



Fakultet for biologi, fiskeri og økonomi

## **Kiselalger som fôrkomponent i laksefôr.**

*Biokjemisk sammensetning og fettsyreprofil hos atlantisk laks (Salmo salar L.) fôret med ulike lipid- og proteinkilder*

Maria Heimland

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp) Mai 2020



## Forord

Denne masteroppgaven i fiskeri- og havbruksvitenskap markerer slutten på fem lærerike år ved Universitetet i Tromsø. Jeg setter stor pris på alle som har gjort tiden her uforglemmelig.

Først og fremst vil jeg rekke en stor takk til hovedveileder Karl-Erik Eilertsen. Takk til veileder Edel Oddny Elvevoll. Sammen har dere hjulpet meg i mål med et produkt som jeg kan si meg fornøyd med. I tillegg vil jeg rette en stor takk til Guro Kristine Edvinsen, som alltid har stilt opp ved ulike utfordringer på laben. Takk til Malene, for hennes statistiske ekspertise og lån av utstyr. Hjelpsomheten fra dere alle har vært uvurderlig.

Studietiden har gitt meg mange gode vennskap, som jeg tar med meg videre i livet. Spesielt vil jeg nevne Eli, Ida, Sofie og Trude, samt medstudentene mine på laboratoriet.

Takk for meg!

Maria Nilsen Heimland

*Maria Nilsen Heimland*

Tromsø, Mai, 2020



## Sammendrag

Det økende behovet for marine ressurser som ingrediens i fôr har ført til et søk etter nye ressurser, da dagens ressurser ikke lengre er bærekraftig. For å øke utbytte er det foreslått å rette søket lengre ned i næringskjeden. Marine kiselalger er et eksempel på slike organismer. Disse er ikke godt utnyttet i dag, hovedsakelig på grunn av manglende kunnskap rundt teknologi, samt forskning på hvilke arter som egner seg best. Hovedmålet med oppgaven var å undersøke den biokjemiske sammensetningen av laksefilet, fôret med kiselalgen *Porosira glacialis* (*P.glacialis*) som komponent i fôret. I tillegg ble effekten av kiselalger på vekst av laks studert. Analyser av den biokjemiske sammensetningen i fôrene brukt i forsøket er også inkludert i oppgaven, men verdiene er hentet fra andre kandidater med tilknytning til Norges fiskerihøgskole.

Atlantisk laks ble fôret med fire ulike fôr med tilsats av ulike komponenter: mikroalge (MA), fiskeolje (FA), calanusolje (CO) og rapsolje (RO). Oppgaven er en del av et større prosjekt med Nofima, og totalt ble det fôret 444 laks. I dette forsøket ble 36 av fiskene analysert. Laksen ble fôret over en periode på 62 dager, og økte i vekt fra  $135 \pm 3\text{g}$  til  $335 \pm 7\text{g}$ . Vekt og lengde ble målt 0, 30 og 62 dager etter oppstart, og visste ingen forskjeller mellom fiskegruppene. Kondisjonsfaktoren var også lik for MA, FO, CO og RO. Den spesifikke vekstraten (SGR) visste signifikante ulikheter, men ikke for MA, som hadde lik SGR med alle de andre fiskegruppene.

Resultatene fra de biokjemiske analysene viste få signifikante forskjeller mellom de fire fiskegruppene. Fettsyresammensetningen, derimot, viste at filet fra fiskene fôret med marine komponenter, derav MA, skilte seg ut med filet fra fisk fôret med vegetabilsk olje. Overordnet viser fettsyresammensetningen av filetene hvilken diett de har fått. Fiskegruppene med marine komponenter i fôret hadde høyere innhold av omega-3 fettsyrer, mens fiskegruppen med rapsolje som komponent i fôret hadde høyere innhold av omega-6 fettsyrene. Alle fiskegruppene inneholdt de essensielle aminosyrene for fisk og det ble ikke funnet forskjeller mellom gruppene. Dette viser at inkluderingen av *P. glacialis* i fôr gir tilfredsstillende mengder protein og fettsyrer. Fettsyresammensetningen av filetene til MA visste seg å være lik som ved inkludering av andre marine komponenter (FO og CO). Ingen uønskede effekter ble observert, laksen som fikk mikroalger i fôret hadde ingen dødelighet og vokste like raskt som de andre gruppene.



## Summary

The increasing need for marine resources as an ingredient in feed has led to a search for new resources, as today's resources are no longer sustainable. In order to increase the yield, it is proposed to make the search further down the food chain. Marine diatoms are good candidates. There are still some challenges in making the organism suitable for such purposes, mainly due to the lack of knowledge of fermenting technology. Research on which species are most suitable must also be undertaken. The main objective of this thesis was to investigate whether the diatom *Porosira glacialis* (*P.glacialis*) could be utilized. Analysis of the biochemical composition were performed, and the growth efficiency of the fish was examined. Analyzes of the biochemical composition of the feed used in the experiment, are also included, however the analyzes have been carried out by other candidates at The Norwegian College of Fishery Science.

This master thesis is part of a larger project where a total of 444 salmon were fed. For this experiment, 36 of the fish were analyzed. Atlantic salmon was fed four different feeds with addition of various components, microalgae (MA), fish oil (FO), calanus oil (CO) and rapeseed oil (RO). The salmon was fed over a period of 62 days, which made them increase in weight from  $135 \pm 3\text{g}$  to  $335 \pm 7\text{g}$ . Weight and length were measured 0, 30 and 62 days after start-up, and no differences between the fish groups were observed. The conditioning factor was also equal for MA, FO, CO and RO. The specific growth rate (SGR) showed significant differences, but not for MA, which shared the same SGR with all the other fish groups.

The results of the biochemical analyzes showed few significant differences between the four fish groups. The fatty acid composition showed that the fillets from the fish fed with marine components differed from the fillets fed with vegetable oil. The fatty acid composition in the salmon fillets represented what diet they had received during the feeding experiment. The fish groups with added marine components in the feed had higher content of omega-3 fatty acids, while the fish group with rapeseed oil as a component in the feed had higher content of omega-6 fatty acids. All the fish groups contained the essential amino acids needed in fish, and no differences were observed. It is shown that the inclusion of *P. glacialis* in feed provides satisfactory amounts of protein and fatty acids. The fatty acid composition of the fillets of MA was found to be similar to other marine components (FO and CO). No undesirable effects were observed, the salmon with microalgae in the feed had no mortality and grew as rapidly as the other groups.

## Forkortelser

AA	Aminosyrer
ALA	Alfalinolensyre
ARA	Arakidonsyre
CO	Calanusolje
DCM	Diklormetan
DHA	Dokosaheksaensyre
DPA	Dokosapentaensyre
EAA	Essensielle aminosyrer
EPA	Eikosapentaensyre
FA	Fettsyrer
FCR	Fôrfaktor
FO	Fiskeolje
HCl	Saltsyre
H <sub>2</sub> O	Vann
IS	Internstandard
LA	Linolsyre
MA	Mikroalge
MeOH	Metanol
MUFA	Enumettede fettsyrer
NaCl	Natriumklorid
N <sub>2</sub> -gass	Nitrogengass
n-3 LC PUFA	Langkjedete flerumettede omega-3 fettsyrer
n-3 PUFA	Flerumettede omega-3 fettsyrer
n-6 PUFA	Flerumettede omega-6 fettsyrer
PUFA	Flerumettede fettsyrer
RO	Rapsolje
SDA	Stearidonsyre
SFA	Mettede fettsyrer
TAG	Triacylglycerol
VO	Vegetabilske oljer



# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Formålet med oppgaven</i>	3
<b>2</b>	<b>Bakgrunn</b>	<b>4</b>
2.1	<i>Mikroalger</i>	4
2.2	<i>Porosira glacialis</i>	5
2.3	<i>Lipid- og fettsyresammensetning</i>	5
2.4	<i>Marine næringsmidler</i>	7
2.5	<i>Vekst og fôrproduksjon</i>	8
<b>3</b>	<b>Materialer og metode</b>	<b>10</b>
3.1	<i>Forsøksfisk, forsøksdesign og fôring</i>	10
3.2	<i>Forsøksfôrene</i>	12
3.3	<i>Prøveuttak</i>	12
3.4	<i>Vekst</i>	13
3.5	<i>Analysen for bestemmelse av biokjemisk sammensetning</i>	13
3.5.1	<i>Bestemmelse av vann- og askeinnhold</i>	13
3.5.2	<i>Fettekstraksjon</i>	14
3.5.3	<i>Bestemmelse av fettsyresammensetning</i>	14
3.5.4	<i>Aminosyreanalyse</i>	15
3.6	<i>Statistiske analyser</i>	16
<b>4</b>	<b>Resultater</b>	<b>17</b>
4.1	<i>Effektivitet – lengde og vekt</i>	17
4.2	<i>Biokjemisk sammensetning av laksefilet</i>	19
4.3	<i>Fettsyresammensetning i laksefilet</i>	20
4.4	<i>Aminosyresammensetning og proteininnhold</i>	23
<b>5</b>	<b>Diskusjon</b>	<b>25</b>
5.1	<i>Effektivitet - lengde og vekt</i>	26
5.2	<i>Biokjemisk sammensetning av laksefilet</i>	27
5.3	<i>Fettsyresammensetning i laksefilet</i>	28
5.4	<i>Aminosyresammensetning og proteininnhold</i>	29
<b>6</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Litteratur</b>	<b>32</b>

## Tabelliste

<b>Tabell 1:</b> Oversikt over verdier av vann, aske, fett og protein fra ulike studier .....	7
<b>Tabell 2:</b> Sammensetning av forsøksfôrene, utviklet av Nofima .....	12
<b>Tabell 3:</b> Oversikt over lengde og vekt .....	17
<b>Tabell 4:</b> Oversikt over kondisjonsfaktor .....	18
<b>Tabell 5:</b> Sammensetning av filet (% av våt vekt).....	19
<b>Tabell 6:</b> Sammensetning av fôr.....	19
<b>Tabell 7:</b> Fettsyresammensetning i % av totale fettsyrer .....	21
<b>Tabell 8:</b> Mengden fettsyre (g/100g).....	23
<b>Tabell 9:</b> Totale aminosyrer i filet .....	24

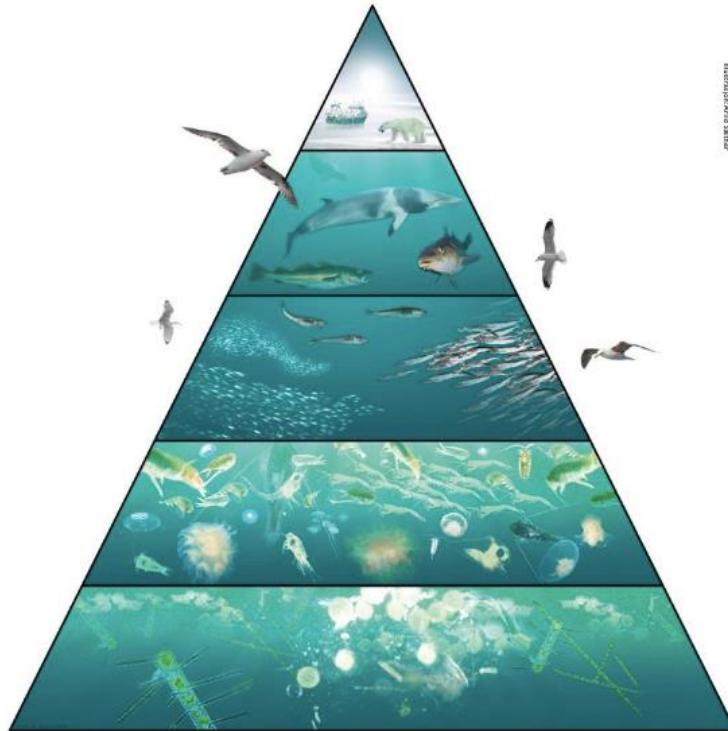
## Figurliste

<b>Figur 1:</b> Trofisk pyramide av den marine næringskjeden, illustrasjoner fra Barentshavet. ....	2
<b>Figur 2:</b> Omdannelsen av omega-6 og omega-3 fettsyrer .....	6
<b>Figur 3:</b> Ingredienser (% av fôret) i norsk laksefôr i perioden 1990-2016 .....	8
<b>Figur 4:</b> Oversikt over forsøksoppsettet. ....	10
<b>Figur 5:</b> Karoppsett, ved Havbruksstasjonen. ....	11
<b>Figur 6:</b> Oversikt over gjennomsnittlig spesifikk vekstrate .....	18
<b>Figur 7:</b> Sammenligning mellom n-6/n-3 ratioen.....	22

# 1 Innledning

Sjømat har et høyt innhold av høyverdige lett fordøyelige proteiner hvor alle de essensielle aminosyrene er tilstede (Wilson, 2003). I tillegg finnes det et høyt innhold av de flerumettede langkjedede marine omega-3 fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosapentaensyre (DHA). For å kunne mate verdens økende befolkning, med den samme sunne og helsefremmede sjømaten vi har i dag, er det et stort behov for at mer mat produseres fra havet. Parallelt med dette trenger også sjømaten vi konsumerer næringsrik føde. Akvakultur vokser raskere enn noen annen matproduksjon på verdensbasis, mens fiskeriene hvor de marine fettsyrene tidligere kommer fra ser ut til å ha nådd maksimal høstningskapasitet (FAO, 2018a). Et søk etter nye kilder til marine lipider har dermed vist seg nødvendig. Fôr til oppdrett av atlantisk laks er i stadig forandring, og kunnskap rundt ernæring er avgjørende. Det har i de siste årene blitt brukt en stadig høyere andel avlingsbaserte planteprodukter, og mindre fiskemel og fiskeoljer, i fôret. Dette har vært med på å påvirke næringsinnhold og sammensetning av oppdrettet fisk, spesielt fettinnhold og fettsyreprofilene (Aas et al., 2019). I tillegg har det ført til et ugunstig forhold mellom omega-6 og omega-3, noe som ser ut til å være uheldig for fisken (Torstensen et al., 2013), samt gitt et produkt med mindre gunstige helseeffekter for konsumenten.

Fiskemel og fiskeolje regnes fremdeles som de mest næringsrike og fordøyelige ingrediensene til fôr for oppdrettsfisk, men blant annet ressursmangel og pris, har ført til at de marine fôringrediensene fra fiskeriene må utnyttes mer effektivt. Svingninger i bestander og reduksjon i fangstkvoter er også med på å gjøre produksjonen av mel og olje fra fisk nokså varierende (Turchini et al., 2009; FAO, 2018a). En god kilde for å erstatte fiskemel og fiskeolje kan være mikroalger fra det laveste trofiske nivå (**Figur 1**). Plasseringen nederst i næringskjeden, gjør at mikroalger danner næringsgrunnlaget for stort sett alt liv ellers i havet. Mikroalgene er primærprodusenter, og utnytter sollys, nitrogenkilder, karbondioksid (CO<sub>2</sub>) og mineraler til å produsere organisk biomasse som kan utnyttes av arter lenger opp i næringskjeden. Rundt 10% av bioenergien overføres til neste nivå i næringskjeden, og derfor er det en økende interesse rundt utvikling av nye metoder for å utnytte organismer på lavest mulig trofiske nivå (Gladyshev et al., 2009; SAM, 2017). I tillegg har disse artene mindre akkumulerte kontaminanter (Sprague et al., 2015). Selv om markedspotensialet for kultivering av mikroalger er stort, viser studier at den faktiske produksjon er nokså begrenset (Spolaore, 2006; Perez-Garcia, 2011; Enzing, 2014; Sørensen, 2017), på grunn av høye produksjonskostnader. En reduksjon i produksjonskostnader er dermed nødvendig for å gjøre det konkurransedyktig.



