



UiT Norges arktiske universitet

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi – Norges fiskerihøgskole

Mel av grisetang og mikroalger til bruk i fiskefôr?
Kjemisk sammensetning og *in vitro* fordøyelse av protein.

Rikke Otting Sommerlund
Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap FSK- 3960 (60 stp.) mai 2022

Mel av grisetang og mikroalger til bruk i fiskefôr?
Kjemisk sammensetning og *in vitro* fordøyelse av protein.

Rikke Otting Sommerlund

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp.)

Norges fiskerihøgskole
Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi
UiT, Norges arktiske universitet

Tromsø
mai 2022



UiT / NORGES ARKTISKE
UNIVERSITET

Forord

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved Norges fiskerihøgskole, Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, UiT Norges arktiske universitet. Oppgaven markerer slutten på fem lærerike år som student, og i den forbindelse er det mange som fortjener en takk.

Jeg ønsker først og fremst å takke professor emeritus Ragnar Ludvig Olsen for enestående veiledning gjennom dette studieåret. Ditt engasjement, din tålmodighet, alltid åpne dør og rause deling av kunnskap har vært svært inspirerende og helt avgjørende for denne oppgaven. Jeg ønsker også å takke min biveileder professor Edel O. Elvevoll for gode innspill. Overingeniør Guro Kristine Edvinsen og overingeniør Tone Friis Aune fortjener også en stor takk for god opplæring og oppfølging på lab. Jeg ønsker også å takke senioringeniør Ida Kristine Østnes Hansen som gjorde gjennomføringen av UHPLC MS mulig. I tillegg ønsker jeg å takke direktør Mads Martinsen i Skretting som bidro med fiskemel til masteroppgaven.

Takk til mine flotte medstudenter som har bidratt med mye latter, gode minner, nye vennskap og faglig kunnskap gjennom fem år. Sist, men ikke minst ønsker jeg å takke venner og familie for all støtte gjennom årene som student.

Rikke Otting Sommerlund

Tromsø, mai 2022

Sammendrag

Etterspørselen etter fisk og skalldyr globalt er stadig økende. Økt kjøpekraft og anbefalinger om å spise mer sjømat har bidratt betydelig til dette. De fleste villfiskbestander er allerede maksimalt utnyttet og økningen i produksjonen har i de siste 30 årene derfor utelukkende kommet fra oppdrett. I dag produseres mer fisk til humant konsum i oppdrett enn hva som høstes av villfisk.

En av de største utfordringene med den økende akvakulturproduksjonen er tilgangen på næringsrike og bærekraftige fôrråstoffer. I 1990 inneholdt laksefôret i Norge 65% protein fra marine kilder, hovedsakelig fiskemel. På grunn av den begrensede tilgang på fiskemel hadde dette i 2016 forandret seg til 40% planteprotein og bare 14% marine proteiner. Formålet med denne oppgaven var å undersøke om mel av mikroalgene *Porosira glacialis*, *Chlorella vulgaris* og *Odontella aurita*, og makroalgen grisetang (*Ascophyllum nodosum*) kan være alternative proteinråstoffer i fiskefôr.

Proteininnholdet i algemelene var lavere sammenlignet med fiskemelet (51,3%) noe som i utgangspunktet gjør de mindre egnet som proteiningredienser. Mel av grønnalgen *C. vulgaris* hadde et innhold på 38,1%, mens mel av kiselalgene *P. glacialis* og *O. aurita* inneholdt henholdsvis 17,9 og 16,2% protein. Grisetangmel hadde et proteininnhold på kun 4,3%. Fiskemel hadde høyest innhold av de viktige essensielle aminosyrene lysin og metionin. Av algemelene var det *P. glacialis* som hadde høyest innhold av disse aminosyrene, til sammen cirka 73% av mengden i fiskemel. Mel av *P. glacialis* og fiskemel hadde likt fettinnhold (11-12%) og bare disse to er å regne som gode kilder til langkjedede omega-3 fettsyrer. Det lave proteininnholdet gjør likevel at en må tredoble mengden *P. glacialis* i fiskefôr for å oppnå samme proteininnhold som i fiskemel. Høyt innhold av aske og ufordøyelige karbohydrater gjør det også problematisk å inkludere store mengder av algemel i fôret.

In vitro fordøyelse med pepsin og pankreatin viste at protein i mikroalgemelene, spesielt *P. glacialis*, ble brutt ned nesten like effektivt som fiskemel. I magefasen dannes det et relativt høyt antall større peptider (500 – 5000 Da) som ble brutt ned til mindre forbindelser i tarmfasen. Grisetang hadde lavest proteinkvalitet av de undersøkte produktene. Melet hadde et lavt proteininnhold, lav andel essensielle aminosyrer og proteinfordøyelighet, og er derfor lite egnet som et alternativt proteinråstoff.

Summary

The global demand for fish and shellfish is constantly increasing. This is mainly due to increased purchasing power and recommendations to eat more seafood. Wild fish stocks are maximally utilized or overexploited and the increase in production over the last 30 years has therefore exclusively come from the farming industry. Today, more fish is produced for human consumption in aquaculture than what is harvested from wild fish stocks.

One of the biggest challenges with the increasing aquaculture production is the supply of nutrient-rich sustainable feed ingredients. In 1990, salmon feed in Norway contained 65% proteins from marine sources, mainly fishmeal. Due to the limited supply of fishmeal, this had in 2016 changed to 40% plant proteins and only 14% marine proteins. The purpose of this thesis was to investigate whether meal of the microalgae *Porosira glacialis*, *Chlorella vulgaris* and *Odontella aurita* and the macroalga *Ascophyllum nodosum* can be alternative protein ingredients in fish feed.

The protein content of the algae meals were lower than in fishmeal (51.3%), which make them less suitable as protein ingredients in feed. Meal of the green microalga *C. vulgaris* had a content of 38.1%, while the diatoms *P. glacialis* and *O. aurita* contained 17.9 and 16.2% protein, respectively. Meal of *Ascophyllum nodosum* had a protein content of only 4.3%. Fishmeal had the highest content of the important essential amino acids lysine and methionine. Among the algal meals, *P. glacialis* had the highest content of these amino acids, about 73% of the amount in fishmeal. Meal of *P. glacialis* and fishmeal had the same fat content (11-12%) and are the only ones considered to be good sources of long-chain omega-3 fatty acids. The low protein content still means that one must triple the amount of *P. glacialis* in fish feed to achieve the same protein content as in fishmeal. In addition, ash and indigestible carbohydrates prohibit inclusion of large amounts of algal meal in the feed.

