, G., Lein, I. & Roem, A. J. 2000. Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 190, 49-63.
- Ringø, E., Olsen, R. E., Jensen, I., Romero, J., & Lauzon, H. L. (2014). *Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 24(4), 1005–1032. doi:10.1007/s11160-014-9361-y

- Romarheim, O. H., Overland, M., Mydland, L. T., Skrede, A. & Landsverk, T. 2011. Bacteria grown on natural gas prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon. *The Journal of Nutrition*, 141, 124-30.
- Rosenlund, G., Torstensen, B. E., Stubhaug, I., Usman, N. & Sissener, N. H. 2016. Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *Journal of Nutritional Science*, 5, 1-13.
- Roy, S. S. & Pal, R. 2015. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proceedings of the Zoological Society*, 68, 1-8.
- Ruyter, B., Sissener, N., Østbye, T., Simon, C., Krasnov, A., Bou, M., . . . Berge, G. (2019). N-3 Canola oil effectively replaces fish oil as a new safe dietary source of DHA in feed for juvenile Atlantic salmon. *British Journal of Nutrition*, 122(12), 1329-1345. doi:10.1017/S0007114519002356
- Ruyter, B., & Thomassen, M. S. (1999). *Metabolism of n-3 and n-6 fatty acids in Atlantic salmon liver: Stimulation by essential fatty acid deficiency*. *Lipids*, 34(11), 1167–1176. doi:10.1007/s11745-999-0468-3
- Rørvik, K. A., Dehli, A., Thomassen, M., Ruyter, B., Steien, S. H. & Salte, R. 2003. Synergistic effects of dietary iron and omega-3 fatty acid levels on survival of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) during natural outbreaks of furunculosis and cold water vibriosis. *Journal of Fish Diseases*, 26, 477-485.
- Sahoo, P. K. & Mukherjee, S. C. 2001. Effect of dietary beta-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B1-induced immunocompromised Rohu (*Labeo rohita*). *Fish Shellfish Immunology*, 11, 683-95.
- Saliu J.K., Joy O., Catherine O. Condition factor, fat and protein content of five fish species in Lekki Lagoon. *Nigeria. Life Sci. J.* 2007;4:54–57.
- Salze, G. P. & Davis, D. A. 2015. Taurine: a critical nutrient for future fish feeds. *Aquaculture*, 437, 215-229.
- Sandnes, K., Ulgenes, Y., Braekkan, O. R. & Utne, F. 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43, 167-177.

- Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Kabir Chowdhury, M. A., Parsaeimehr, A., . . . Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30(1), 197-213. doi:10.1007/s10811-017-1234-z
- Shearer, K. D. 1994. Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture*, 119, 63-88.
- Shepherd, C. J., Monroig, O. & Tocher, D. R. 2017. Future availability of raw materials for salmon feeds and supply chain implications: The case of Scottish farmed salmon. *Aquaculture*, 467, 49-62.
- Shield, R.J., and Lupatsch I. (2012). “Algae for Aquaculture Animal Feeds”.
- Silva J.J., Chamul R.S. Composition of marine and fresh water finfish and shell fish species and their products. In: Martin R.E., Carter E.P., Flick E.Y., Davis L.M., editors. *Marine and fresh water products handbook*, Lancaster, Pennsylvania. Technomic Publishing Company; USA: 2000. pp. 31–46.
- Sissener, N. H. (2018). *Are we what we eat? Changes to the feed fatty acid composition of farmed salmon and its effects through the food chain. The Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl 1), jeb161521. doi:10.1242/jeb.161521
- Sissener, N. H., Torstensen, B. E., Stubhaug, I. & Rosenlund, G. 2016. Long-term feeding of Atlantic salmon in seawater with low dietary long-chain n-3 fatty acids affects tissue status of the brain, retina and erythrocytes. *British Journal of Nutrition*, 115, 1919-1929.
- Skov, J., Kania, P. W., Holten-Andersen, L., Fouz, B. & Buchmann, K. 2012. Immunomodulatory effects of dietary  $\beta$ -1,3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri*. *Fish & Shellfish Immunology*, 33, 111-120.
- Skrede, A., Berge, G. M., Storebakken, T., Herstad, O., Aarstad, K. G. & Sundstøl, F. 1998. Digestibility of bacterial protein grown on natural gas in mink, pigs, chicken and Atlantic salmon. *Animal Feed Science and Technology*, 76, 103-116.
- Skrede, A., Mydland, L. T., Ahlstrøm, Ø., Reitan, K. I., Gislerød, H. R. & Øverland, M. 2011. Evaluation of microalgae as sources of digestible nutrients for monogastric animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20, 131-142.