**Figur 1:** Trofisk pyramide av den marine næringskjeden med illustrasjoner fra Barentshavet. Nederst er primærproduzentene, som er basisen for alle påfølgende trinn. Deretter er det sekundærproduzentene, etterfulgt av pelagisk og filtrerende organismer. Tredje trinn består av fiskespisende dyr, og øverst er toppredatorene. Illustrasjon av Arild Sæther (Havforskningsrapporten2015).

Siden 1960- tallet, da Japan startet industriskalaproduksjon av grønnalgen *Chlorella*, har det stort sett bare vært produksjon av grønn og blå-grønnalger, der det meste har gått til (omega-3) kosttilskudd (Spolaore et al., 2006; Mimouni et al., 2012; Enzing et al., 2014). I senere tid har imidlertid både nye arter og nye anvendelsesområder vokst fram. Tidligere studier har indikert at nordlige kiselalger eller kiselalger kan ha stort potensiale som omega-3-rik ingrediens til fôr i akvakulturnæringen (Artamonova et al., 2017). Leting etter de rette artene til potensiell kommersielt bruk er gjort i en rekke studier (Miller et al., 2007; Degerlund & Eilertsen, 2010; Indrayani, 2017; Ingebrigtsen et al., 2017), og *Porosira glacialis* (*P. glacialis*) med sin gode evne til å omdanne sollys til biomasse, er en kiselageart som kan være en god kandidat.

På grunn av kiselalgens effektive evne til lipidproduksjon, kan *P. glacialis* være en av artene som på sikt vil få høy kommersiell verdi som fôringrediens. Arten har sin opprinnelse fra kalde omgivelser med lite sollys, og har utviklet egenskapen til å utnytte tilstedeværelsen av lys effektivt. Selv om *P. glacialis* er en relativt godt undersøkt mikroalge (Villereal & Fryxell, 1983; Von Quillfeldt, 2000; Armand et al., 2005; Ingebrigtsen et al., 2016; Artamonova et al., 2017; Svenning et al., 2019), har arten ikke vært undersøkt som fôrkomponent.

## 1.1 Formålet med oppgaven

*I dette forsøket ble effekten av å fôre laks med kiselalge (*P. glacialis*) som en komponent i fôret, undersøkt.*

Målet med denne oppgaven var å sammenligne overlevelse, vekst og biokjemisk sammensetning av smålaks (*S. salar*) fôret med 13,8% biomasse av kiselalgen *Porosira glacialis*. Kiselalgen ble inkludert som ingrediens i et tradisjonelt fôr med 18,4% fiskeolje, og effekten ble sammenlignet med tre andre dietter. To av kontrollfôrene var marine; det ene med 21,3% fiskeolje og det andre med 18,9% fiskeolje og 2,3% calanusolje. Det siste var et vegetabilsk kontrollfôr tilsatt 9% fiskeolje og 12,3% rapsolje. Alle fôrene var justert for protein, lipid og energinivå. Fôringen av forsøksdiettene foregikk i 62 dager. Parameterne som ble undersøkt var vekst (start-, mellom- og sluttvekt), spesifikk veksthastighet (SGR), kondisjonsfaktor (KF), samt biokjemisk sammensetning og fettsyre-sammensetning av fiskefiletene. Fôringen av forsøksdiettene foregikk i 62 dager.

## 2 Bakgrunn

### 2.1 Mikroalger

Alger varierer i størrelse, helt fra mikrometer til titalls meter, hvor de små karakteriseres som mikroalger som er frittlevende organismer fra riket Protista (Enzing et al., 2014). Mikroalger har vist seg å være svært effektive fotosyntetiserende organismer med kapasitet til å doble biomassen sin på bare 3,5 timer (Spolaore et al., 2006; Chisti, 2007). Dette gjør mikroalgene til de fotoautotrofe organismene på jorden som vokser raskest. De har også evnen til å syntetisere flerumettede fettsyrer med 18 karboner eller mer (Kelly et al., 1959; Certik & Shimizu, 1999). Disse fettsyrene inkluderer de langkjedede marine flerumettede fettsyrene (LC-PUFA) eicosapentaensyre (20:5 n-3, EPA) og docosapentaensyre (22:6 n-3 DHA), som oftest knyttes til gunstige helseeffekter. For å få optimalisere utbytte av disse viktige fettsyrene vil inngående forståelse av algenes egenskaper være viktig, blant annet for å utvikle egnede vekstbetingelser (Chisti, 2007).

I det akvatiske økosystemet er det kiselalger som er de mest tallrike av alle mikroalger, både når det gjelder mangfold og biomasse (Trainer et al., 2008). Det estimeres at det finnes rundt 100 000 arter, men anslagsvis er det kun 12 000 av disse som er beskrevet (Norton et al., 1996; Mann & Vanormelingen, 2013). De vokser hovedsakelig som frittsvevende enkeltceller, men noen arter vokser også sammen i tråder av mindre kolonier (De Baar, 1994). De lever enten bentisk, pelagisk eller som epifytter på makroalger eller dyr (Round et al., 2007; Bowler et al., 2008; Trainer et al., 2008). Celleveggene til disse organismene består av silikaskall, oppbygd av to silikasjikt som overlapper hverandre (Reimann et al., 1965), som gir kiselalgene mekanisk styrke. Størrelsen på kiselalgene varierer fra 2  $\mu\text{m}$  til 2 mm, og de finnes i to ordner; Centrales med radial symmetri (rund, sylinderform) og Pennales med bilateral symmetri (oval, avlang). (Medlin et al., 1996). De er utbredt i polare strøk langs iskanten, områder med oppstrømming og i tempererte kystområder (Armbrust, 2009).

Arktiske områder har blitt studert for plankton i mer enn et århundre, og overraskende store kvantum kan blomstre opp i arktiske farvann (Heimdal, 1983). I 1841 ble det gjort en studie der det ble rapportert om kiselalger ved arktisk sjøis (Ehrenberg, 1853), og på slutten av 1800-tallet ble flere av dagens teknikker for dyrkning av mikroalger utviklet, mens massedyrking startet så smått på 1900-tallet (Preisig & Andersen, 2005). På 1950-tallet undersøkte man mulighetene til å benytte seg av alger som en alternativ proteinkilde for å møte den økende

etterspørselen etter mat (Burlew, 1953). Ulike mikroalger har et høyt innhold av proteiner, og nesten alle alger er i stand til å syntetisere alle aminosyrer. På den måten kan de berike mennesker og dyr med alle de essensielle aminosyrene (Guil-Guerrero et al., 2004). De fleste mikroalger er også en god kilde til EPA og DHA (Volkman & Brown, 2005).

Mikroalger er med andre ord nokså godt karakteriserte organismer, men det gjenstår fortsatt forskning rundt teknologien til å kultivere de fram på en bærekraftig og økonomisk måte (Se-Kwon Kim, 2015; Dineshbabu et al., 2019). Potensialet er likevel stort, og dersom man sammenligner produktivitet på arealbasis (utbytte) av lipider fra mikroalger og terrestriske planter, er den høyere i førstnevnte. Avhengig av lipidinnholdet kan mikroalger produsere mellom 58 700 (lavt oljeinnhold) og 136 900 l olje hektar<sup>-1</sup> per år (høyt oljeinnhold), sammenlignet med rapsolje (*Brassica napus* L.), som kan produsere 974 l olje hektar<sup>-1</sup> per år (Mata et al., 2010).

## 2.2 Porosira glacialis

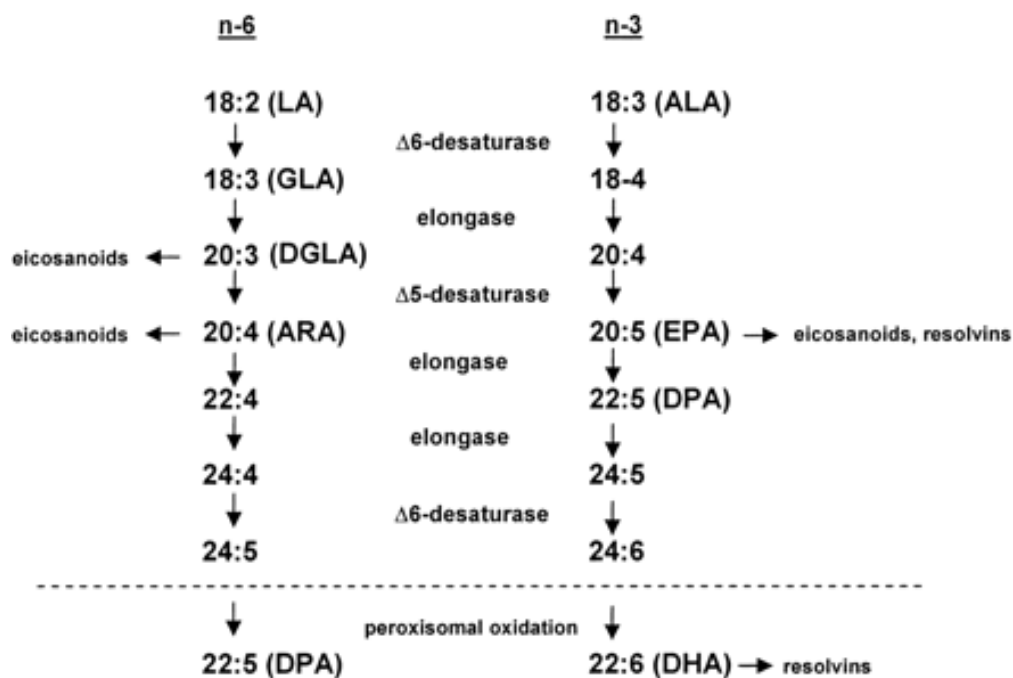
Porosira er en liten slekt i familien Thalassiosiraceae (Hasle 1973), og *P. glacialis* er en art innenfor denne slekten. *P. glacialis* har stor utbredelse, men finnes særlig i to separerte populasjoner i motsatte breddegradsregioner mot nord- og sør-polen (Hasle, 1973 og 1976). De trives i kjølige og arktiske vann, og hører til blant de nordlige kaldtvannskiselalgene (Artamonova et al., 2017). Arten er bygget opp av korte og sylindriske celler, og bundet sammen av «plantelime», som til sammen former små kolonier eller tråder av adskilte celler (Jørgensen, 1905).

## 2.3 Lipid- og fettsyresammensetning

Lipider er biologiske fett- og fettlignende stoffer, som kan løses i organiske oppløselige løsemidler eller væsker, men er tilnærmet uløselig i vann. Ofte brukes både betegnelsene fett eller olje om lipider (Olsen, 2017). Fettsyrer består av hydrokarbonkjeden – R, og karboksylgruppa – COOH. Til sammen danner dette alifatiske karboksylsyrer; R – COOH, som oftest inneholder mellom 12 og 22 karbonatomer. Fettsyrer forekommer som mettede fettsyrer (SFA) eller umettede fettsyrer. De mettede fettsyrene er uten dobbeltbindinger mellom karbonene i hydrokarbonkjeden. Mettede fettsyrer kan krystallisere sammen til en stabil struktur ved romtemperatur og dette gjør dem hensiktsmessig i matvarer (som margarin). Umettede fettsyrer har en til seks dobbeltbindinger i hydrokarbonkjeden som øker fleksibilitet og smeltepunkt.

Dette er viktig for membranlipider fordi det gir membraner større fluiditet slik at organismen kan ha fleksibilitet også ved lave temperaturer. De umettede fettsyrene deles inn i enumettede fettsyrer (MUFA) med en dobbeltbinding, og flerumettede fettsyrer (PUFA) med to eller flere dobbeltbindinger (Talbot, 2011; Olsen, 2017).

Fisk kan, som alle andre organismer, syntetisere de mettede fettsyrene 16:0 og 18:0 (Cook, 2002) til 18:1n-9, men mangler enzymene for å utføre en ytterligere konvertering til linolsyre (LA; 18:2n-6) og alfa-linolenisyre (ALA; 18:3n-3). Disse to fettsyrene regnes derfor som essensielle fettsyrer og må tilføres via kosten (Sargent et al., 2003), og de er utgangspunktet for syntese av langkjedete flerumettede fettsyrer (LC PUFA), som vist i **Figur 2**. Ved hjelp av enzymene elongase og desaturase kan LA omdannes til arakidonsyre (ARA; 20:4n-6), mens ALA kan omdannes via stearidonsyre (18:4n-3) til EPA og dokosapentaensyre (DPA; 22:5n-3). Ved peroksisomal oksidasjon kan disse eventuelt omsettes videre til henholdsvis eikosapentaensyre (EPA; 20:5n-6) og DHA. Fisk har i likhet med andre animalia, begrenset kapasitet til disse synteseveiene og får vanligvis tilført disse fettsyrene gjennom fôr eller gjennom næringskjeden. Fisken har en god evne til å lagre disse fettsyrene (n-3 LC PUFA), og enkelte fiskeslag lagrer relativt store mengder n-3 LC PUFA i muskelvev. Derfor er sjømat en god kilde til disse fettsyrene for oss mennesker. Det er de samme enzymene som omdanner LA og ALA, noe som betyr at det er den relative mengde fettsyrer fra kosten som bestemmer hva som blir valgt som substrat for enzymene og dermed hvilken syntesevei som dominerer (Olsen, 2017).



**Figur 2:** Omdannelsen av omega-6 og omega-3 fettsyrer (Arterburn et al., 2006).



## 2.4 Marine næringsmidler

Atlantisk laks er den laksefisken som har hatt høyest vekst innen oppdrett, men behovene for ulike næringsstoffer og betydning av disse er likevel ennå ikke kartlagt fullstendig. Overordnet er næringsstoffene laksen krever protein, essensielle aminosyrer, essensielle fettsyrer, vitaminer, mineraler og spormetaller for normal vekst, immunforsvar, reproduksjon og metabolisme (Espe et al., 2019). Det er ikke proteinet i seg selv laksen har behov for, men de essensielle aminosyrene proteinet inneholder; arginin, fenylalanin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, metionin, treonin, tryptofan og valin (NRC, 1993). Fiskemuskel har et lavt innhold av karbohydrater, men er rik på fett og proteiner. Fiskemuskelen er derfor en utmerket kilde til essensielle aminosyrer, og er en god næringskilde til lett fordøyelige protein (Venugopal, 1996). Fisken lever i et miljø der kravet til mekanisk støtte, i form av bindevevsproteinene kollagen ikke er like stort som for landdyr. Teksturen blir på grunn av dette mørere enn animalsk kjøtt, og gjør at fordøyeligheten av fiskekjøtt er bedre (Hultin, 1985). Proteinbehovet synker ettersom fisken vokser, og i tillegg har det vært vist at overskuddet av proteiner går til energibruk (Bureau et al., 2003; Wilson, 2003).

Laksefisk og de fleste andre marine arter bruker protein og lipider som deres hovedkilde til energi og vekst (Halver & Hardy, 2003). Fisk klassifiseres som fet eller mager etter andel av fett i muskel, og oppdrettslaks regnes som en fet fisk. Det totale fettinnholdet i filet hos små laks er likevel lavt (Bell et al., 1998). De individuelle fettsyrene (FA) er vanskelig å fastsette en grense på, da mange og komplekse faktorer påvirker fiskens evne til å syntetisere de ulikt. Art, sesong, temperatur og livsstadier vil også spille inn på slike behov (Lall, 2003).