In vitro digestion with pepsin and pancreatic enzymes showed that proteins in the microalgae meals, especially meal of *P. glacialis*, were broken down almost as efficiently as fishmeal. In the gastric phase, a relatively high number of larger peptides (500 - 5000 Da) are formed which further were broken down into smaller compounds in the intestinal phase. *Ascophyllum nodosum* had the lowest protein quality of the products examined. The meal had a low protein content, low proportion of essential amino acids and poor protein digestibility. It is therefore unsuitable as an alternative protein ingredient in fish feed.

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon.....	1
1.1	Alternative proteinråstoffer til fiskefôr.....	4
1.2	Proteinkvalitet.....	9
1.3	Proteinfordøyelse	10
2	Materialer og metoder	13
2.1	Materialer (råstoff).....	13
2.2	Kjemikalier	13
2.3	Metoder	14
2.3.1	Frysetørring	14
2.3.2	Vann- og askeinnhold	14
2.3.3	Aminosyre- og proteininnhold	15
2.3.4	Lipidekstraksjon.....	15
2.3.5	Fettsyresammensetning.....	16
2.3.6	Fettsyremengder i melproduktene.....	17
2.3.7	Karbohydratinnhold	17
2.3.8	TCA-løselige peptider.....	17
2.3.9	Molekylvektfordeling under GI-fordøyelse studert med UHPLC MS.....	18
2.3.10	Hydrolysegrad med OPA-metoden	19
2.4	<i>In vitro</i> fordøyelse av protein.....	20
2.4.1	<i>In vitro</i> gastrointestinal fordøyelse av protein i melprodukter.....	20
2.4.2	Pepsinfordøyelse (24 timer).....	21
2.4.3	Pepsinfordøyelse med ulike konsentrasjoner av pepsin.....	21
2.4.4	Tarmfordøyelse av varmebehandlet fiskemel	21
3	Resultater.....	22
3.1	Kjemisk sammensetning	22
3.2	Aminosyresammensetning.....	22
3.3	Fettsyresammensetning og fettsyremengder.....	23
3.4	Innledende forsøk. <i>In vitro</i> GI-fordøyelse	26
3.4.1	Magesekkkfordøyelse	26
3.4.2	Magesekkkfordøyelse – ulike konsentrasjoner av pepsin.....	27
3.4.3	Tarmfordøyelse	29

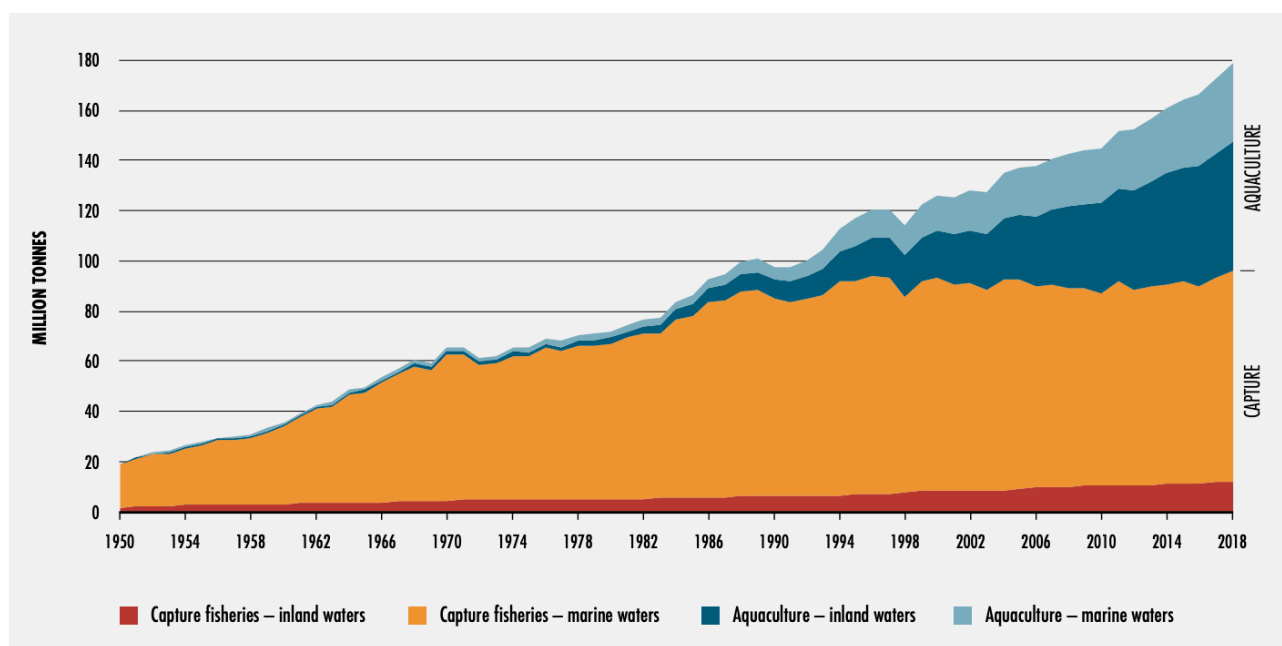
3.4.4	Mage og tarmfordøyelse	29
3.5	<i>In vitro</i> gastrointestinal fordøyelse	31
3.6	Molekylvektsfordeling under GI-fordøyelse studert med UHPLC MS.....	35
3.7	Hydrolysegrad med OPA-metoden.....	38
4	Diskusjon.....	39
5	Konklusjoner	45
6	Referanseliste	46