- Solar, I. I. 2009. Use and exchange of salmonid genetic resources relevant for food and aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 1, 174-196.
- Sommer, T. R., D'souza, F. M. L. & Morrissy, N. M. 1992. Pigmentation of adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture*, 106, 63-74
- Sprague, M., Walton, J., Campbell, P. J., Strachan, F., Dick, J. R. & Bell, J. G. 2015. Replacement of fish oil with a DHA-rich algal meal derived from *Schizochytrium* sp. on the fatty acid and persistent organic pollutant levels in diets and flesh of Atlantic salmon (*Salmo salar*.) post-smolts. *Food Chemistry*, 185, 413-421.
- Sprague M., Dick J.R & Tocher. D.R., (2016). Impact of sustainable feeds on omega-3 longchain fatty acid levels in farmed Atlantic salmon, 2006–2015. *Scientific Reports* 6, Article number: 21892.
- SSB 2020-10-29. (2020). Hentet 11 Oktober 2020, Hentet fra <https://www.ssb.no/jord-skog-jakt-og-fiskeri/statistikker/fiskeoppdrett/aar>
- Storebakken, T., Shearer, K. D., Baeverfjord, G., Nielsen, B. G., Åsgård, T., Scott, T. & De Laporte, A. 2000. Digestibility of macronutrients, energy and amino acids, absorption of elements and absence of intestinal enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with wheat gluten. *Aquaculture*, 184, 115-132.
- Stork, N. E. (2018). How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63(1), 31-45. doi:10.1146/annurev-ento-020117-043348
- Sugiura, S. H., Dong, F. M., Rathbone, C. K., & Hardy, R. W. (1998). Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds. *Aquaculture*, 159(3), 177-202. doi:[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00177-4)
- Sørensen, M., Berge, G. M., Magny, T., Ruyter, B., Halten, B., Ytrestøyl, T., Åsgård, T. & Aas, T. S. 2011. *Today's and tomorrow's feed ingredients in Norwegian aquaculture*. Tromsø: NOFIMA.
- Sørensen, M., Berge, G. M., Reitan, K. I. & Ruyter, B. 2016. Microalga *Phaeodactylum tricornutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) -Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*, 460, 116-123.

- Sørensen, M., Gong, Y., Bjarnason, F., Vasanth, G. K., Dahle, D., Huntley, M., & Kiron, V. (2017). *Nannochloropsis oceania-derived defatted meal as an alternative to fishmeal in Atlantic salmon feeds*. *PLOS ONE*, 12(7), e0179907. doi:10.1371/journal.pone.0179907
- Tacon, A. G., Hasan, M. R., & Metian, M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture technical paper*, (564), I.
- Tacon, A. G. J. & Metian, M. 2008. Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285, 146- 158.
- Talbot, C. & Rosenlund, G. 2002. Learning from the salmonid industry growing fish on nutrientdense diets. *Aquafeed International*, 5, 7-11.
- Teuling, E., Schrama, J. W., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2017). Effect of cell wall characteristics on algae nutrient digestibility in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and African catfish (*Clarus gariepinus*). *Aquaculture*, 479, 490-500. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.025
- Teuling, E., Wierenga, P. A., Agboola, J. O., Gruppen, H., & Schrama, J. W. (2019). *Cell wall disruption increases bioavailability of Nannochloropsis gaditana nutrients for juvenile Nile tilapia (Oreochromis niloticus)*. *Aquaculture*, 499, 269–282. doi:10.1016/j.aquaculture.2018.09.047
- Tibaldi, E., Chini Zittelli, G., Parisi, G., Bruno, M., Giorgi, G., Tulli, F., Venturini, S., Tredici, M. R. & Poli, B. M. 2015. Growth performance and quality traits of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed diets including increasing levels of freeze-dried Isochrysis sp. (T-ISO) biomass as a source of protein and n-3 long chain PUFA in partial substitution of fish derivatives. *Aquaculture*, 440, 60-68.
- Tibbetts, S. M. (2018). The Potential for ‘Next-Generation’, Microalgae-Based Feed Ingredients for Salmonid Aquaculture in Context of the Blue Revolution. *Microalgal Biotechnology*.
- Tibbetts, S. M., et al. (2017). "Apparent digestibility of nutrients, energy, essential amino acids and fatty acids of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets containing whole-cell or cell-ruptured *Chlorella vulgaris* meals at five dietary inclusion levels." *Aquaculture* 481: 25-39.

- Van Den Ingh, T. S. G. a. M., Olli, J. J. & Krogdahl, Å. 1996. Alcohol-soluble components in soybeans cause morphological changes in the distal intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Fish Diseases*, 19, 47-53.
- Verbeke, W., Vanhonacker, F., Sioen, I., Van Camp, J. & De Henauw, S. 2007. Perceived Importance of Sustainability and Ethics Related to Fish: A Consumer Behavior Perspective. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 36, 580-585.
- Wang, M., Cheng, H., Chen, S., Wen, S., Wu, X., Zhang, D., . . . Cong, W. (2018). Microalgal cell disruption via extrusion for the production of intracellular valuables. *Energy*, 142, 339-345. doi:<https://doi.org/10.1016/j.energy.2017.10.061>
- Winther, U., Ziegler, F., Hogner, E. S., Emanuelsson, A., Sund, V. & Ellingsen, H. 2009. *Carbon foot print and energy use of Norwegian sea food products*. Trondheim: SINTEF fisheries and aquaculture.
- Yaakob, Z., Ali, E., Zainal, A., Mohamad, M. & Takriff, M. S. 2014. An overview: biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *Journal of Biological Research*, 21, 2- 10.
- Ytrestøyl, T. Aas, T. S. T. Åsgård, (2015) Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway, *Aquaculture* 448, 365-374. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.023>
- Øverland, M., Kjos, N. P., Olsen, E., & Skrede, A. (2005). *Changes in fatty acid composition and improved sensory quality of backfat and meat of pigs fed bacterial protein meal*. *Meat Science*, 71(4), 719–729. doi:10.1016/j.meatsci.2005.05.017