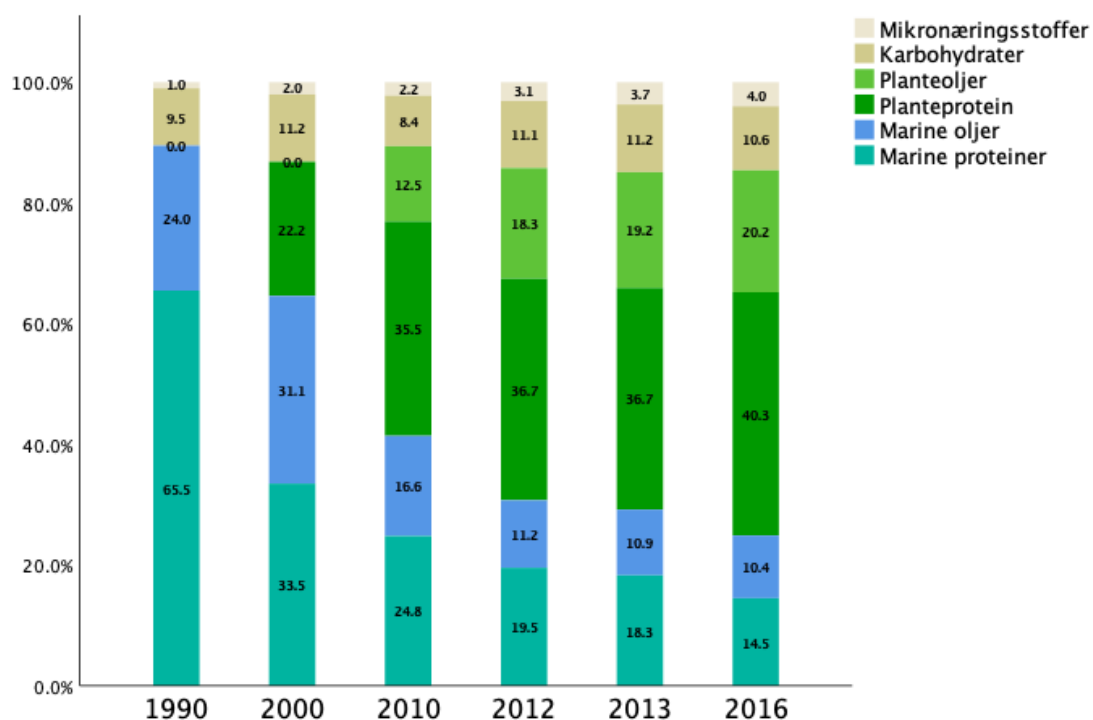
Den biokjemiske sammensetningen varierer betydelig fra en fiskeart til en annen og er i tillegg påvirket av kjønn, alder, miljø og sesong (Yeannes & Almandos, 2003). **Tabell 1** viser variasjonene for forventet innhold av vann, aske, fett og protein i filet fra atlantisk laks, samt i fôr beregnet for den.

*Tabell 1: Oversikt over verdier av vann, aske, fett og protein fra forskjellige utførte studier. Verdiene er gitt i prosent av våt vekt, og studiene er gjort på filet fra atlantisk laks (*Salmo salar*) (Haard, 1992; Waagbø et al., 1993; Lall, 2003; Jensen et al., 2012; Kiron et al., 2012). Verdiene for fôrene er gitt i prosent av tørrvekt, og analysene i studiene er gjort på fôr for atlantisk laks (Mente et al., 2003; Karalazos et al., 2007; Norambuena et al., 2015; Ytrestøyl et al., 2015).*

Bestanddeler	Filet (% av våt vekt)	Fôr (% av tørr vekt)
Vann	64 – 76	4 – 10
Aske	1 – 2	5 – 10
Fett	4 – 12	18 – 36
Protein	15 – 20	25 – 52

## 2.5 Vekst og fôrproduksjon

Å finne riktig fôrsammensetningen er en komplisert prosess. De rette ingrediensene skal velges ut, samt at de øvre og nedre grensene for de ulike komponentene skal fastsettes. I tillegg skal alle prosedyrene samspille for å kunne utvikle en miks som er næringsrik, rimelig, lett å frakte, lagre og bruke, samt mulig å ekstrudere til pellets (Hardy & Barrows, 2003). Veksten til atlantisk laks er påvirket av miljømessige faktorer, som temperatur, lys, vannkvalitet, hierarki, genetikk og fôr (FAO, 2018a). På 1920 og 1930- tallet ble ørret og laks fôret med det som da var tilgjengelig av ingredienser. Den første rapporten som beskrev vellykket bruk av tørrfôr ble publisert i 1956, og dette var basert på flere tiår med arbeid (Hardy & Barrows, 2003). Etter år 2000 har etterspørselen av marine oljer til fôr økt betydelig både på grunn av en økende global satsing på fiskeoppdrett og stagnasjon i verdens fiskerier (fra 80-tallet). Dette har ført til redusert tilgjengelighet og økte priser på fiskeoljer, og disse har i stor grad blitt erstattet av vegetabiliske oljer (VO) (**Figur 3**) fordi prisen er blitt mer gunstig og tilgjengeligheten større. I 2016 utgjorde raps- og canolaolje de største kildene til VO og disse sto for 19,8% av komponentene i norsk laksefôr. De marine ingrediensene har blitt redusert fra 90% i 1990 til omtrent 30% i 2016 (Ytrestøyl et al., 2015).



**Figur 3:** Ingredienser (% av fôret) i norsk laksefôr i perioden 1990-2016 (Ytrestøyl et al., 2015; Aas et al., 2019).

I 2019 bestod de marine ingrediensene av 14,5% marine proteiner, og 10,4% marine oljer (Aas et al., 2019).

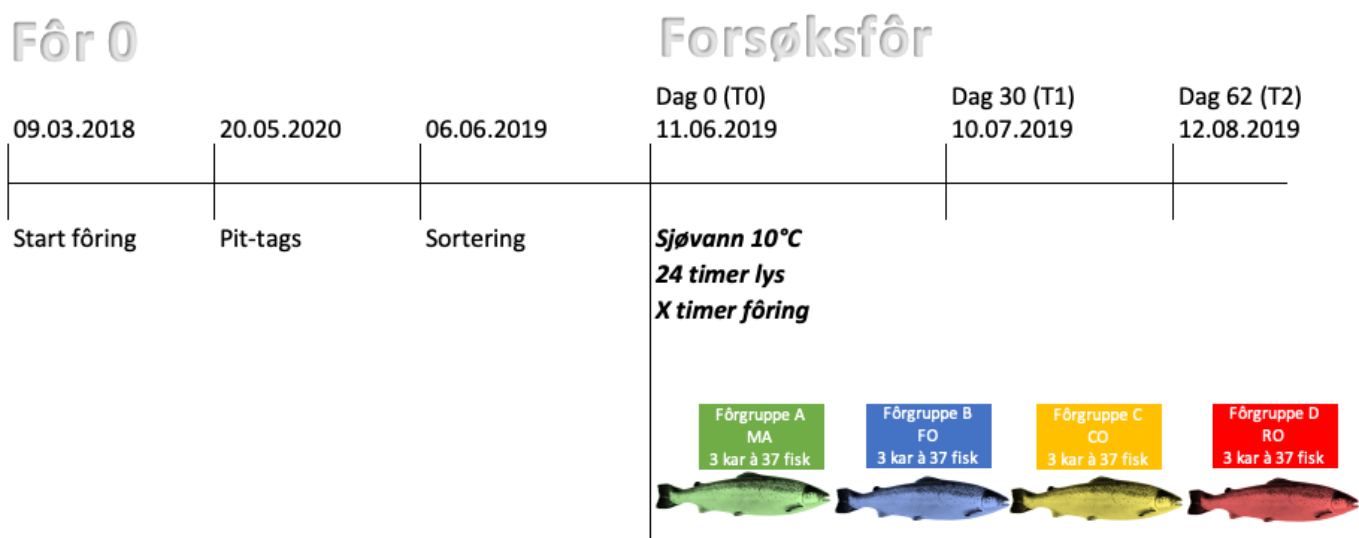
De ulike stadiene fisken gjennomgår har alle ulike forutsetninger. Det er et krav at dietten er fordøyelig og har evne til å absorberes, for å fungere som drivstoff i organismen. Det som ikke tas opp, sees på som energitap i form av ufordøyd mat og feces (Bureau et al., 2003). Vekstraten er høyere gjennom de tidlige livsstadier, og det er viktig at fiskens potensiale blir utnyttet maksimalt med et fôr som er rikt på protein og vitaminer. Proteinbehovet synker ettersom fisken vokser (Wilson, 2003), og den går etterhvert over på vekstfôr, som består av mer energi for å gi effektiv og økonomisk vekst, for fisk fra fingerlingstadiet (10-100g) til markedsstørrelse. En rekke tabeller med anbefalinger er utarbeidet basert på størrelse, forventet fôromdannelse og temperatur (Austreng et al., 1987). Spesifikk vekstrate (SGR) og kondisjonsfaktor (KF) blir ofte brukt som mål på vekst og fôrutnyttelse. Dette gir oppdretterne retningslinjer for hvor mye fisken normalt spiser (Lovell, 2003). Det er viktig å finne den optimale sammensetningen av ingrediensene i fiskefôr for å sikre god vekst, utvikling og helse. Optimale forhold mellom omega-6 og omega-3 og grenser for mengden mettede fettsyrer, er eksempler på faktorer som er vesentlige for at fiskevelferden opprettholdes (Torstensen et al., 2013). I tillegg vil lipidinnhold og fettsyresammensetning i laks være viktig for både smak og næringskvaliteten av produktet (Stickney & Hardy, 1989).

## 3 Materialer og metode

### 3.1 Forsøksfisk, forsøksdesign og fôring

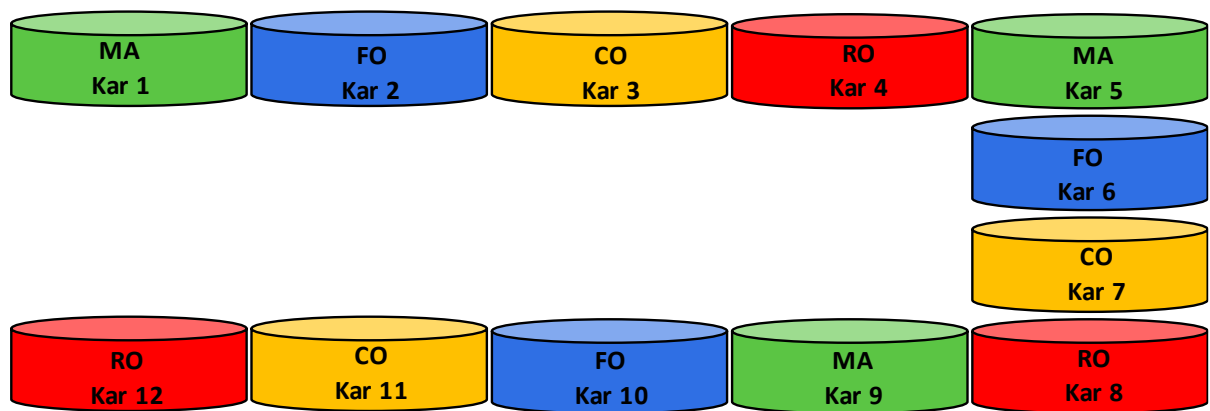
Fôringsforsøket ble utført ved Havbruksstasjonen i Kårvika, Tromsø. Forsøket er godkjent av Mattilsynet (prosjektnummer 18001) og gjennomført i henhold til EU og Norge sine lovverk for dyreforsøk. Fisken som ble benyttet i fôringsforsøket var atlantisk laks (*Salmo salar* L.) fra AquaGen AS. Fisken var ikke vaksinert, men individ merket, pit-taget. Ved oppstart i ferskvann var det totalt 450 friske fisk, som ble fordelt i 12 kar den 06.06.2019 og tilsatt brakkvann (15‰ salinitet). Det døde totalt tre fisk etter sorteringen (overgang til brakkvann og smoltifisering) en i hver av karene merket 4, 6 og 11. Disse ble erstattet med to reservefisk i kar 6 og 11, men ikke kar 4 som tilhørte kontrollgruppen.

Fiskene startet på forsøksfôrene i juni, og **Figur 4** viser en oversikt over forsøksoppsettet for fiskene med ulike komponenter i fôret; mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO). Før den tid ble alle fiskene fôret med det samme fôret (fôr 0).



**Figur 4:** Oversikt over forsøksoppsettet. Fra 09.03.2018 ble all fisk fôret med det samme fôret (fôr 0). Ved sortering ble 444 fisk fordelt i 12 kar, 3 kar per fiskegruppe. Fôringsforsøket startet 11.06.2019, og fiskene startet på 4 forskjellige fôr tilsatt henholdsvis mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (C) og rapsolje (RO). Fiskene ble målt og veid ved oppstart (T0), etter 30 dager (T1) og ved avslutningen av forsøket etter 62 dager (T2).

Etter overgang til fullt sjøvann (SWT) den 11.06.2019, ble fiskene gjennom selve fôringsforsøket holdt i sjøvann ved 10°C og et lysregime på 24 timer kontinuerlig lys. Vannsirkulasjon ble justert etter behov, for å holde O<sub>2</sub>-metningen i karene over 80% under hele forsøksperioden. Hvert kar var 500 liter og inneholdt 37 fisk hver, oversikt over karoppsett er vist i **Figur 5**. Fisken ble fôret til metthet (basert på Skrettings fôringskalkulator), med et intervall på 15 minutter i timen. En pause i fôringen ble satt mellom kl. 08.15 og 14.00, da det under dette tidsrommet er mye aktivitet og arbeidere på stasjonen. All fisk hadde de samme betingelsene, foruten om fôret. Fôrspill ble ikke samlet opp, bare fjernet.



**Figur 5:** Karoppsett til de 4 fiskegruppene (MA, FO, CO, RO), ved Havbruksstasjonen. Totalt 12 kar ble inkludert i fôringsforsøket.

## 3.2 Forsøksfôrene

Alle fire fôrene, med pelletstørrelse på 3mm, ble produsert hos fôrteknologisenteret ved Nofima, Bergen. Ingrediensene til diett FO (med nordatlantisk fiskeolje) og kontrollfôr RO var tilgjengelig på lager, mens til de andre to diettene ble det tilsendt 20 – 25 kg alger (tilsvarende ca. 3 kg tørrstoff) fra Finnfjord AS og 3 liter calanusolje fra Calanus AS. Alle fôrene hadde den samme grunnsammensetningen, og som vist i **Tabell 2** er forskjellene kun olje- og algetilsetningene.

*Tabell 2: Sammensetning av forsøksfôrene som ble utviklet av Nofima til bruk i fôrforøk. Fôrene var tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO). Verdiene er gitt som % av fôret.*

	MA	FO	CO	RO
Fiskemel	21,55	25	25	25
SPC	16,81	19,5	19,5	19,5
Hvetegluten	14,66	17	17	17
Hvete	8,97	10,4	10,4	10,4
Soya lecithin	0,43	0,5	0,5	0,5
Kolinklorid	0,43	0,5	0,5	0,5
Vitaminpremix	1,72	2	2	2
Monosodiumfosfat (26% P)	2,16	2,5	2,5	2,5
Carop. Pink (10% Astax)	0,04	0,05	0,05	0,05
L-Lysin	0,52	0,6	0,6	0,6
DL-Metionin	0,09	0,1	0,1	0,1
Mineral premix	0,43	0,5	0,5	0,5
Vitamin C (35%)	0,04	0,05	0,05	0,05
Fiskeolje	<b>18,4</b>	<b>21,3</b>	<b>18,9</b>	<b>9</b>
Rapsolje	-	-	-	<b>12,3</b>
Calanusolje	-	-	<b>2,4</b>	-
Algebiomasse	<b>13,8</b>	-	-	-

## 3.3 Prøveuttak

Ved avslutning av forsøket ble tilfeldige fisk håvet opp av karet og overført til en bøtte som inneholdt en overdose Benzokain (0,2ml/l vann; ACD Pharmaceuticals AS, Norge). Høyre og venstre side ble filetert og skinnert manuelt, og prøver ble tatt fra hjerte, lever og hodenyre. Eventuelle merknader ble journalført. Filetene ble individmerket og umiddelbart lagt på is, transportert til Norges fiskerihøgskole og fryselagret ved – 70°C. Senere ble filetene tint i vannbad, homogenisert (Bosch ProPower MFW68660, Tyskland) og fordelt til ulike analyser og plassert tilbake i fryser i påvente av videre arbeid.