Forkortelser

AA	Aminosyre
ALA	α -linolensyre (18:3n-3)
BSA	Bovine serum albumin
Da	Dalton
DHA	Dokosaheksaensyre (22:6n-3)
DPA	Dokosapentaensyre (22:5n-3)
EPA	Eiksopentaensyre (20:5n-3)
FC	Folin & Ciocalteus
FF	Fortynningsfaktor
GI	Gastrointestinal
ID	Ikke detektert
IS	Internstandard
LA	Linolsyre (18:2n-6)
LC-PUFA n-3	Langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer
M.A.C.R.	Modifisert alkalisk koppperagens
mt	Millioner tonn
MUFA	Enumettede fettsyrer
nm	Nanometer
OPA	O-Phthaldialdehyd
PBS	Fosfatbufret saltvann
PUFA	Flerumettede fettsyrer
rpm	Rotasjoner per minutt
SDA	Stearidonsyre (18:4n-3)
SFA	Mettede fettsyrer
TCA	Trikloreddiksyre
TE	Tyrosin ekvivalent
UHPLC MS	Ultra-high-performance væskekromatograf med massespektrograf
Å	Ångstrøm

1 Introduksjon

Fisk og skalldyr er ettertraktet mat. Fra 1984 til 2018 steg det årlige forbruket i verden fra cirka 12 kg til nesten 21 kg per person. Dette til tross for at befolkningen økte fra 6 til omtrent 7,5 milliarder i samme periode (FAO, 2020). Årlig fangst av fisk og skalldyr på verdensbasis har vært ganske stabil de siste 30 årene på ca. 90 - 92 millioner tonn (figur 1). Økningen i forbruket har nesten utelukkende kommet fra oppdrett. I 2018 gikk ca. 74 millioner tonn (mt) villfisk til humant konsum, mens i oppdrett ble det produsert 82 millioner tonn til menneskemat (FAO, 2020). De siste 10 årene har cirka 20 – 25 mt av den villfangede fisken ikke blitt brukt til menneskemat, men hovedsakelig til produksjon av fiskemel og fiskeolje (FAO, 2020). Dette har ført til at rundt 6 mt fiskemel og 1 mt fiskeolje har vært tilgjengelig årlig (Tacon *et al.*, 2011). Volumet pelagisk fisk brukt i slik produksjon vil antakelig bli redusert i fremtiden blant annet fordi en større andel av disse fiskeslagene vil bli brukt direkte til humant konsum (Olsen & Hasan, 2012).



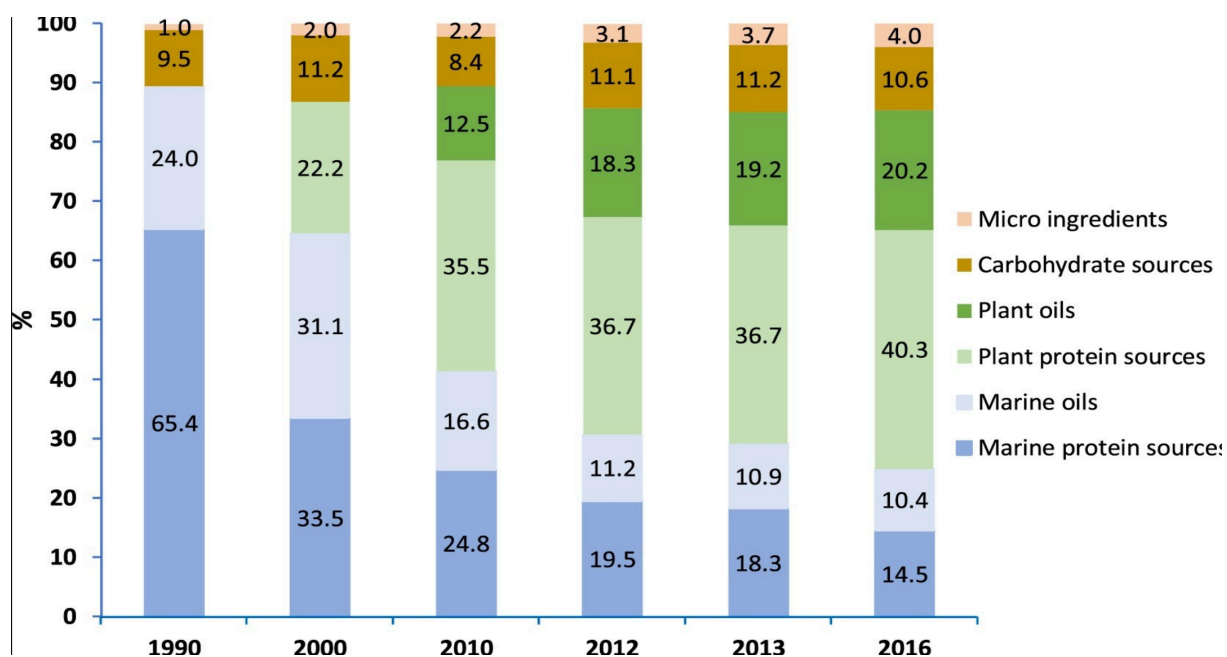
Figur 1: Villfanget fisk og akvakulturproduksjon i verden (FAO, 2020).

Det er anslått at det vil fortsette å være en økende etterspørsel av fisk de kommende årene. (I denne masteroppgaven innebærer begrepet fisk og skalldyr fra både ferskvann og hav). Endring i den sosiale strukturen med flere i middelklassen er forventet som en direkte effekt av

høyere gjennomsnittslønn (Kharas, 2017), og klare anbefalinger fra helsemyndighetene om å spise mer sjømat påvirker etterspørselen positivt (Kris-Etherton *et al.*, 2009; Rimm *et al.*, 2018).

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) har slått fast at majoriteten av verdens villfiskbestander nå er maksimalt utnyttet eller overbeskattet (FAO, 2020). Derfor må økningen i produksjon av fisk og skalldyr komme fra akvakulturnæringen. Det er ikke bare marin og anadrom fisk i oppdrett som får fiskemel inkludert i formulert fôr, men også ferskvannsfisk som for eksempel karper og tilapia. Samtidig har også andelen ferskvannsfisk som får formulert fôr økt (Olsen & Hasan, 2012). I figur 1 kommer det også tydelig fram at volumet av ferskvannsfisk produsert i oppdrett er betydelig høyere enn fisk oppdrettet i havet. Viktige årsaker til at fiskemel er en ettertraktet ingrediens i oppdrettsfôr er det høye proteininnholdet med en god sammensetning av essensielle aminosyrer, god fordøyelighet og gode smak. I tillegg kommer blant annet innhold av lipider, inkludert fosfolipider, som inneholder langkjedede omega-3 fettsyrer (Olsen & Hasan, 2012).