### 3.4 Vekst

Måling av lengde og vekt ble gjennomført ved start (Dag 0, T0), og etter første (Dag 30, T1) og andre uttak (Dag 62, T2), henholdsvis 11.06.19, 10.07.19 og 12.08.19. Fisken ble sultet i to dager i forkant av hvert prøveuttak.

Kondisjonsfaktor ble regnet ut ved hjelp av ligningen:

$$\text{Kondisjonsfaktor (KF)} = \frac{V}{L^3} \times 100$$

V = vekt (g), L = gaffellengde (cm)

For den spesifikke vekstraten (SGR, specific growth rate) er SGR uttrykt som % kroppsvekt dag<sup>-1</sup> og ble beregnet for individuelle fisk.

Den spesifikke vekstraten ble beregnet ved hjelp av følgende ligning (Brett & Groves, 1979):

$$SGR = \left[ \frac{(\ln VT_2 - \ln VT_0)}{(T_2 - T_0)} \right] \times 100$$

der VT og VT = vekt (g) ved tid T0 (start av fôringsforsøket) og T2 (avslutning av forsøket).  
T2-T0 = antall dager mellom veiingene.

## 3.5 Analyser for bestemmelse av biokjemisk sammensetning

### 3.5.1 Bestemmelse av vann- og askeinnhold

Vanninnholdet i prøvene ble bestemt ved metoden AOAC 950.46b (Horwitz, 2004). Ettersom tilgjengelig prøvemateriale var begrenset, ble det kun gjort to replikater av 2,5 gram. Prøvene ble veid ut i aluminiumsbeger og plassert ved 105°C i varmeskap (Termaks – Labolytics AS, Trondheim, Norge). For å sikre at vekten var stabil, ble prøvene veid etter 24, 48 og 72 timer. Den stabile vekten ble brukt til å beregne vanninnholdet i prosent ved følgende formel:

$$\frac{\text{Vekt før tørking (g)} - \text{Vekt etter tørking (g)}}{\text{Vekt før tørking (g)}} \times 100\%$$

Askeinnholdet i de samme tørkede prøvene ble bestemt i henhold til AOAC 938.08 (Horwitz, 2004). I ca. 16 timer ved 540°C (inkludert fire timer oppvarming) ble tørkede prøver fullstendig forbrent til aske i en forbrenningsovn (Nabertherm GmbH. Program Controller

S27, Lilienthal, Tyskland), før de ble tatt ut og veid på nytt. Askeinnholdet ble beregnet prosentvis med formelen:

$$\frac{\text{Vekt før tørking og forbrenning (g)} - \text{Vekt etter tørking og forbrenning (g)}}{\text{Vekt før tørking og forbrenning}} \times 100\%$$

### 3.5.2 Fettekstraksjon

Fettekstraksjonen ble gjennomført med en modifisert versjon av Folchs metode (Folch et al, 1957). Tre replikater av 1 gram fra hver filet ble veid ut i teflonrør, og hver prøve ble tilsatt 19 mL diklormetan: metanol (DCM:MeOH) (2:1) (DCM: Honeywell, Muskegon, USA og MeOH: Fisher Scientific AS, Loughborough, England). Deretter ble det tilsatt 500 µl internstandard (IS), C17:0 heptadekansyre (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), som var løst ut til en konsentrasjon på 10 mg/ml i DCM:MeOH (2:1). Teflonrørene ble deretter ristet i 30 minutter i en ristemaskin (Multi Reax Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Tyskland), før de ble filtrert i foldefilter (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) over i nye teflonrør og tilsatt 4 ml 0,9% natriumklorid (NaCl) (VWR chemicals international, Conshohocken, USA) og blandet ved bruk av en vortex (VWR 1718, VWR International, Tyskland).

Prøvene ble deretter sentrifugert (Heraus Multifuge 1S-R, Thermo Fisher Scientific, Osterode, Tyskland) i 10 minutter ved 2000 g og den øverste, polare fase ble pipettert ut, mens den upolare fasen ble overført til forhåndsveide rundkolber og dampet tørre i en rotavapor (IKA RV10 Control, IKA-Werke GmbH & CO., KG, Staufen, Tyskland) ved 100 millibars trykk. Til sist ble rundkolbene veid slik at prøvenes fettinnhold kunne beregnes ved hjelp av følgende formel:

$$\% \text{ Fett} = \frac{\text{Rundkolbe med innhold (g)} - \text{Rundkolbe tom (g)}}{\text{Råstoff vekt (g)}} \times 100\%$$

### 3.5.3 Bestemmelse av fettsyresammensetning

#### 3.5.3.1 Metylering - opparbeiding av fettsyremetylestere

Fettsyresammensetningen ble bestemt med metylering og gasskromatografi (Stoffel et al., 1959). Lipidprøvene ble løst til 10 mg/ml i DCM:MeOH (2:1), før tre paralleller av 100 µl



prøve ble overført til Kimax-rør. Parallellene ble tilsatt 0,9 mL DCM og 2 ml 2% svovelsyre (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland) i metanol og satt i en varmeblokk på ca. 100°C i én time. Deretter ble 3,5 mL heptan (Honeywell, Muskegon, USA) og 3,5 mL 5% NaCl tilsatt prøvene, og blandet godt med vortex (VWR international, Conshocken, PA, USA). Dette ga to adskilte faser, og den øverste organiske fasen bestående av heptan og lipider ble pipettert over i små glassrør og dampet tørr med N<sub>2</sub>- gass. Til slutt ble prøvene løst i 100 µl heptan og overført til analyserør for gaskromatografi.

### 3.5.3.2 Gaskromatografisk separasjon av fettsyremetylestere

Fettsyresammensetningen ble analysert ved å benytte en Agilent 6890N (USA) gaskromatograf utstyrt med en 7683B autoinjektor og flammeionisasjonsdetektor (FID). Helium ble benyttet som bæregass, og som følge av ulik vandrethastighet gjennom en Varian CP7419 kapillærkolonne (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; 50 m x 250 µm x 0,25 µm nominal), ble de ulike fettsyrene separert. Det ble benyttet en forhåndsprogrammert metode (H14NY), optimalisert for best mulig separasjon av fettsyrene. Injektoren vil nå en temperatur på 240°C, og detektoren en temperatur på 250°C.

Fettsyrene ble identifisert ut fra de spesifikke retensjonstidene, som ble sammenlignet mot de kjente standardene PUFA 1, PUFA 2 og PUFA 3 (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA). Andelen enkelte fettsyrer (FA) ble bestemt som arealprosent og mengde fettsyre per 100 g prøve. Sistnevnte ble beregnet ut fra internstandard (IS) tilsatt i fett ekstraksjonen ved hjelp av følgende formel:

$$\text{Mengde fettsyre (g) pr. 100 gram prøve: } \frac{\text{Arealtopp FA}}{\text{Arealtopp IS}} \times \frac{\text{Tilsatt IS (g)}}{\text{Innveid prøve}} \times 100 \text{ g}$$

### 3.5.4 Aminosyreanalyse

Total aminosyre ble analysert med syrehydrolyse og væskechromatografi i metode beskrevet av Mæhre et al. (2018). To replikater av 200 mg laksemuskel ble tilsatt 0,2 ml milli-q H<sub>2</sub>O, 0,5 ml internstandard 20 mM Norleucin (Sigma Aldrich, St. Luis, USA) og 1,2 ml konsentrert saltsyre (HCl, 37%) (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Tyskland, Saltsyre 37%) ble tilsatt for å hydrolysere proteinene til de enkelte aminosyrene. Prøvene ble flushet med N<sub>2</sub>-gass i 10-15 sekunder, for å hindre oksidasjon, og deretter satt til hydrolyse i varmeskap på 110°C. Etter 22-

24 timer ble prøvene tatt ut og avkjølt, før de ble sentrifugert, og 100µl prøve ble tilsatt analyserør. Innholdet i analyserørene ble dampet tørr med N<sub>2</sub>-gass, og løst ut i 1 ml loading buffer (Lithium citratbuffer med pH 2,2, Biochrom Co. Cambridge, UK).

For analyse av materialet ble det brukt en Biochrom 30 aminosyreanalysator med en litiumcitrat-ekvilibrert kolonne og postkolonne-derivatisering med ninhydrin. Absorbansen ved 440 nm og 570 nm ble detektert og signalene fra de derivatiserte aminosyrene ble analysert med Chromeleon Software (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Identifiseringen av aminosyrene ble gjort ved å sammenligne mot en fysiologisk aminosyrestandard (A9906; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). De enkelte aminosyrene ble kvantifisert basert på forholdet til internstandarder Norleucin.

### **3.6 Statistiske analyser**

Alle dataene er basert på et tilfeldig utvalg fra hver eksperimentell gruppe på 9 fisk (3 fisk valgt fra 37 fisk per kar, og hvert fôr ble gitt til 3 forskjellige kar).

De statistiske analysene ble gjennomført ved bruk av Sigmaplot for Windows, versjon 14.0 (Systat Software). Shapiro-Wilks test ble brukt for å evaluere om data var normalfordelt, etterfulgt av en Brown-Forsyth test for å sjekke for varians. Resultatene ble vurdert som statistisk signifikante ved  $P < 0,05$ .

Alle resultatene ble analysert ved bruk av en enveis ANOVA, med unntak av lengde og vekt over tre ulike tidspunkt, som ble analysert ved bruk av en toveis ANOVA. Målet var å se om det var forskjeller mellom fiskegruppene. Ved signifikante forskjeller etter ANOVA ble Sidak post hoc analyse inkludert for å undersøke eventuelle forskjeller mellom fôringsgruppene. Dersom kravene for ANOVA ikke ble møtt, ble alle tallene i de aktuelle gruppene normalisert ved eksponensiell, kvadratrot, logaritme eller resiprok transformasjon. For å identifisere «outliers», dvs. data som ligger langt utenfor resten av dataene, ble alle data kjørt gjennom en Grubbs-test. Dersom en «outlier» ble observert, ble påvirkningsgraden gransket ytterligere ved å sammenligne regresjonslinja med og uten denne verdien.

Tabeller og figurer er bearbeidet ved hjelp av Microsoft Excel for Mac, versjon 15,32 og IBM SPSS Statistics, versjon 26. Resultatene er oppgitt med gjennomsnitt +/- standardfeil (standard error of the mean; SEM) hvis ikke annet er angitt.

## 4 Resultater

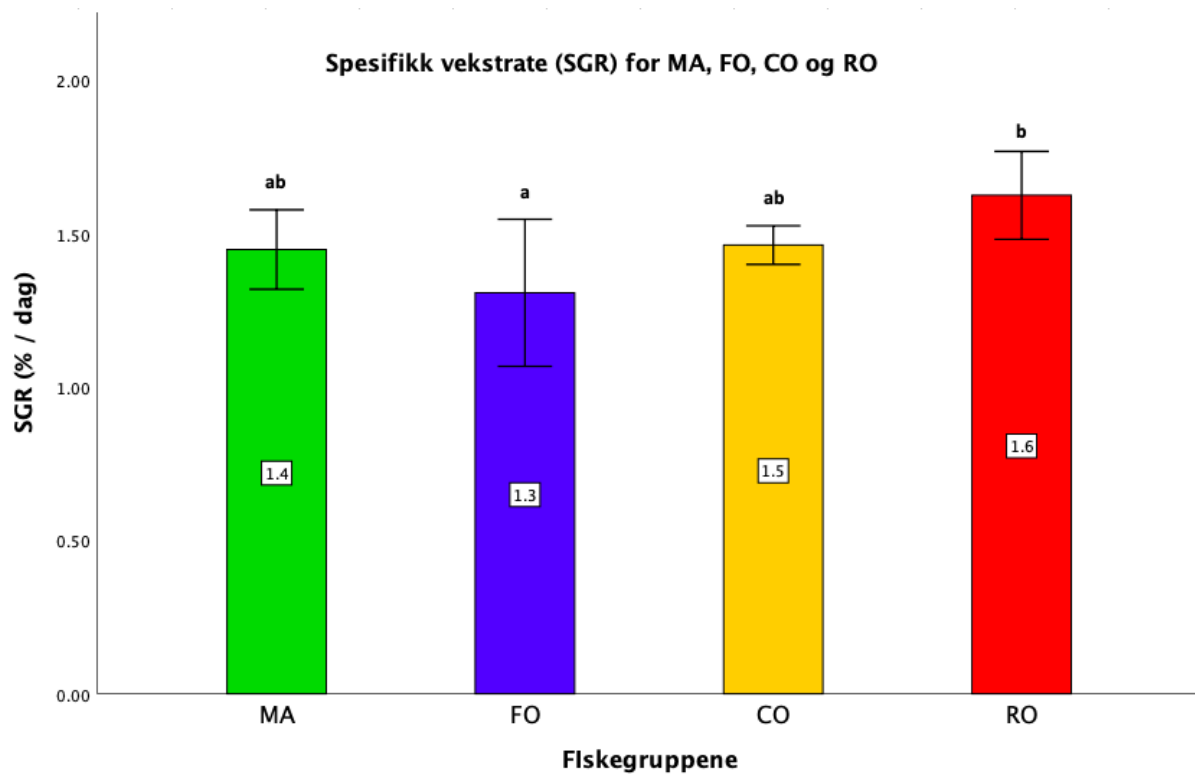
### 4.1 Effektivitet – lengde og vekt

Fiskene hadde generelt god helse og vekst i hele forsøksperioden; ingen fisk døde under fôringsforsøket og vekten ble tredoblet for alle fire grupper. Oversikt over lengde og vekt (minimums-, maksimums- og gjennomsnittsverdier) fra uttak T0 (dag 0), T1 (dag 30) og T2 (dag 62) av 36 laks fôret med 4 ulike dietter (MA, FO, CO, RO) er presentert i **Tabell 3**. Det var ingen signifikante forskjeller for lengde eller vekt for noen av gruppene ved oppstart (T0), underveis (T1) eller ved avslutningen (T2) av forsøket.

**Tabell 3:** Oversikt over lengde og vekt (minimal, maksimal og gjennomsnittlig lengde, cm, og vekt, g, av laksene i de 4 fiskegruppene (n=9). Laksene var fôret angitt antall dager med fôr tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO). Uttakene ble gjort ved oppstart T0, etter 30 dager (T1) og avsluttet etter 62 dager (T2).

		T0 (Dag 0)		T1 (Dag 30)		T2 (Dag 62)	
		Lengde (cm)	Vekt (g)	Lengde (cm)	Vekt (g)	Lengde (cm)	Vekt (g)
<b>MA</b>	Min	21	110,3	23,5	117	28	280,5
	Maks	24,4	167	26,8	222	30,4	362
	Gj. Snitt	22,6 ± 0,3	134,6 ± 5,3	25,6 ± 0,3	190,2 ± 11,3	29,6 ± 0,3	329 ± 10,2
<b>FO</b>	Min	21	106,3	23,6	164,5	27,5	214
	Maks	24,5	173	27,4	238	31,5	367,5
	Gj. Snitt	22,8 ± 0,4	140,1 ± 7,0	25,4 ± 0,4	196,8 ± 9,6	29,5 ± 0,4	316,3 ± 18,1
<b>CO</b>	Min	20,7	108	22,9	133,5	27,3	250
	Maks	23,3	155,1	26,4	239,5	31	401,5
	Gj. Snitt	22,6 ± 0,3	135,4 ± 5,1	25,2 ± 0,4	197,0 ± 12,2	29,6 ± 0,4	337,2 ± 16,7
<b>RO</b>	Min	21,2	105	24,5	123,5	29,5	320
	Maks	24,4	162,7	27,5	246,5	31,5	394,5
	Gj. Snitt	22,4 ± 0,3	130,7 ± 5,8	25,8 ± 0,3	198,6 ± 12,6	30,3 ± 0,2	356,1 ± 8,2

Spesifikk vekstrate (SGR) for de fire fiskegruppene (MA, FO, CO og RO) er presentert i **Figur 6**. SGR var høyere ( $P < 0,01$ ) etter fôring med fôr RO ( $1,6 \pm 0,1$ ) sammenlignet med fôr FO ( $1,3 \pm 0,2$ ), mens fiskene fra fôr MA ( $1,4 \pm 0,1$ ) og CO ( $1,5 \pm 0,0$ ) lå imellom uten at det var signifikante forskjeller fra de andre gruppene for disse.



**Figur 6:** Oversikt over gjennomsnittlig spesifikk vekstrate (SGR) for de fire fiskegruppene (MA, FO, CO og RO), fôret i 62 dager. Fôrene var tilsatt henholdsvis mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO). Uttak ved oppstart T0, etter 30 dager (T1) og avsluttet etter 62 dager (T2). Forskjellig bokstav viser signifikante forskjeller ( $P=0,05$ ) mellom fiskegruppene

Kondisjonsfaktor (KF) ved de tre uttakene (T0, T1 og T2) er presentert i **Tabell 4**. Det var ingen statistiske forskjeller i KF mellom gruppene på hvert av de tre tidspunktene, men som forventet var det en økning mellom de tre tidspunktene for samtlige fiskegrupper.

**Tabell 4:** Oversikt over kondisjonsfaktor (KF) fra uttak T0, T1 og T2 for de fire fiskegruppene (MA, FO, CO og RO). Fôrene var tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO). Uttak ved oppstart T0, etter 30 dager (T1) og avsluttet etter 62 dager (T2).

	KF (Dag 0)	KF (Dag 30)	KF (Dag 62)
MA (n = 9)	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,0
FO (n = 9)	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1
CO (n = 9)	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0
RO (n = 9)	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,0

## 4.2 Biokjemisk sammensetning av laksefilet

Biokjemisk sammensetning (vann, aske, fett og protein) i filetene samt de formulerte fôrene (MA, FO, CO og RO), er presentert i henholdsvis **Tabell 5** og **Tabell 6**. Den biokjemiske sammensetningen av filetene var generelt svært lik uavhengig av hvilket fôr som ble gitt, og det ble ikke observert noen signifikante forskjeller for innhold av vann, aske, fett og protein.

**Tabell 5:** *Sammensetning av filet (% av våt vekt) av vann, aske, fett og protein for fiskegruppene ved uttak etter 62 dager. Fôrene var tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO).*

Filet	g/100g			
	Vann	Aske	Fett	Protein
MA (n = 9)	75,7 ± 0,5	1,2 ± 0,0	3,8 ± 0,4	15,6 ± 0,4
FO (n = 9)	75,5 ± 0,8	1,3 ± 0,1	4,3 ± 0,50	15,4 ± 0,5
CO (n = 9)	74,6 ± 0,4	1,4 ± 0,1	4,5 ± 0,5	14,9 ± 0,2
RO (n = 9)	76,1 ± 1,3	1,2 ± 0,1	4,3 ± 0,5	15,2 ± 0,3

Den biokjemiske sammensetningen i de ulike fôrene var nokså lik med tilnærmet identisk innhold av fett og protein, mens fôr FO (høyere andel fiskeolje) hadde høyest vanninnhold (9,8%) og fôr MA (tilsatt 13,8% algebiomasse) hadde høyest askeinnhold (8,5%).

**Tabell 6:** *Sammensetning av fôr av vann, aske, fett og protein i de fire ulike fôrene (% av tørr vekt). Fôrene var tilsatt henholdsvis mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO).*

Fôr	g/100g			
	Vann	Aske	Fett	Protein
MA (n = 9)	8,0 ± 0,0	8,50 ± 0,0	23,4 ± 0,5	37,1 ± 0,2
FO (n = 9)	9,8 ± 0,0	7,50 ± 0,0	23,3 ± 0,6	36,9 ± 0,6
CO (n = 9)	9,3 ± 0,0	7,60 ± 0,0	23,7 ± 0,1	36,7 ± 0,2
RO (n = 9)	8,6 ± 0,0	7,60 ± 0,0	23,2 ± 0,3	37,1 ± 0,1

Tallene er hentet fra masteroppgaven «Diatom Protein and Amino Acid» (Giæver, 2020).

### 4.3 Fettsyresammensetning i laksefilet

Fettsyresammensetningen (areal % av total mengde fettsyrer) for filetene til MA, FO, CO og RO, samt de tilhørende fôrene er presentert i **Tabell 7**. Fettsyreinholdet i filet og de respektive fôrene viste en god del likheter. Filet fra fiskene fôret med MA viste ingen bemerkelsesverdige forskjeller i innhold av FA sammenlignet med de øvrige gruppene fôret med marine oljekomponenter (FO, CO). Filetene fra gruppene fôret med marine oljekomponenter (MA, CO, FO), skilte seg ut fra filetene av fisk fôret med rapsolje (RO), ved å ha signifikant høyere innhold av typiske plantefettsyrer som 18:1 n-9, 18:2n-6 og 18:3n-3, og signifikant lavere innhold av typiske marine fettsyrer som 18:4n-3, 20:1n-9, 22:1n-11, 22:1n-9, 20:5n-3 og 22:6n-3.

Alle filetene, og tilhørende fôr, inneholdt mest av den enumettede fettsyren (MUFA) oljesyre (18:1n-9). Filetene fra fisk fôret med RO inneholdt dobbelt så mye oljesyre som de øvrige fiskegruppene, og bidro til at RO hadde signifikant høyere innhold av MUFA, sammenlignet med de andre tre. Innholdet av den mettede fettsyren (SFA) palmitinsyre (16:0) var nesten like høyt som oljesyre, og RO skilte seg ut, også for denne fettsyren, men ved at de inneholdt 2% *mindre* i forhold til de andre fiskegruppene. Fiskegruppene fôret med marine fôringredienser inneholdt høyest andel av den totale mengden SFA, sammenlignet med den plantebaserte.

Hovedandelen av de langkjedete flerumettete n-3 fettsyrene (n-3 LC-PUFA; EPA, DPA og DHA) i laksefiletene var DHA. Fiskegruppene fôret med MA, FO og CO hadde signifikant høyere innhold av DHA, n-3 LC-PUFA, sammenlignet med fisk fôret med RO. Linolsyre (18:2 n-6; LA) var den dominerende n-6 fettsyren, med høyest innhold i filetene i laksene fôret med RO. Med et innhold av 12,1% n-6 PUFA totalt, hadde laksene fôret med RO nærmere dobbelt innhold i forhold til de andre 3 gruppene.

**Tabell 7:** Fettsyresammensetning (areal % av total mengde fettsyrer) i filet hos fiskegruppene (n = 9) etter 62 dagers føring, samt i de respektive førene (n = 3). Førene var tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO).

	Sammensetning (%)				Sammensetning (%)			
	MA	FO	CO	RO	Fôr MA <sup>1</sup>	Fôr FO <sup>1</sup>	Fôr CO <sup>1</sup>	Fôr RO <sup>1</sup>
14:00	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>d</sup>	5,7 ± 0,0	5,7 ± 0,0	6,5 ± 0,2	2,4 ± 0,0
Ukjent FA	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>c</sup>	i.d	i.d	i.d	i.d
16:00	16,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	15,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	15,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	13,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	13,1 ± 0,0	13,2 ± 0,0	12,9 ± 0,1	8,5 ± 0,0
C14:1	i.d	i.d	i.d	i.d	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	i.d
16:1, n-7	4,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,0 <sup>b</sup>	6,4 ± 0,0	6,3 ± 0,0	6,1 ± 0,0	2,8 ± 0,0
C16:2n-4	i.d	i.d	i.d	i.d	0,4 ± 0,0	0,42 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C16:3n-4	i.d	i.d	i.d	i.d	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	i.d
18:00	3,3 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,6 ± 0,1
18:1, n-12	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,01 <sup>c</sup>	i.d	i.d	i.d	i.d
18:1, n-9	16,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	16,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	16,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	31,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	13,0 ± 0,0	12,9 ± 0,0	13,0 ± 0,1	37,7 ± 0,2
18:1, n-7	2,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>ab</sup>	2,8 ± 0,0 <sup>c</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>b</sup>	2,7 ± 0,0	2,7 ± 0,0	2,6 ± 0,0	3,0 ± 0,0
18:2, n-6 (LA)	5,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	5,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	10,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,0	4,8 ± 0,2	4,9 ± 0,1	14,3 ± 0,1
18:3, n-3 (ALA)	1,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	6,8 ± 0,0
C20:0	i.d	i.d	i.d =	i.d	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0
18:4, n-3 (SDA)	2,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,6 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,0 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,0	3,4 ± 0,0	6,7 ± 3,7	1,4 ± 0,0
20:1, n-9	8,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,2 <sup>ab</sup>	9,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	5,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	11,6 ± 0,1	11,5 ± 0,0	8,1 ± 3,8	5,5 ± 0,1
20:2, n-6	0,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,0 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,19 ± 0,04
20:4, n-6 (ARA)	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C20:3n-3	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	0,2 ± 0,0
22:1, n-11	9,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	9,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	14,5 ± 0,1	14,3 ± 0,0	13,5 ± 0,1	5,9 ± 0,1
22:1, n-9	2,1 ± 0,0 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	2,3 ± 0,0 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,0 <sup>c</sup>	1,9 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,9 ± 0,1	0,9 ± 0,0
20:5, n-3 (EPA)	4,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	4,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	7,3 ± 0,1	7,2 ± 0,0	7,6 ± 0,1	3,1 ± 0,1
22:4, n-6	i.d	0,3 ± 0,0	i.d	i.d	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,2
24:1, n-9	0,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,0 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,0 <sup>b</sup>	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,5 ± 0,0
22:6, n-3 (DHA)	13,1 ± 0,7 <sup>a</sup>	13,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	9,4 ± 0,1	9,4 ± 0,0	9,4 ± 0,1	4,2 ± 0,1
SFA	23,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	22,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	22,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	18,7 ± 0,6 <sup>b</sup>	20,7 ± 0,01	20,8 ± 0,0	21,3 ± 0,2	12,9 ± 0,1
n-3 PUFA	22,9 ± 0,8 <sup>a</sup>	23,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	22,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	17,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	30,3 ± 0,2	30,1 ± 0,1	27,3 ± 3,4	20,1 ± 0,3
n-6 PUFA	6,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	5,2 ± 0,1	5,8 ± 0,2	6,0 ± 0,1	14,7 ± 0,2
LC n-3 PUFA (DPA+EPA+DHA)	19,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	19,4 ± 0,8 <sup>a</sup>	17,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,1 ± 0,4 <sup>b</sup>	17,4 ± 0,1	17,3 ± 0,0	17,7 ± 0,1	7,6 ± 0,1

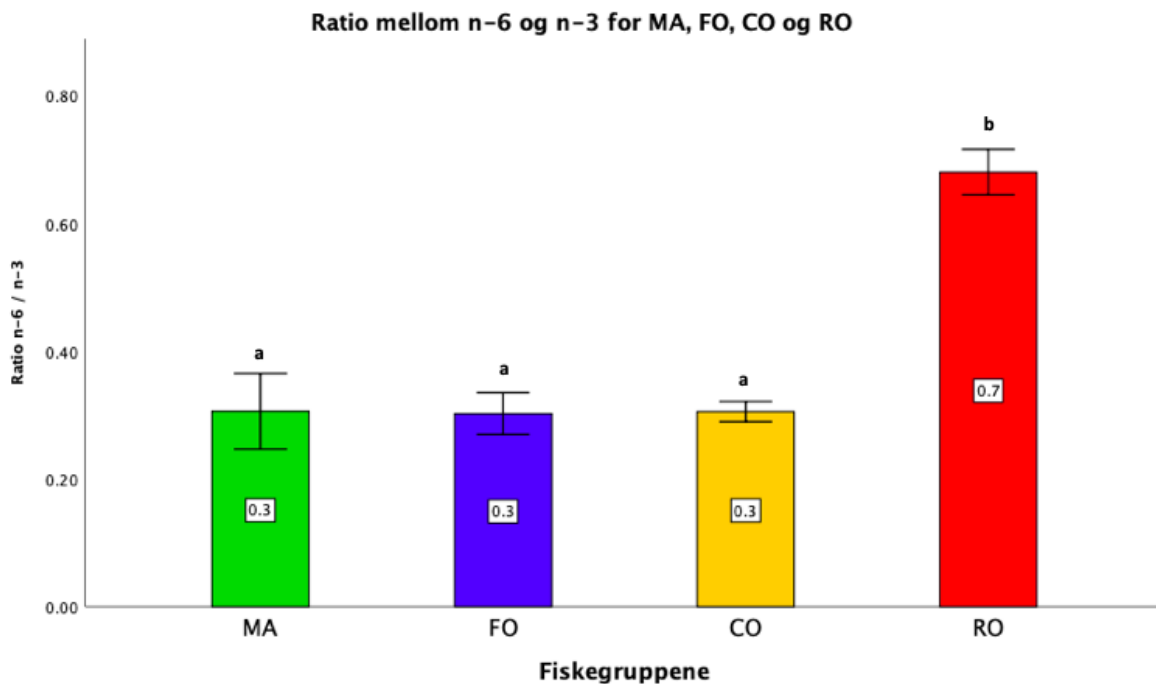
<sup>1</sup>Verdiene er hentet fra analyser gjort av mikroalgegruppa ved UiT (Dalheim & Svenning, 2020)

Ukjent FA = ukjent fettsyre i henhold til kjente standarder, SFA = mettet fettsyre, MUFA = enumettet fettsyre, PUFA = flerumettet fettsyre, LC n-3 PUFA = langkjedet flerumettet omega-3 fettsyre.

Forskjellig bokstav på samme linje betyr signifikant forskjell (p < 0,05).

i.d = ikke detektert

Ratioen mellom n-6 PUFA og n-3 PUFA er presentert i **Figur 7**. Filetene tilhørende fiskene fôret med marine komponenter hadde en ratio som var signifikant lavere ( $0,3 \pm 0,1$  g/100g) enn filetene fra fiskene fôret med plantekomponent ( $0,7$  g/100g).



**Figur 7:** Sammenligning av n-6/n-3 ratioen mellom fiskegruppe MA, FO, CO og RO. Forskjellige bokstaver viser signifikante forskjeller mellom fiskegruppene. Fôrene var tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO). Uttak ved oppstart T0, etter 30 dager (T1) og avsluttet etter 62 dager (T2).