Mangelen på fiskemel og fiskeolje til bruk i fôr til den sterkt voksende akvakulturnæringen er godt illustrert i utviklingen av laksefôr i Norge de siste 25-30 årene (figur 2). Marine ingredienser har gradvis blitt erstattet med plantebaserte produkter. I 1990 inneholdt fôret 65,4% fiskemel og 24% fiskeolje, mens stivelse og mikroingredienser utgjorde henholdsvis 9,5 og 1,0% (Aas *et al.*, 2019). I 2016 utgjorde proteinråstoffene 64,8% hvorav 40,3% kom fra plantekilder og bare 14,5% fra marine proteinkilder, hovedsakelig fiskemel fra pelagisk fisk, men også noe mel fra fiskeavskjær og andre restråstoffer (Aas *et al.*, 2019). Planteproteinene er hovedsakelig soyaproteinkonsentrat og hvetegluten, og mindre mengder andre planteproteinråstoffer som for eksempel mais gluten og solsikkemel. I 2016 inneholdt fôret 30,6% olje hvor to tredjedeler var planteolje, hovedsakelig rapsolje som ikke inneholder langkjedede flerumettede omega-3 fettsyrer (LC-PUFA n-3), mens resten var fiskeolje.



Figur 2: Sammensetningen (%) i laksefôr i Norge fra 1990 til 2016 (Aas *et al.*, 2019).

Bruken av store mengder plantebaserte råvarer i fiskefôr har imidlertid fått mye kritikk. Produksjonen av soyabønner har mer enn tredoblet seg siden 1980 - tallet og har økt fra omkring 100 millioner til 350 millioner tonn i 2020. På starten av 2000 - tallet var USA den klart største produsenten av soyabønner, men i dag er Brasil på god vei til å bli verdens største produsent. Økningen i produksjonen har ført med seg en betydelig avskoging av regnskog med de bekymringene dette har for klimautviklingen. I Brasil har regnskogen blitt redusert med en størrelse på 2,5 ganger arealet av det norske fastlandet siden 1980 – tallet (Gjøsund *et al.*, 2020). I tillegg kommer det negative med å bruke landarealer velegnet til matproduksjon for å produsere fôringsstoffer. Når det er sagt er det imidlertid nødvendig å huske at det kun er rundt 4% av fôringsredienser fra landbruk (kraftfôr) i verden som blir brukt i akvakulturnæringen, mens 40% går til fjærfe, 30% til gris og 25% til drøvtyggere (Troell *et al.*, 2014). Både akvakulturproduksjon og fangst av villfisk generer et betydelig lavere karbonavtrykk (klimagassutslipp) enn produksjon av storfe i landbruket (Gephart *et al.*, 2021; Poore & Nemecek, 2018). Transport av råvarene (fôringsredienser) over lange distanser og drivstofforbruk ved fiske utgjør en stor del av karbonavtrykket i sjømatnæringen. En av de største utfordringene ved den økende produksjon av fisk og skalldyr i oppdrett er altså tilgangen på fôringsredienser, hovedsakelig protein og olje, for å kompensere for mangel på fiskemel og fiskeolje. I Norge er det også som nevnt ovenfor et ønske om å redusere bruken av importert soya fra Sør-Amerika og andre landplanter dyrket på arealer som kan brukes til matproduksjon.

1.1 Alternative proteinråstoffer til fiskefôr

En rekke alternative proteinråstoffer har blitt foreslått til bruk i fiskefôr, og i Norge har det naturlig nok vært mest søkelys på råstoff til bruk i laksefôr (Albrektsen *et al.*, 2022; Gjørund *et al.*, 2020; Olsen & Hasan, 2012). Det er i midlertidig flere kriterier som må være tilfredsstillende før et mulig proteinråstoff er av kommersiell interesse hos en fôrprodusent:

- Råstoffet bør foreligge i tørket form (mel) eller i det minste ha et vanninnhold på mindre enn 45-50% (Olsen & Toppe, 2017). Årsaken er knyttet til lagringsmulighet og stabilitet, og at kommersielt formulert fôr produseres som tørrfôr (Olsen & Hasan, 2012).
- Fôringrediensen må være tilgjengelig hele året og produseres i store kvanta (Albrektsen *et al.*, 2022). Sistnevnte illustreres blant annet ved at prisen på fiskemel oppgis per tonn. Prisen på fiskemel har i hovedsak variert mellom 1 200 og 1 500 US \$ per tonn de siste 10 årene (Acién Fernández *et al.*, 2021; Olsen & Hasan, 2012).
- Prisen på proteinråstoffet bør ikke være betydelig dyrere enn de som benyttes i dag. Fôret er den største utgiften, og står for opp mot 70% av de totale produksjonskostnadene i havbruksnæringen (Brambilla & Filippis, 2005).
- Høy proteinkvalitet: Høyt proteininnhold, høyt innhold av essensielle aminosyrer, og fri for antinæringsstoffer eller andre stoffer som reduserer proteinfordøyelsen eller hemmer opptak av fordøyd protein (Albrektsen *et al.*, 2022).

Foreslåtte mulige proteinråstoffer:

1. **Restråstoff fra prosessering av fisk og bifangst som ikke kan brukes til menneskemat.** Under sløyning og videreforedling oppstår det en rekke restråstoffer. I 2020 ble 85% (ca. 861 000 tonn) av alt restråstoff fra norsk fiskeri- og havbruksnæring utnyttet. Mesteparten, 576 000 tonn, ble utnyttet til fôr enten ved tradisjonell fiskemel og oljeproduksjon eller ved ensilering (Myhre *et al.*, 2021). Det er i hvitfisksektoren at potensialet for økt utnyttelse er størst, spesielt i den havgående flåten, og totalt ble det estimert at 123 000 tonn restråstoff i denne sektoren ikke ble utnyttet i 2020 (Myhre *et al.*, 2021). Dersom man antar et vanninnhold på 80% i restråstoffet, vil dette gi cirka

27 000 tonn fiskemel (10% vann). Den havgående flåten er langt fra land og fisken blir derfor prosessert om bord før innfrysing. Uten tilgjengelig teknologi eller plass blir en stor andel av det som kunne vært utnyttet (slo, rygger og hoder), kastet over bord. Produksjonen av fiskemel og fiskeolje fra restråstoff har imidlertid økt de siste årene, fordi nyere norske fartøyer som bygges har lagt til rette for slik utnyttelse. I 2020 ble det produsert nesten 4 000 tonn mel og vel 800 tonn fiskeolje fra restråstoff i den havgående flåten (Myhre *et al.*, 2021). Restråstoff fra ombordproduksjon må kunne karakteriseres som «lavt hengende frukt» med hensyn på framstilling av fôrråstoffer.