Den totale mengde (g) av fettsyrene i 100 g filet er presentert i **Tabell 8**. Fisk fôret med RO inneholdt 0,44 g EPA, DPA og DHA per 100g filet og laks fôret med mikroalger hadde 0,55 g EPA, DPA og DHA per 100g filet, mens laks fôret med FO (0,70 g per 100g filet) og CO (0,68 g per 100g filet) hadde høyest innhold av EPA, DPA og DHA.



**Tabell 8:** Mengden fettsyre (g/100g) i fiskegruppene (n=9) ved uttak etter 62 dagers fôring. Fôrene var tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO).

	g/100g			
	MA	FO	CO	RO
14:0	0,14 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>
16:0	0,52 ± 0,06	0,56 ± 0,07	0,60 ± 0,06	0,48 ± 0,05
16:1, n-7	0,12 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>
18:0	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
18:1, n-12	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01
18:1, n-9	0,49 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,66 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,13 <sup>b</sup>
18:1, n-7	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
18:2, n-6 (LA)	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,04 <sup>c</sup>
18:3, n-3 (ALA)	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>c</sup>
18:4, n-3 (SDA)	0,07 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>
20:1, n-9	0,27 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,34 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,36 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>
20:2, n-6	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,00 <sup>b</sup>
20:4, n-6 (ARA)	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
22:1, n-11	0,29 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>b</sup>
22:1, n-9	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01
20:5, n-3 (EPA)	0,12 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,01 <sup>b</sup>
22:4, n-6	i.d	0,01 ± 0,00	i.d	i.d
24:1, n-9	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
22:5, n-3 (DPA)	0,05 ± 0,00 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00 <sup>b</sup>
22:6, n-3 (DHA)	0,38 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,48 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,32 ± 0,03 <sup>b</sup>
SFA	0,77 ± 0,09	0,83 ± 0,11	0,89 ± 0,09	0,68 ± 0,08
MUFA	1,39 ± 0,14	1,78 ± 0,27	1,86 ± 0,20	1,86 ± 0,21
PUFA n-6	0,21 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,05 <sup>b</sup>
LC-n-3-PUFA(DPA,EPA+DHA)	0,55 ± 0,04 <sup>ab</sup>	0,70 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,04 <sup>b</sup>

Forskjellig bokstav på samme linje betyr signifikant forskjell ( $p < 0,05$ )

Ukjent FA: ukjent fettsyre i henhold til kjente standarder.

i.d = ikke detektert

SFA = mettet fettsyre, MUFA = enumettet fettsyre, PUFA = flerumettet fettsyre, n-3 PUFA = langkjedet flerumettet omega-3 fettsyre

## 4.4 Aminosyresammensetning og proteininnhold

Mengden totale aminosyrer (mg AA/g filet) i filet fra fiskene fôret med MA, FO, CO og RO, samt de respektive fôrene, er presentert i **Tabell 9**. Aminosyresammensetningen i de fire fiskegruppene var svært like, både for de essensielle og de ikke-essensielle aminosyrene og ingen signifikante forskjeller ble observert. Det samme var tilfelle for aminosyre-sammensetningen i de fire fôrene. Det totale aminosyreinnholdet (TAA) varierte mellom 149,5 og 155,5 mg AA/g for de fire fiskegruppene, mens TAA i fôrene varierte mellom 468,2 og 473,6.

**Tabell 9:** Totale aminosyrer i filet fra de ulike fiskegrupper (n = 8 i MA, n = 9 i FO, CO og RO) etter 62 dagers fôring, samt de 4 fôrene (n=3). Tabellen inkluderer ti essensielle AA og åtte ikke essensielle AA, for fisk. Fôrene var tilsatt mikroalger (MA), fiskeolje (FO), calanusolje (CO) og rapsolje (RO).

	mg AA / g				mg AA / g			
	MA	FO	CO	RO	Fôr MA <sup>1</sup>	Fôr FO <sup>1</sup>	Fôr CO <sup>1</sup>	Fôr RO <sup>1</sup>
<i>Essensielle aminosyrer</i>								
<b>Arg</b> – Arginin	10,3 ± 1,0	11,2 ± 1,0	10,8 ± 0,6	10,5 ± 0,8	29,1 ± 0,6	28,5 ± 0,8	29,1 ± 0,5	30,5 ± 0,1
<b>His</b> – Histidin	4,0 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,4 ± 0,3	4,0 ± 0,1	8,9 ± 0,1	9,2 ± 0,1	9,2 ± 0,0	9,0 ± 0,1
<b>Ile</b> – Isoleucin	7,1 ± 0,2	7,0 ± 0,2	6,9 ± 0,1	7,0 ± 0,1	17,6 ± 0,1	17,9 ± 0,2	17,9 ± 0,2	17,9 ± 0,2
<b>Leu</b> – Leucin	13,6 ± 0,3	13,3 ± 0,3	13,1 ± 0,2	13,4 ± 0,2	35,9 ± 0,1	36,6 ± 0,4	36,5 ± 0,2	36,3 ± 0,2
<b>Lys</b> – Lysin	16,2 ± 0,4	15,9 ± 0,4	15,7 ± 0,2	16,0 ± 0,3	30,9 ± 0,1	31,4 ± 0,4	31,3 ± 0,2	31,3 ± 0,2
<b>Met</b> – Metionin	5,6 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,2 ± 0,1	5,4 ± 0,1	10,2 ± 0,1	10,3 ± 0,1	10,7 ± 0,1	10,5 ± 0,1
<b>Phe</b> – Fenylalanin	7,4 ± 0,2	7,4 ± 0,2	7,1 ± 0,1	7,3 ± 0,1	22,4 ± 0,0	22,8 ± 0,2	22,8 ± 0,2	i.d
<b>Thr</b> – Treonin	8,0 ± 0,2	7,8 ± 0,2	7,6 ± 0,1	7,9 ± 0,1	18,0 ± 0,0	18,1 ± 0,3	18,1 ± 0,0	17,9 ± 0,2
<b>Trp</b> – Tryptofan*	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d	i.d
<b>Val</b> – Valin	8,0 ± 0,2	8,0 ± 0,2	7,9 ± 0,1	8,0 ± 0,1	19,0 ± 0,2	19,5 ± 0,3	19,6 ± 0,1	19,7 ± 0,1
<b>Sum essensielle AA</b>	80,1 ± 2,5	80,1 ± 2,6	77,6 ± 1,03	79,5 ± 1,5	192,0 ± 0,1	194,3 ± 0,3	195,0 ± 0,1	173,1 ± 0,2
<i>Ikke essensielle aminosyrer</i>								
<b>Ala</b> – Alanin	9,7 ± 0,22	9,6 ± 0,2	9,3 ± 0,1	9,9 ± 0,2	23,1 ± 0,2	23,2 ± 0,3	23,0 ± 0,0	23,0 ± 0,1
<b>Asp</b> – Asparbinsyre <sup>2</sup>	12,5 ± 0,3	12,4 ± 0,3	11,9 ± 0,1	12,3 ± 0,3	28,8 ± 0,1	28,9 ± 0,4	28,9 ± 0,1	28,6 ± 0,2
<b>Cys</b> – Cystein	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,8 ± 0,1
<b>Glu</b> – Glutamatsyre <sup>3</sup>	25,8 ± 0,5	25,4 ± 0,7	24,4 ± 0,3	25,1 ± 0,6	115,7 ± 0,8	119,1 ± 1,3	119,5 ± 1,0	117,8 ± 0,7
<b>Gly</b> – Glycin	7,6 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	25,4 ± 0,2	25,4 ± 0,2	25,5 ± 0,1	25,0 ± 0,1
<b>Pro</b> – Prolin	6,6 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,1 ± 0,2	6,3 ± 0,3	40,9 ± 0,3	40,3 ± 0,6	41,2 ± 0,5	39,1 ± 0,3
<b>Ser</b> – Serin	6,7 ± 0,2	6,6 ± 0,2	6,3 ± 0,1	6,5 ± 0,1	23,5 ± 0,0	23,9 ± 0,3	23,7 ± 0,1	23,6 ± 0,2
<b>Tyr</b> – Tyrosin	5,9 ± 0,6	6,1 ± 0,4	6,0 ± 0,1	5,1 ± 0,6	13,3 ± 0,4	12,4 ± 1,4	11,1 ± 0,9	13,6 ± 0,8
<b>Sum ikke essensielle AA</b>	75,4 ± 1,6	74,0 ± 2,1	70,46 ± 1,3	72,7 ± 1,8	305,4 ± 0,3	307,4 ± 0,6	307,6 ± 0,4	307,0 ± 0,3
<b>SUM TAA</b>	155,5 ± 4,01	154,1 ± 4,45	149,5 ± 2,24	152,3 ± 3,33	468,2 ± 2,3	473,2 ± 3,0	473,6 ± 7,6	472,0 ± 1,6

<sup>1</sup>Tall fra Giæver, 2020

Statistikk ble kun utført på filetene fra MA, FO, CO og RO. Ingen signifikante forskjeller ble observert (p < 0,05)

Tryptofan ble ikke detektert, da det ødelegges fullstendig under syrehydrolysen

Aspargin<sup>2</sup> og Glutamin<sup>3</sup> og deamineres under syrehydrolysen og blir dermed tatt med i beregningene av henholdsvis aspargin-2 og glutamatsyre

i.d = ikke detektert

## 5 Diskusjon

Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke hvordan den biokjemiske sammensetningen av oppdrettslaks (filet) påvirkes ved å inkludere kiselalger (*P. glacialis*) i fôret til fisken. En gruppe smålaks ble gitt fôr med mikroalgebiomasse som ingrediens i fôret i 62 dager, og vekst og biokjemisk sammensetning av laksefiletene ble undersøkt. Effektene ble sammenlignet med smålaks som var fôret med et tradisjonelt fôr med fiskeolje, et med calanusolje og et kommersielt fôr med relativt høyt innhold av rapsolje. Totalt ble den biokjemiske sammensetningen undersøkt for 36 fisk, med en lik fordeling på ni fisk i hver fiskegruppe. Resultatene fra dette prosjektet indikerer at inkludering av en relativt moderat mengde mikroalgebiomasse i laksefôr ikke ga noen signifikant effekt på overlevelse, vekst og sammensetning av fileten fra atlantisk laks sammenlignet med laks fôret med fôr tilsatt tilsvarende andel av andre marine komponenter.

For å minke presset på havets fiskeribestander, samt redusere energitapet i næringskjeden, har det vært sett på alternative kilder til lipider i produksjon av oppdrettsfôr. Mikroalger er foreslått som en god kandidat på grunn av biokjemisk sammensetning og organismens plassering i den trofiske pyramide (**Figur 1**). Formerings- og plassbesparingsraten er høy. Disse algene vokser raskt og står for 40% av verdens fotosyntese til tross for at de kun utgjør 0,1% av jordens biomasse, og det eneste de trenger for å leve er lys, CO<sub>2</sub>, og næringssalter (Nelson et al., 1995; Field et al., 1998). Et marint fôr med alger er både sunt og mer egnet for fisken da det ligner dens naturlige diett. Det er en allmenn oppfatning at oppdrettsfisk får for lite marine ingredienser i dietten sin, og at det ikke er holdbart å føre fisk med fisk. Målet for fôrproduzentene er å utvikle et fôr som både er økonomisk og ernæringsmessig (Skretting, 2018). Utfordringen vil dermed være å skape en mer kostnadseffektiv fôrproduksjon samtidig som mengdebehovet skal møtes.

Det tilfeldige utvalget på ni laks fra hver diett (MA, FO, CO og RO), vil bero seg på en del usikkerhet i forhold til hvor representativt akkurat dette utvalget er for hele populasjonen. I tillegg kan fisken påvirkes av abiotiske faktorer. Miljøet har mye å si, og inkluderer ulike faktorer som strøm, oksygen og støy, samt kvalitet og temperatur på vannet. Alt som kan føre til stress er med på å påvirke fisken. Under fôringsforsøket hadde havbruksstasjonen tatt hensyn til det økte støynivået under arbeidstiden, og det var dermed lagt inn en fôringspause under de mest hektiske arbeidstimene for å unngå unødvendig stress for fisken.

## 5.1 Effektivitet - lengde og vekt

Laksen vokste bra under hele fôringsforsøket, og statistisk hadde all laks lik vekt- og lengdeutvikling. For samtlige fiskegrupper er vekten nesten tredoblet, fra start til slutt. Vektøkningen sier en del om potensialet til fôringrediensene, ettersom det er fôrinntaket som bestemmer veksten (Espe, 2011). Observasjonene kan tyde på at veksten i dette studiet er på lik linje med vekstraten et kommersielt fôr ville gitt. Det er vanskelig å trekke noen klare konklusjoner rundt fordøyeligheten av de fire fôrtypene, da det ikke ble brukt noen markør for fôrinntak, faces ikke ble tatt ut og fôrspill ikke registrert, men forsøksfôrene er tilsynelatende like god som kommersielt tilgjengelige fôr. Et hovedmål er å kartlegge effekter av tilsetning av kiselalgebiomasse i fôr på vekst og utvikling av laksen. Ingen uønskede effekter ble observert, laksen som fikk mikroalger i fôret hadde ingen dødelighet og vokste like raskt som de andre gruppene.

I en tidligere studie hvor det ble brukt et mikroalgebasert avfettet proteinmel produsert fra mikroalgen *Nannochloropsis oceanica* (*N. oceanica*), ble det demonstrert at mikroalger kan inkluderes i laksefôr, men at mikroalgeemelet ikke må tilføres i for store mengder. Ved bruk av 20% mikroalgemel ble det observert negative effekter på vektøkning, SGR og ulike helseparametre (Sørensen, 2017). Selv om mikroalgen det er snakk om i studiet til Sørensen (2017) er *N. oceanica*, kan man tenke seg til at den har likhetstrekk med *P.glacialis*, og at dette studiet viser at inkludering av 13,8% intakt *P.glacialis*-biomasse (**Tabell 2**) i laksefôr, er innenfor trygge nivå når det gjelder vekst.

Vekstraten (SGR) ga statistisk forskjell mellom de fire fiskegruppene. Vekstraten for gruppene fôret med MA og CO er lik RO, mens vekstraten for RO er høyere enn FO. En mulig medvirkende faktor til at RO-laksene hadde høyere SGR sammenlignet med FO-laksene, kan være at laksene i RO-gruppen var marginalt magrere ved oppstart, mens FO-gruppen hadde høyest vekt ved oppstart (disse forskjellene ved oppstart er derimot ikke signifikante). Observert er SGR noe høyere enn forventet for alle fire gruppene sammenlignet med fôringstabeller basert på anvendt temperatur og fiskestørrelse (Austreng, 1987), men dette skyldes nok at sammensetningen av fôrene har blitt optimalisert siden da. Kondisjonsfaktoren er lik for alle fire fiskegruppene ved alle tre målingene, og det er en økning for alle fiskene fra start til slutt av forsøket. Ved andre veiing var det likevel en nedgang i vekt for to fisk, og gav tilsvarende nedgang i KF. Fiskene var fra forskjellige kar og fôrgrupper (**Figur 5**: kar 1 og 12),

noe som tyder på at det ikke hadde noen sammenheng med fôrpreferanser eller karmiljøet. Sosialt hierarki og eventuell feilregistrering av vekt kan være en mulig årsak til nedgangen. Ved siste veiing lå begge fiskene imidlertid på nivå med resten av fiskene.

## 5.2 Biokjemisk sammensetning av laksefilet

I dette studiet ble det ikke observert noen åpenbare forskjeller i biokjemisk sammensetning av laksefiletene mellom de eksperimentelle gruppene. Fôringseksperimentet startet rett etter overførsel av smolt til sjøvann, og fôringen ble gjennomført i 62 dager. Ved avslutningen veier laksen fra 214 til 402 g. Dette er det første studiet på effekter av å inkludere arktiske kiselalger, som *P. glacialis*, i fôr til atlantisk laks, eller for den saks skyld også andre fiskeslag. Andre mikroalger har vært brukt i fôr til laks, og selv om de har vært vist å påvirke veksten til laksen, har det ikke vært rapportert at innslag av mikroalger påvirker andelen protein og fett i laksemuskelen (Sørensen, 2017).

I dette forsøket hadde fileten fra fisk i MA et prosentinnhold av vann, aske, fett og protein på henholdsvis 75,7; 1,2; 3,8 og 15,6%. Til sammen utgjør dette 96,3%, og er innenfor forventet verdi (**Tabell 1**). De resterende 3,7%, som ikke er dokumentert kan tenkes å ha flere grunner. En liten andel kan være karbohydrat, men da i en beskjeden mengde på under 1% (Hemre et al., 2002). En annen forklaring er at noe har gått bort i væsketap, etter filetene gikk gjennom en fryse/tine-syklus. En siste mulighet kan være utilstrekkelig nøyaktighet i utførelsen av analysene.

Fettinnholdet er ved det laveste sjiktet (3,8% i MA) (**Tabell 1**), men med tanke på størrelsen på laksen som ble brukt i forsøket, så er dette som forventet. Det har vært dokumentert at fettinnholdet i fileten fra små laks er lavere (Bell et al., 1998). Små laks er mye magrere sammenlignet med slakteklar oppdrettslaks, og sammensetningen i fileten fra små laks vil dermed ikke være sammenlignbar med oppdrettslaks fra butikk. Proteininnholdet til MA er rett i overkant av 15%. Ses protein- og fettinnholdet i sammenheng, er dette fisk med lavt fettinnhold og høyt proteininnhold (Haard, 1992).

Sammenlignet med oversikten gitt i **Tabell 1**, hadde fôrene som ble benyttet i dette forsøket også forventet sammensetning av vann, aske lipider og protein.

### 5.3 Fettsyresammensetning i laksefilet

Generelt ble det observert at fettsyresammensetningen i filetene reflekterte sammensetningen i de tilhørende fôrene. Dersom fettinnholdet er relativt høyt, slik som hos atlantisk laks, er det fettsyresammensetningen til fôret som bestemmer fettsyresammensetningen i fileten (Jensen et al., 2012). Filet fra gruppene fôret med marine komponenter (MA, FO og CO) skilte seg ut fra filet fra gruppen fôret med rapsolje ved å ha signifikant høyere innhold av typiske plantefettsyrer, som oljesyre (18:1n-9), LA (18:2n-6) og ALA (18:3n-3), samt signifikant lavere innhold av typiske marine fettsyrer som 18:4n-3, 20:1n-9, 22:1n-9, 20:5n-3 og 22:6n-3. Like skilnader er gjort i tidligere studier (Bell et al., 2002; Menoyo et al., 2007; Katerina et al., 2020).

Der det er observert signifikante forskjeller kommer algefôret godt ut ved at det er sammenlignbart med filetene fra fisk fôret med tradisjonelt fiskeoljefôr og calanusoljefôr, som representerer arter to og et hakk opp i det trofiske nivået (**Figur 1**). Det eneste nevneverdige, som skiller seg, er at MA hadde lavere sammensetning av ALA sammenlignet med de andre to marine fôrene, men det utgjorde ingen forskjell på total mengde n-3 PUFA. Mengden omega-3 i spiselig filet reflekterer hvor mye omega-3 fisken har fått via fôret (Torstensen et al., 2013). Evalueringen av fettsyreinholdet, viser at filetene fôret med marine komponenter inneholder mye n-3 LC-PUFA. Andelen DPA og DHA i filetene er høyere enn i fôrene. I kontrast er andelen SDA og EPA lavere i filetene enn i fôret, og er omvendt fra resultater i en tidligere studie (Jensen et al., 2012) gjort på atlantisk laks. En grunn til forskjellene kan være at elongasene og desaturasene i fiskene fra dette studiet har favorisert syntetiseringen av omega-3 fettsyrene, over omega-6 (**Figur 2**). Tilstedeværelsen av de langkjedede flerumettede fettsyrene (LC-PUFA) er av stor interesse på grunn av deres helsefrembringende effekter når det kommer til hjerte-karsykdommer (Mozaffarian & Rimm 2006; Kris-Etherton et al., 2009). For å få i seg nok av de langkjedete omega-3 fettsyrene anbefaler helsemyndigheter å spise fet fisk regelmessig. Anbefalingene varierer men fra «Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN)», Storbritannias helsemyndigheter sitt rådgivningsorgan, anbefales et daglig inntak av 0,45 g EPA og DHA (SACN, 2004). Et inntak av 100 gram av filetene fra dette forsøket hadde dekket dette, med unntak av filetene fra RO-gruppen, som gir 0,41 g EPA og DHA per 100g filet. Ratioen mellom n-6 og n-3 (**Figur 7**), som anbefales å ligge under 1 er også innafør. Ratioen mellom n-6 og n-3 fettsyrer er for høyt i den vestlige dietten, og for å endre dette er det anbefalt å få i seg mer av n-3 og mindre av n-6 FA. Ratioen for RO er over dobbel så høy sammenlignet med filetene fra fiskene fôret med marine komponenter, men likevel er alle

verdiene under 1. Generelt viser dette at et økt inntak av oppdrettet norsk atlantisk laks øker inntaket av LC n-3 PUFA, samt reduserer n-6/n-3 ratioen. Funnene er i tråd med tidligere studier. (Jensen et al., 2012).

Alle de fire diettene har et lavt innhold av SFA (14:0, 16:0 og 18:0), og etter fôringsforsøket inneholder filetene høyere mengder SFA enn fôret. Fisk fôret med lavt innhold av SFA i dietten, ser ut til å få høyere konsentrasjon av mettede fettsyrer i muskelen enn i det tilbydde fôret (Yu et al., 1977; Menoyo et al., 2003; Turchini et al. 2003a). Rapsolje er en ingrediens med veldig høyt innhold av enumettede fettsyrer (MUFA) (Talbot, 2011), og forklarer hvorfor innholdet i RO-fôret er omtrent 10% høyere enn de resterende. Det er også signifikant høyere verdi i filetene fôret med rapsolje, sammenlignet med MA, FO og CO. Både SFA og MUFA brukes til energiproduksjon i fisk, men absorpsjonen og fordøyelsen av de to ser ut til å være lavere enn PUFA, og er grunnen til at det også er en faktor å ta hensyn til når et fôr utvikles (Henderson & Sargent, 1985; Torstensen et al., 2000; Bell et al., 2002;). Innholdet av PUFA lå for øvrig innenfor tilfredsstillende nivå basert på tidligere studier, i både fôr og filet av atlantisk laks (Kousoulaki et al., 2016; Sørensen et al., 2016; Turchini et al., 2009).

## 5.4 Aminosyresammensetning og proteininnhold

Proteinkomponenten representerer den største kostnaden i fôrproduksjonen (Espe, 2011). Karnivore oppdrettsfisk som laks er avhengig av å få et proteinrikt fôr med god kvalitet som gir maksimal vekst uten at proteinet omsettes til metabolsk energi (Wilson, 2003). Fiskemuskel er en god næringskilde til lett fordøyelig protein, da den inneholder mindre mengder av bindevevsprotein kollagen (Hultin, 1985; Venugopal, 1996). De essensielle aminosyrene i henholdsvis alge- og plantefôret ble bestemt til 19,2% og 17,3% (**Tabell 9**) og utgjorde omtrent 8% i filet fra fisk fôret med disse fôrene. Fisk fôret med plantefôret viser dermed at de har klart å utnytte tilført protein litt bedre enn mikroalgefiskene. Det totale innholdet av aminosyrer er likevel høyere hos MA. For fiskegruppe MA, FO, CO og RO er innholdet av TAA i fôr omtrent 4 ganger høyere enn i filetene, og samsvarer med tidligere studier på juvenile atlantiske laks (Bureau et al., 2003; Peterson et al., 2019).

Fra **Tabell 9** ser vi også at laksefiletene inneholdt alle EAA, med unntak av tryptofan. Aminosyrene er målt etter en sur hydrolyse, der tryptofan blir degradert og dermed ikke blir detektert. Kravene til innhold av aminosyrer i fôr ser ut til å variere ut i fra mange ulike faktorer, som blant annet størrelse på fisken. Kravene til protein har visst seg å gå ned i takt med økende størrelse og alder. I tillegg har fisk, som andre dyr, et krav til en velbalansert blanding av essensielle og ikke essensielle aminosyrer (Wilson, 2003).

For å se på hvor mye av proteinene som ble omgjort til energi eller lipidsyntese kunne en analyse av frie aminosyrer vært utført. Konsentrasjonen av frie aminosyre er ofte blitt brukt for å måle responsen i fisk etter et måltid. Dersom tilførselen via dietten blir for stor vil bare en liten andel bli brukt til å syntetisere nye proteiner, resten vil bli overført til energi (Dabrowski & Guderley, 2003; Wilson, 2003; Sissener, 2018).



## 6 Konklusjon

Resultatene fra oppgaven viste at vekst og dødelighet av smålaks ikke ble påvirket av *P.glacialis* som komponent i fôret. I tillegg ga inkluderingen av mikroalgen i fôr tilfredsstillende mengder av protein og fettsyrer. Fettsyresammensetningen av filetene til MA viste seg å være lik som ved inkludering av andre marine komponenter (FO og CO).

I ettertid sees det at flere ting kunne vært interessant å studere nærmere, dersom tiden strakk til og omstendighetene var annerledes. Det hadde blant annet vært interessant å analysere organene som ble tatt ut sammen med filetene i siste uttak, for å se på eventuell påvirkning. Kanskje dette er noe som kan være et tema for fremtidig arbeid. Det er også verd å nevne at dette forsøket er en del av et større prosjekt. De gjenværende laksene fra avslutningen av vårt fôringseksperiment, ble benyttet til å undersøke om effekten av inkludering av *P.glacialis* i fôret hadde påslag mot lakselus.

Lignende studier er stort sett bare gjort på fisk i tidlig livsstadier, effektene på lang sikt er dermed lite dokumentert. Dersom dette fôret skal brukes kommersielt, er det veldig viktig å vurdere kostnader forbundet med bruk av kiselalger som ingrediens. Små endringer i fôrkostnadene kan ha en stor og viktig innflytelse for lønnsomheten til et oppdrettsfirma, som er de eventuelle kundene til et slikt fôr. Nye og mer bærekraftige kultiveringsmetoder må dermed utarbeides. Potensialet er der, og dersom man klarer å utnytte det fullt ut, vil mikroalger kunne produseres mer effektivt enn terrestriske planter, sånn som raps.

Avslutningsvis ser det ut til at vi er på god vei når det gjelder å forberede oss på forandringene som vi allerede ser i økende grad. Ressursallokeringene må finne sted samtidig som vi skal opprettholde en robust laks som er tilpasningsdyktig. Alt tatt i betraktning kan det konkluderes med at *P.glacialis* er et reelt alternativ som kilde til n-3 LC PUFA EPA i fiskefôr, og kan være med på å levere et sunt produkt til forbruker i overskuelig framtid. Trolig vil det ta noen år før studiene gir avkastning på en mer tilgjengelig og rimelig fôrsammensetning. Kanskje kan dette fôret gi fordeler i fiskehelse også. Videre studier er nødvendig for å bekrefte egnetheten av kiselalge som ingrediens i kommersielt fôr.

## 7 Litteratur

- Aas, T. S., Ytrestøyl, T. & Åsgård, T. (2019). *Ressursutnyttelse I norsk lakseoppdrett i 2016 – Faglig sluttrapport*. Rapport nr.23. Nofima, ernæring og fôrteknologi. ISBN: 978-82-8296-605-4
- Artamonova, E. Y., Svenning, J. B., Vasskog, T., Hansen, E. & Eilertsen, H. C. (2017). Analysis of phospholipids and neutral lipids in three common northern cold water diatoms: *Coscinodiscus concinnus*, *Porosira glacialis*, and *Chaetoceros socialis*, by ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1241–1249. doi:10.1007/s10811-017-1055-0
- Armand, L. K., Crosta, X., Romero, O. & Pichon, J.-J. (2005). The biogeography of major diatom taxa in Southern Ocean sediments. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 223(1-2), 93–126. doi: 10.1016/j.palaeo.2005.02.015
- Armbrust, E. V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. *Nature*, 459(7244), 185–192. doi:10.1038/nature08057
- Arterburn, L. M., Hall, E. B. & Oken, H. (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n–3 fatty acids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1467S–1476S. doi:10.1093/ajcn/83.6.1467s
- Austreng, E., Storebakken, T. & Åsgård, T. (1987). Growth rate estimates for cultured Atlantic salmon and rainbow trout. *Aquaculture*, 60(2), 157–160. doi:10.1016/0044-8486(87)90307-3
- Bakketeig, I. E., Gjørseter, H., Hauge, M., Sunnset, B. H. & Toft, K. Ø. (Red.) 2015. Havforskningsrapporten 2015. *Fisken og havet*, særnr. 1-2015.
- Bell, J. G., McEvoy, J., Webster, J. L., McGhee, F., Millar, R. M. & Sargent, J. R. (1998). Flesh Lipid and Carotenoid Composition of Scottish Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 119–127. doi:10.1021/jf970581k
- Bell, J. G., Henderson, R. J., Tocher, D. R., McGhee, F., Dick, J. R., Porter, A. & Sargent, J. R. (2002). Substituting Fish Oil with Crude Palm Oil in the Diet of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Affects Muscle Fatty Acid Composition and Hepatic Fatty Acid Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 132(2), 222–230. doi:10.1093/jn/132.2.222
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A. & Otiillar, R. P. (2008). The Phaeodactylum genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, 456(7219), 239–244. doi:10.1038/nature07410
- Brett., J. R. & Groves, T. D. D. (1979). Physiological energetics. *Fish Physiology*. 8, 280–352. ISBN 0-12-350408-2
- Bureau, D. P., Kaushik, S. J. & Cho, C. Y. (2003). Bioenergetics. *Fish Nutrition*, 1–59. doi:10.1016/b978-012319652-1/50002-1
- Burlew, J. S (1953) Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant. (1953). *AIBS Bulletin*, 3(5), 11–11. doi:10.1093/aibsbulletin/3.5.11
- Certik, M. & Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87(1), 1–14. doi:10.1016/s1389-1723(99)80001-2
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25(3), 294–306. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.02.001
- Cook, H.W. & McMaster, C., R. (2002). Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and membranes*. 7(4), 181- 204.
- Dabrowski, K. & Guderley, H. (2003). Intermediary Metabolism. *Fish Nutrition*, 309– 365. doi:10.1016/b978-012319652-1/50007-0