2. Biprodukter fra prosessering av varmblodige landdyr.

Slakting av varmblodige dyr og fjærkre genererer en stor andel restråstoff (Gjøsund *et al.*, 2020), og mel av slike restråstoffer regnes å ha god ernæringsmessig kvalitet til bruk i fôr (Olsen & Hasan, 2012). Epidemien med «kugalskap» i 1986 førte imidlertid til at det ble forbudt å bruke animalske proteiner (mel) i fôr grunnet frykt for overføring av prioner som kan gi opphav til spongiforme encefalopatii («hjernesvinn») hos mennesker og dyr (Woodgate *et al.*, 2022). I 2013 kom det en ny lovgivning som igjen gjorde det lovlig å bruke såkalt kategori 3 biprodukter i fôr til dyr. I akvakulturproduksjon i Europa gjelder dette for prosessert animalsk protein fra dyr som ikke er drøvtyggere (Woodgate *et al.*, 2022). Animalske biprodukter (hovedsakelig fra fjærkre) har blitt brukt i laksefôr i Chile og Canada i mange år. Lakseproduserende land i Europa har til tross for at forbudet ble opphevet valgt å ikke inkludere slike råvarer i fôret. Grunnen til dette er ikke sikker, men det kan ha sammenheng med god tilgang til fiskemel og andre proteinkilder, og lav konsumentaksept for bruk av slike fôrråstoffer (Albrektsen *et al.*, 2022).

3. Høsting på lavere trofiske nivåer (krill, raudåte og mesopelagisk fisk).

På lavere trofiske nivåer er det høy biomasse av organismer av ernæringsmessig god kvalitet (Olsen *et al.*, 2020). Den marine kopepoden raudåte (*Calanus finmarchicus*) og Antarktisk krill (*Euphausia superba*) har vist høyt potensiale for å kunne delvis erstatte fiskemel i fôr til flere arter (Albrektsen *et al.*, 2022; Olsen & Hasan, 2012). Forsøk med reker og laks har vist at små mengder krillmel tilsatt i fôret har positiv effekt på vekst, sannsynligvis som smaksattraktant (Hatlen *et al.*, 2017; Nunes *et al.*, 2019). Begge

artene høstes med trål for primært å produsere oljer rik på langkjedede omega-3 fettsyrer til bruk som kosttilskudd for mennesker. Sannsynligvis er kostnadene med høsting og prosessering av slike dyreplankton for store til at de kan brukes som et generelt proteinråstoff (Olsen & Hasan, 2012). Dyreplankton som krill og raudåte er nøkkelarter i næringskjeden i havet og høsting må derfor gjøres med stor forsiktighet for ikke å påvirke mattilgangen til fisk, sjøpattedyr og sjøfugl negativt. I tillegg kan tråling etter dyreplankton føre til bifangst av fiskeyngel og kontrollen ved slik høsting må derfor være god.

Mesopelagisk fisk er ofte en blanding av små fiskearter og virvelløse dyr (<10 cm), som hovedsakelig lever i den mesopelagiske sonen, 200 – 1000 meters dyp (Olsen *et al.*, 2020). Her migrerer de ofte opp i vannsøylen gjennom natten og ned igjen på dagtid (Gjøsæter & Kawaguchi, 1980). Biomassen av mesopelagisk fisk globalt sett er estimert til å være på hele 6 til 10 billioner tonn (Irigoiien *et al.*, 2014), noe som tilsvarer opp til 100 ganger den årlige fangsten i tradisjonelle fiskerier (Alvheim *et al.*, 2020). Kommersiell utnyttelse av mesopelagisk fisk til for eksempel fiskefôr, er fortsatt begrenset grunnet tekniske utfordringer knyttet til fangst, prosessering og manglende kunnskap om bærekraftig høsting av ressursen (Albrektsen *et al.*, 2022). Størrelsen på disse mesopelagiske artene og at flere inneholder fett i form av voksesterer (Olsen *et al.*, 2020) har gjort at de til nå ikke har vært aktuelle som menneskemat.

4. Insektsmel.

Interessen for insektsmel, egentlig mel av insektslarver, til bruk i fôr til akvakultur har de siste årene vært økende (Hua *et al.*, 2019; Llagostera *et al.*, 2019). I 2017 godkjente den Europeiske Unionen prosessert insektsprotein (f.eks. insektsmel) fra syv insektarter til bruk i akvakultur (Mattilsynet, 2017). Sort soldatflue (*Hermetia illuscens*), husflue (*Musca domestica*) og gul melbille (*Tenebrio molitor*) er de mest undersøkte artene (Hua *et al.*, 2019). I dag produseres insektslarvene til fôr i Europa hovedsakelig på landbruksavfall fra produksjon av frukt, grønnsaker og korn (Gjøsund *et al.*, 2020), men det er også tillatt å bruke fiskemel, blodmel fra ikke-drøvtyggere, egg og meieriprodukter (Mattilsynet, 2017). Det er så langt ikke lov å fôre larvene med matavfall fra husholdninger. Det er vist til suksess ved inkludering av insektsmel i fôr til Atlantisk laks (Belghit *et al.*, 2019), likevel er det også studier som har vist til redusert

appetitt og vekst hos fisk som har fått dette inkludert i fôret (Kroeckel *et al.*, 2012; Reyes *et al.*, 2020). Til tross for store fremskritt innen forskning med bruk av insektsmel, er ikke dagens tilgjengelige mengder tilstrekkelig for omfattende bruk av insektsmel i akvakulturfôr (Aas *et al.*, 2022). Det er også behov for økt kunnskap knyttet til prosessering og automatisering av insektsproduksjon (Albrektsen *et al.*, 2022). Prisen på insektsmel er i dag betydelig høyere enn prisen på fiskemel (Gjøsund *et al.*, 2020).

5. Mikrobielle proteinråstoffer («Single cell proteins»).

Bakterier, sopp (gjær) og mikroalger har vært foreslått som proteinråstoff til bruk i oppdrettsfôr (Glencross *et al.*, 2020; Tacon *et al.*, 2006). Slik mikrobiell biomasse kan produseres på flere måter. Det enkleste og billigste alternativet er biomasse i form av biprodukt fra industrielle gjæringsprosesser som spritproduksjon eller ved ølbrygging. Flere studier ha vist at slik gjærbiomasse kan brukes i fôr til fisk (Ferreira *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Oliva-Teles & Gonçalves, 2001; Webster *et al.*, 1992). Alternativt kan bakteriell biomasse produseres ved å bruke et ganske billig organisk karbonsubstrat, for eksempel metan (naturgass) og nyttes til fiskefôr (Øverland *et al.*, 2010; Aas *et al.*, 2006). Kostnadene ved å produsere en bakteriell biomasse basert på naturgass er relativt høye (Olsen & Hasan, 2012), og så vidt jeg vet så foregår det i dag ingen kommersiell produksjon rettet mot fôrproduksjon.

Industriell produksjon av mikroalger for bruk i fiskefôr er et tema som har vært forsket en god del på de siste årene (Beal *et al.*, 2018; Cerri *et al.*, 2021; De Cruz *et al.*, 2018; Nagappan *et al.*, 2021; Tibbetts *et al.*, 2017; Yarnold *et al.*, 2019). Mikroalger er en stor gruppe mikroorganismer som er primærprodusenter i akvatisk miljø, og med svært ulike levestrategier. Heterotrofe mikroalger kan vokse i mørket på et organisk karbonsubstrat, for eksempel glukose, mens autotrofe (fotoautotrofe) mikroalger bruker lys som energikilde og CO₂ som karbonkilde slik som andre fotosyntetiserende planter. Kostnader ved industriell produksjon av heterotrofiske mikroalger er vanligvis høyere grunnet behovet for organisk vekstsubstrat enn produksjon av autotrofe mikroalger (Acién Fernández *et al.*, 2021). Autotrofe mikroalger deles gjerne inn i to grupper: grønnalger med en cellevegg bestående av ufordøyelige polysakkarider, og kiselalger (diatomeer) med et kiseskall som er bygd opp av silisium. Diatomeer er den største gruppen av mikroalger i det akvatiske miljø og mer enn 12 000 arter har så langt blitt

identifisert (Svenning, 2020). Autotrofe mikroalger kan produseres i åpne dammer med god tilgang på sollys, eller i lukkede tanker eller rørsystemer med kunstig lys. Så langt er det relativt små volumer (< 500 tonn/år) med alger som blir produsert på verdensbasis og det er produksjon i åpne dammer som dominerer. Anvendelsen er primært til helsekostprodukter, spesialfôr og kosmetikk (Acién Fernández *et al.*, 2021). Høyt askeinnhold og høye produksjonskostnader gjør det utfordrende å bruke mikroalgemel som proteinkilde i fôr, og kostnadene må derfor reduseres (Olsen & Hasan, 2012). Prisen varierer på mellom 15 og 25 €/kg, til sammenligning ligger prisen til fiskemel på rundt 1,5 €/kg, og soyaprodukter har en pris på rundt 0,5 €/kg (Acién Fernández *et al.*, 2021).

6. Makroalger.

Akvatiske planter, i all hovedsak marine makroalger (tang og tare), produseres særlig i Asia, men produksjonen i Norge er også økende (Biancarosa *et al.*, 2017). I 2018 ble det høstet 32,4 millioner tonn globalt, hvor av mesteparten (97,1%) ble oppdrettet (FAO, 2020). Fordelene med utnyttelse av makroalger er at de har høy veksthastighet og er ikke avhengig av ferskvann, landarealer eller gjødsling. Anvendelsen er primært fersk eller tørket til humant konsum og for utvinning av marine polysakkarider som karragenan, agar og alginater til bruk i matvarer (Albrektsen *et al.*, 2022). Algene deles normalt inn i tre hovedgrupper; brunalger (*Phaeophyta*), grønnalger (*Chlorophyta*) og rødalger (*Rhodophyta*). En ulempe i førsammenheng er at makroalger har et lavt proteininnhold på tørrstoffbasis; brunalger 2,4 til 16,8%, grønnalger 3,2 til 35,2% og rødalger 6,4 til 37,6% (Øverland *et al.*, 2018). Innholdet av aske og ufordøyelige polysakkarider i alle tre gruppene er derimot høyt, henholdsvis fra 11 til 55% og fra 15 til 66% avhengig av art. Alt dette bidrar til at mel av makroalger antakelig er lite egnet som proteinråstoff i fiskefôr, som beskrevet av flere (Angell *et al.*, 2016; Fleurence, 1999; Mæhre *et al.*, 2014; Øverland *et al.*, 2018). En mulighet kan være å ekstrahere og konsentrere protein fra makroalger (Harnedy & FitzGerald, 2013; Mæhre *et al.*, 2014; Øverland *et al.*, 2018), men dette er noe som sannsynligvis vil gjøre proteinet for dyrt for bruk i fôr.

1.2 Proteinkvalitet

Proteiner er helt sentrale i vekst, utvikling og funksjon av organer og vev, og har et mangfold av roller i kroppen. Eksempler er enzymer, strukturelle proteiner som kollagen, de kontraktile muskelproteiner som aktin og myosin, transportproteiner som lipoproteiner, hormoner som insulin og forsvarsproteiner som antistoffer (immunglobuliner). Proteinene syntetiseres i organismen med utgangspunkt i 20 forskjellige aminosyrer. Oftest regner man med at 10 av aminosyrene er essensielle, det vil si at dyr, inkludert fisk, ikke er i stand til å syntetisere dem selv, men må få de tilført gjennom kosten (tabell 1). De ikke-essensielle aminosyrene kan organismen syntetisere selv, likevel betraktes noen av de som betinget essensielle, fordi de syntetiseres direkte fra essensielle aminosyrer.

Tabell 1: Oversikt over essensielle og ikke essensielle aminosyrer hos dyr og fisk. Modifisert fra Nelson og Cox (2000).