- Dalheim, L. & Svenning, J. B. (2019). *Fettsyresammensetninganalyse av fôr med mikroalgen P. glacialis som komponent*. Algegruppen v/ Universitetet i Tromsø. (Mottatt April 2020)
- De Baar, H. J. W. (1994). von Liebig's law of the minimum and plankton ecology (1899–1991). *Progress in Oceanography*, 33(4), 347–386. doi:10.1016/0079-6611(94)90022-1
- Degerlund, M. & Eilertsen, H. C. (2009). Main Species Characteristics of Phytoplankton Spring Blooms in NE Atlantic and Arctic Waters (68–80° N). *Estuaries and Coasts*, 33(2), 242–269. doi:10.1007/s12237-009-9167-7
- Dineshbabu, G., Goswami, G., Kumar, R., Sinha, A. & Das, D. (2019). Microalgae-nutritious, sustainable aqua- and animal feed source. *Journal of Functional Foods*, 62, 103545. doi: 10.1016/j.jff.2019.103545
- Ehrenberg, C. G. (1853). Einen Nachtrag zu dem Vortrage uber Verbreitung und Einfluss des microscopischen Lebens in Sud-und Nord-Amerika, Acad. Wiss. *Berlin Monatsber*, 220.
- Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M. & Sijtsma, L. (2014). Microalgae- based products for the food and feed sector: an outlook for Europe. *European Commission*. doi: 10.2791/3339
- Espe, M., Vikeså, V., Helgøy Thomsen, T., Adam, A., Saito, T. & Skjærven, K. H. (2019). Atlantic salmon fed a nutrient package of surplus methionine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6 improved growth and reduced the relative liver size, but when in excess growth reduced. *Aquaculture Nutrition*. doi:10.1111/anu.13010
- Espe, M., Ruohonen, K. & El-Mowafi, A. (2011). Effect of taurine supplementation on the metabolism and body lipid-to-protein ratio in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Research*, 43(3), 349–360. doi:10.1111/j.1365-2109.2011.02837.x
- FAO. (2018a). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 (SOFIA) - Meeting the sustainable development goals. *The state of the world*, 2019. Roma.
- Field, C. B. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science*, 281(5374), 237–240. doi:10.1126/science.281.5374.237
- Folch, J. Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids for animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 487-509.
- Giæver, I., H. (2020). *Diatom Protein and Amino Acids- A mass cultivated northern diatom and its potential for utilization as protein source in fish feed* (masteroppgave i marin bioteknologi). Universitetet i Tromsø: fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi.
- Gladyshev, M. I., Arts, M. T. & Sushchik, N. N. (2009). Preliminary estimates of the export of omega-3 highly unsaturated fatty acids (EPA+DHA) from aquatic to terrestrial ecosystems. *Lipids in Aquatic Ecosystems*, 179–210. doi:10.1007/978-0-387-89366-2\_8
- Guil-Guerrero, J., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J., Campra-Madrid, P. & Reboloso-Fuentes, M. (2004). Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*, 65(4), 511–517. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.02.014.
- Haard, N. F. (1992). Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. *Food Research International*, 25(4), 289–307. doi:10.1016/0963-9969(92)90126p
- Halver, J. E. & Hardy, R. W. (2003). Nutrient Flow and Retention. *Fish Nutrition*, 755–770. doi:10.1016/b978-012319652-1/50015-x
- Hambrey, J. (2017). *The 2030 agenda and the sustainable development goals: the challenge for aquaculture development and management*. Committee on fisheries, FAO, sustainable development goals, Roma, Sub-committee on aquaculture, ninth session. ISSN 2070-6065
- Hardy, R. W. & Barrows, F. T. (2003). Diet Formulation and Manufacture. *Fish Nutrition*, 505–600. doi:10.1016/b978-012319652-1/50010-0.

- Hasle, G. R. (1973) Thalassiosiraceae, a new diatom family. *Norwegian Journal of Botany*, 20, 67-69
- Hasle, G. R. (1976) An analysis of the phytoplankton of the Pacific Southern Ocean. *Hvalrådets Skrifter*, 52, 1-168
- Heimdal, B. R. (1983). Phytoplankton and nutrients in the waters north-west of Spitsbergen in the autumn of 1979. *Journal of Plankton Research*, 5(6), 901–918. doi:10.1093/plankt/5.6.901
- Hemre, G.-I., Momsen, T. P. & Krogdahl, A. (2002). Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8(3), 175–194. doi:10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x
- Henderson, R. J. & Sargent, J. R. (1985). Chain-length specificities of mitochondrial and peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids in livers of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 82(1), 79–85. doi:10.1016/0305-0491(85)90131-2
- Horwitz, W. (2004). *Official methods of analysis of AOAC International*, USA.
- Hultin, H. O. (1985). Characteristics of Muscle Tissue. *Food Chemistry*, 2, 725.
- Indrayani I (2017) *Isolation and characterization of microalgae with commercial potential*. (Doktoravhandling Murdoch University). Hentet fra: <https://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/35148/1/Indrayani2017.pdf>
- Ingebrigtsen, R. A., Hansen, E., Andersen, J. H. & Eilertsen, H. C. (2016). Light and temperature effects on bioactivity in diatoms. *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 939–950. doi:10.1007/s10811-015-0631-4
- Ingebrigtsen, R. A., Hansen, E., Andersen, J. H. & Eilertsen, H. C. (2017). Field sampling marine plankton for biodiscovery. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-15980-8
- Jensen, I. J., Maehre, H. K., Tømmerås, S., Eilertsen, K. E., Olsen, R. L. & Elvevoll, E. O. (2012). Farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is a good source of long chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Bulletin*, 37(1), 25–29. doi:10.1111/j.1467-3010.2011.01941.x
- Jørgensen, E. (1905). The protist plankton and the diatoms in bottom samples. *Bergens Mus. Skr.*, 49–151.
- Katerina, K., Berge, G. M., Turid, M., Aleksei, K., Grete, B., Trine, Y. & Bente, R. (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
- Kelly, P. B., Reiser, R. & Hood, D. W. (1959). The origin of the marine polyunsaturated fatty acids. Composition of some marine plankton. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 36(3), 104–106. doi:10.1007/bf02639979
- Kiron, V., Phromkunthong, W., Huntley, M., Archibald, I. & Scheemaker, G. (2012). Marine microalgae from biorefinery as a potential feed protein source for Atlantic salmon, common carp and whiteleg shrimp. *Aquaculture Nutrition*, 18(5), 521–531. doi:10.1111/j.1365-2095.2011.00923.x
- 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. doi:10.1017/jns.2015.14
- Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A. & Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. Prostaglandins, *Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2-3), 99–104. doi: 10.1016/j.plefa.2009.05.011

- Lall, S. P. (2003). The Minerals. *Fish Nutrition*, 259–308. doi:10.1016/b978-012319652-1/50006-9
- Lovell, R. T. (2003). Diet and Fish Husbandry. *Fish Nutrition*, 703–754. doi:10.1016/b978-012319652-1/50014-8
- Mann, D. G. & Vanormelingen, P. (2013). An Inordinate Fondness? The Number, Distributions, and Origins of Diatom Species. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(4), 414–420. doi:10.1111/jeu.12047
- Mata, T. M., Martins, A. A. & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. doi: 10.1016/j.rser.2009.07.020
- Medlin, L. K., Kooistra, W. H., Gersonde, R. & Wellbrock, U. (1996). Evolution of the diatoms (*Bacillariophyta*). II. Nuclear-encoded small- subunit rRNA sequence comparisons confirm a paraphyletic origin for the centric diatoms. *Molecular Biology and Evolution*, 13(1), 67–75. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025571
- Menoyo, D., Lopez-Bote, C. J., Diez, A., Obach, A. & Bautista, J. M. (2007). Impact of n–3 fatty acid chain length and n–3/n–6 ratio in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets. *Aquaculture*, 267(1-4), 248–259. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.02.031
- Mente, E., Deguara, S., Santos, M. B. & Houlihan, D. (2003). White muscle free amino acid concentrations following feeding a maize gluten dietary protein in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 225(1-4), 133–147. doi:10.1016/s0044-8486(03)00285-0
- Miller, M. R., Nichols, P. D. & Carter, C. G. (2007). Replacement of fish oil with thraustochytrid *Schizochytrium* sp. L oil in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L) diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(2), 382–392. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.05.018
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., Mathieu, M., Picot, L., Bougaran, G. & Schoefs, B. (2012). The Potential of Microalgae for the Production of Bioactive Molecules of Pharmaceutical Interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(15), 2733–2750. doi:10.2174/138920112804724828
- Mozaffarian, D. & Rimm, E. B. (2006). Fish Intake, Contaminants, and Human Health. *JAMA*, 296(15), 1885. doi:10.1001/jama.296.15.1885
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O. & Jensen, I.-J. (2018). Protein Determination – Method Matters. *Foods*, 7 (1), 5. Doi:10.3390/foods7010005.
- National Research Council (NRC). 1993. *Nutrient requirements of fish*. Washington, D.C., National Academy Press.
- Nelson, D. M., Tréguer, P., Brzezinski, M. A., Leynaert, A. & Quéguiner, B. (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochemical Cycles*, 9(3), 359–372. doi:10.1029/95gb01070
- Norambuena, F., Hermon, K., Skrzypczyk, V., Emery, J. A., Sharon, Y., Beard, A. & Turchini, G. M. (2015). Algae in Fish Feed: Performances and Fatty Acid Metabolism in Juvenile Atlantic Salmon. *PLOS ONE*, 10(4). doi: 10.1371/journal.pone.0124042
- Norton, T. A., Melkonian, M. & Andersen, R. A. (1996). Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308–326. doi:10.2216/i0031-8884-35-4-308.1
- Olsen, R. L. (2017). Lipidkjemi: med vekt på fisk. Kompendium 4. utg. Tromsø: Universitetet i Tromsø.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E. & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037

- Peterson, B. C., Burr, G. S., Barrows, F. T., Block, S., Bowzer, J. & Buentello, A. (2019). Growth Performance of Atlantic Salmon Smolts Fed Diets Containing Heterotrophic Algal Biomass as Replacement of Fish Oil. *North American Journal of Aquaculture*, 81(4), 364–371. doi:10.1002/naaq.10104
- Preisig, H. R. & Andersen, R. A. (2005) Historical Review of Algal Culturing Techniques. *Algal Culturing Techniques*. 65, 79-82.
- Reimann, B. E. F. (1965). Studies on the Biochemistry and Fine Structure of Silica Shell Formation in Diatoms: I. The Structure of the Cell Wall of *Cylindrotheca fusiformis* Reimann and Lewin. *The Journal of Cell Biology*, 24(1), 39–55. doi:10.1083/jcb.24.1.39
- Round, F. E., Crawford, R. M. & Mann, D. G. (2007). *Diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge university press.
- SAM. (2017). *Food from the Oceans - How can more food and biomass be obtained from the oceans in a way that does not deprive future generations of their benefits?* (Scientific Opinion). Brussels: European Commission. doi:10.2777/067256
- Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) (2004). *Advice on fish consumption: benefits & risks*. Istituto Superiore di Sanit. ISBN 0 11 243083.
- Sargent, J. R., Tocher, D. R. & Bell, J. G. (2003). The Lipids. *Fish Nutrition*, 181–257. doi:10.1016/b978-012319652-1/50005-7
- Se-Kwon Kim. (2015). Handbook for Marine Microalgae. Biotechnology Advances. Publisher: Elsevier Science & Technology. Pukyong National University, Busan, South Korea. ISBN: 978 – 0 – 12 – 800776 – 1.
- 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
- Skretting (2018). Bærekraftsrapporten. Tilgjengelig fra: <https://www.skretting.com/siteassets/global-files/nuterra/sustainability-report-2018/skretting-sustainability-report-16-july.pdf> (Hentet 23.04.2020).
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101, 87-96.
- 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*, L.) post-smolts. *Food Chemistry*, 185, 413–421. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.150
- Stickney, R. R. & Hardy, R. W. (1989). Lipid requirements of some warmwater species. *Aquaculture*, 79(1-4), 145–156. doi:10.1016/0044-8486(89)90455-9
- Stoffel, W., Chu, F. & Ahrens, E. H. (1959). Analysis of Long-Chain Fatty Acids by Gas-Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 31(2), 307–308. doi:10.1021/ac60146a047
- Svenning, J. B., Dalheim, L., Eilertsen, H. C. & Vasskog, T. (2019). Temperature dependent growth rate, lipid content and fatty acid composition of the marine cold-water diatom *Porosira glacialis*. *Algal Research*, 37, 11–16. doi: 10.1016/j.algal.2018.10.009
- Sørensen, M., Berge, G. M., Reitan, K. I. & Ruyter, B. (2016). Microalga *Phaeodactylum tricorutum* in feed for Atlantic salmon (*Salmo salar*) —Effect on nutrient digestibility, growth and utilization of feed. *Aquaculture*, 460, 116–123. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.04.010
- Sørensen, M., Gong, Y., Bjarnason, F., Vasanth, G. K., Dahle, D., Huntley, M. & Kiron, V. (2017). Nannochloropsis oceanica-derived defatted meal as an alternative to fishmeal in Atlantic salmon feeds. *PloS one*, 12(7). doi: 10.1371/journal.pone.0179907

- Talbot, G. (2011). Saturated fats in foods and strategies for their replacement: an introduction. *Reducing Saturated Fats in Foods*, 3–28. doi:10.1533/9780857092472.1.3
- Torstensen, B. E., Lie, Ø. & Frøyland, L. (2000). Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)—Effects of capelin oil, palm oil, and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids*, 35(6), 653–664. doi:10.1007/s11745-000-0570-6
- Torstensen, B. E., Ruyter, B., Sissener, N., Østbye, T-K., Waagbø, R., Jørgensen, S. M., Ytteborg, E., Rud, I., Liland, N., Mørkøre, T. & Dessen, J-E. (2013). Utredning: Effekter av endret fettsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse, velferd og robusthet. Nofima og NIFES.
- Trainer, V. L., Hickey, B. M. & Bates, S. S. (2008). *Toxic diatoms*. Elsevier Science Publishers: New York, NY. 219-237. ISBN: 978- 0- 12- 372584- 4
- Turchini, G. M., Gunasekera, R. M. & De Silva, S. S. (2003a). Effect of crude oil extracts from trout offal as a replacement for fish oil in the diets of the Australian native fish Murray cod *Maccullochella peelii peelii*. *Aquaculture Research*, 34(9), 697–708. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00870.x
- Turchini, G. M., Torstensen, B. E. & Ng, W.-K. (2009). Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 10–57. doi:10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x
- Venugopal, V. & Shahidi, F. (1996). Structure and composition of fish muscle. *Food Reviews International*, 12(2), 175–197. doi:10.1080/87559129609541074
- Villareal, T. A. & Fryxell, G. A. (1983). Temperature effects on the valve structure of the bipolar diatoms *Thalassiosira antarctica* and *Porosira glacialis*. *Polar Biology*, 2(3), 163–169. doi:10.1007/bf00448966
- Volkman, J. & Brown, M. (2005). Nutritional value of microalgae and applications. *Algal cultures, analogues of blooms and applications*, 407-457.
- Von Quillfeldt, C. H. (2000). Common Diatom Species in Arctic Spring Blooms: Their Distribution and Abundance. *Botanica Marina*, 43(6), 499-516. doi:10.1515/bot.2000.050
- Waagbø, R., Sandnes, K., Torrissen, O. J., Sandvin, A. & Lie, Ø. (1993). Chemical and sensory evaluation of fillets from Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed three levels of N-3 polyunsaturated fatty acids at two levels of vitamin E. *Food Chemistry*, 46(4), 361–366. doi:10.1016/0308-8146(93)90005-z
- Wilson, R. P. (2003). Amino Acids and Proteins. *Fish Nutrition*, 143–179. doi:10.1016/b978-012319652-1/50004-5
- Yeannes, M. I. & Almandos, M. E. (2003). Estimation of fish proximate composition starting from water content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(1), 81–92. doi:10.1016/s0889-1575(02)00168-0
- Ytrestøl, T., Aas, T. S. & Åsgård, T. (2015). Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Aquaculture*, 448, 365–374. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.06.023
- Yu, T. C., Sinnhuber, R. O. & Putnam, G. B. (1977). Effect of dietary lipids on fatty acid composition of body lipid in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 12(6), 495–499. doi:10.1007/bf02535448