Essensielle og ikke essensielle aminosyrer hos dyr og fisk	
Essensielle	Ikke-essensielle
Arginin	Alanin
Histidin	Asparaginsyre
Isoleucin	Asparagin
Leucin	Glutaminsyre
Lysin	Glutamin
Metionin	Cystein
Fenylalanin	Tyrosin
Treonin	Glycin
Tryptofan	Prolin
Valin	Serin

Aminosyren tyrosin lages med utgangspunkt i fenylalanin, og cystein dannes av metionin. I oversikter over anbefalte mengder essensielle aminosyrer er derfor summen tyrosin og fenylalanin, og cystein og metionin oppført (Damodaran, 1996). Behovet for essensielle aminosyrer er størst i organismer som vokser, og ved for liten mengde i kosten kan veksten reduseres og helsa svekkes. Hos voksne pattedyr blir aminosyren arginin regnet som ikke-essensiell fordi den kan lages i ureasyklusen når overskudd av nitrogen skilles ut i form av urea. Hos voksende individer er den essensiell fordi behovet er så stort (Nelson & Cox, 2000). Hos fisk regnes arginin som essensiell fordi fisk ikke har en fungerende ureasyklus. Overskuddsnitrogen skilles ut som ammoniakk, ikke som urea (Espe *et al.*, 2001). Proteinråstoff fra fisk og dyr er av god kvalitet grunnet et høyt innhold av essensielle

aminosyrer. Planteproteiner er gjerne av lavere kvalitet på grunn av at mengden lysin og- /eller metionin oftest er lav (Damodaran, 1996).

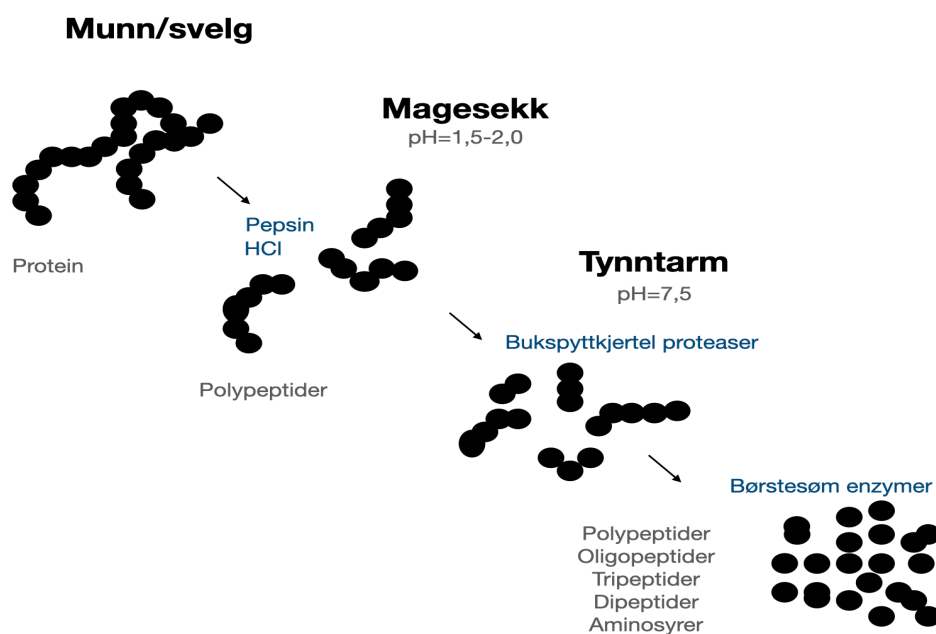
I tillegg til innholdet av essensielle aminosyrer er også fordøyeligheten til protein av betydning for proteinkvaliteten. Fordøyeligheten påvirkes blant annet av proteinets struktur. Delvis denaturerte proteiner vil være lettere å bryte ned enn ikke-denaturerte («native») proteiner. I tillegg vil fibrøse og svært denaturerte globulære proteiner være vanskelige å fordøye. En annen faktor som er av betydning, er mengden antinæringsstoffer. Slike stoffer, som i hovedsak finnes i planter, kan redusere proteinfordøyeligheten og derved tilgjengeligheten av aminosyrer og peptider (Damodaran, 1996). Høye nivåer har vist å kunne redusere fordøyeligheten med opptil 50% (Gilani *et al.*, 2005). Eksempler på antinæringsstoffer i planter er ifølge Damodaran (1996) hemmere av fordøyelsesenzymene trypsin og chymotrypsin, og lektiner som binder seg til karbohydratmolekyler på celleoverflaten til tarmcellene og hemmer opptak av for eksempel aminosyrer. Disse antinæringsstoffene er proteiner som i ganske stor grad vil inaktiveres (denatureres) ved varmebehandling. Et større problem i førsammenheng er de varmestabile antinæringsstoffene som fytinsyre som hemmer opptak av mineraler og polyfenoler (for eksempel tanniner) som binder seg til proteiner og gjør det vanskelig for fordøyelsesenzymene å virke. Ufordøyelige polysakkarider (kostfiber) vil også binde seg til proteiner og gjøre at fordøyelsesenzymene virker dårligere. Antinæringsstoffer vil imidlertid være et mindre problem dersom proteinene isoleres før de blir brukt i fôr. For eksempel brukes ikke soyamel i laksefôr, men soyaproteinkonsentrat.

1.3 Proteinfordøyelse

I fordøyelsen hydrolyseres proteiner ved hjelp av enzymer til mindre forbindelser; di- og tripeptider og frie aminosyrer, som kan absorberes i tarmcellene (mucosacellene). Den enzymatiske nedbrytning av protein starter i magesekken. Her bidrar lav pH til å aktivere pepsinogen til pepsin. Den lave pH bidrar også til å denaturere proteiner slik at peptidbindingene blir mer tilgjengelig for pepsin og protein kan spaltes til større polypeptidkjeder (figur 3). Optimal pH for pepsinaktivitet hos pattedyr er på rundt 2,0 mens i fisk er pH optimum på cirka 4,0 (Espe *et al.*, 2001).

Inaktivt trypsinogen syntetisert i bukspyttkjertelen skilles ut i tarmen hvor det blir aktivert til trypsin av enzymet enterokinase. Eksempler på andre inaktive proteaser som syntetiseres i bukspyttkjertelen er chymotrypsinogen, proelastase og prokarboksypeptidase A

og B. Disse blir aktivert i tarmen av trypsin til henholdsvis chymotrypsin, elastase og karboksypeptidase A og B. Trypsin aktiverer også trypsinogen til trypsin. Disse svakt basiske fordøyelsesenzymene spalter polypeptidene som kommer fra magesekken videre til frie aminosyrer, di- og tripeptider (figur 3). Trypsin, chymotrypsin og elastase er endopeptidaser, og spalter peptidbindinger inne i peptidkjeden. Karboksypeptidasene fungerer som eksopeptidaser og fjerner den ytterste aminosyren ved karboksylenden. Amino-, di og tripeptidaser i mucosaveggen, kalt børstesøm enzymer, bidrar videre i nedbrytningen (figur 3). Ikke bare frie aminosyrer, men også di- og tripeptider blir absorbert av tarmcellene hvor peptidene blir brutt ned intracellulært til fire aminosyrer.



Figur 3: Fordøyelse av protein i magesekk og tynntarmen med enzymer. Figuren er modifisert fra Espe *et al.* (2001)

God fordøyelighet kan bidra til å redusere fôrfaktor og faecesvolumet (Annamalai *et al.*, 2021). I hvor stor grad protein i råstoff fordøyes er derfor relevant å vurdere når et fôr skal settes sammen. *In vivo* analyser er svært tidskrevende og kostbare (Fernández-García *et al.*, 2009), samt gjør det vanskelig å gjøre uttak fra spesifikke områder i fordøyelsen (Orlien *et al.*, 2021). Derfor har *in vitro* metoder blitt utviklet som et alternativ. Denne metoden simulerer de fysiologiske forholdene i fordøyelsen (mage og tynntarm). Dette gjøres ved bruk av blant annet temperatur, omrøring, regulering av kjemiske forhold og tilsetning av proteolytiske enzymer. Metoden er ikke helt nøyaktig, men gir likevel et godt estimat av fordøyelse av ulike proteinråstoffer (Fernández-García *et al.*, 2009).

Det overordnede målet med masteroppgaven var å undersøke om mel av tre mikroalger og en makroalge kan være mulige proteinråstoff i fiskefôr. Mikroalgene var en grønnalge, *Chlorella vulgaris*, og to kiselalger, *Porosira glacialis* og *Odontella aurita*, mens makroalgen var grisetang, *Ascophyllum nodosum*. Algemelene ble sammenlignet med kommersielt fiskemel som brukes i laksefôr. Konkrete delmål var:

1. Undersøke den kjemiske sammensetningen, inkludert aminosyre- og fettsyreinnhold i melene.
2. Studere *in vitro* fordøyelse av melene ved å bruke pepsin og bukspyttkjertelenzymer (pankreatin) fra gris.

2 Materialer og metoder

2.1 Materialer (råstoff)

Frossen biomasse av kiselalgen *Porosira glacialis* var fra Finnfjord AS. Denne våte biomassen ble i de fleste tilfeller frysetørket før bruk. Tørket *Odontella aurita* (kiselalge) var fra KissPlanet (Gembloux, Belgia), og tørket *Chlorella vulgaris* (grønnalge) var fra helsekostbutikk (Life) i Tromsø. Tørket og finmalt grisetang: *Ascophyllum nodosum* var fra ProBio, Arctic Seaweed AS (Flekkefjord, Norge). Fiskemel (GQH LT/ Prime nonEQ) var gitt av direktør Mads Martinsen, Skretting AS.

2.2 Kjemikalier

Pepsin fra gris (P7125, ≥ 400 Units/mg protein), pankreatin fra gris (P1750, 4xUSP), trikloreddiksyre, svovelsyre (97%), Folin & Ciocalteus fenol reagens, Natriumkarbonat, Kopper(II)sulfat pentahydrat, Kaliumklorid ($\geq 99,5\%$), L-tyrosin (T3754), DL-norleucine (N1398) og Heptadekansyre (17:0) ($\geq 98\%$), aminosyrestandarder (A6407 og A6282), OPA-reagens (o-phthaldialdehyd) (P7914), di- Natriumhydrogenfosfat (Na_2HPO_2 1.06580), Natriumdihydrogenfosfat (NaH_2PO_4 1.06342), fettsyrestandard PUFA 1 og bovine serum albumin (BSA) (A7906) var alle fra Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetonitril (MS kvalitet) og maursyre (MS kvalitet) var begge fra Sigma - Aldrich (Steinheim, Tyskland).

Saltsyre (37%; 12 M), dithiothreitol (DDT), diklormetan (100%), metanol (100%), n-heptan (99,8%) og natriumklorid var fra VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Frankrike). Magnesiumklorid, kaliumdihydrogenfosfat ($>99,0\%$) og dikaliumhydrogenfosfat ($>99,0\%$) var fra Fluka (Buchs, Sveits). Fettsyrestandard GLC 502 og GLC 411 var fra Nu-Chek Prep, Inc (Elysian, MN, USA). Kalsiumklorid (p.a., $\geq 98,0$) og trinatriumsitrat dihydrat fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Lithium loading buffer, pH 2,2, var fra Biochrom Co. (Cambridge, Storbritannia). N_2 -gass var fra AGA AS (Oslo, Norge).

2.3 Metoder

2.3.1 Frysetørrking

Frossen, vakuumpakket blokk (20x10x2 cm) med våt *P. glacialis* oppbevart ved -80 °C ble delt i 1 cm brede staver ved hjelp av håndsag, og lagret ved -80 °C i 2 timer før frysetørrking i en Scanvac CoolSafe frysetørker (LaboGene AS, Allerød, Danmark). Det frysetørkede melet ble så oppbevart i kjøleskap, sammen med de andre melproduktene.

2.3.2 Vann- og askeinnhold

Vanninnholdet ble estimert ved bruk av AOAC metoden 950.46b (AOAC, 1975). Det ble benyttet seks paralleller av hver prøve. Nøyaktig 2 gram av melproduktene og 5 gram av våt *P. glacialis* ble overført til tarerte aluminiumsbeger og tørket ved 105 °C i varmeskap (Heratherm Oven, Thermo Scientific, Langensfeld, Tyskland) i ett til tre døgn, til stabil vekt. Vanninnholdet ble beregnet ved hjelp av formelen:

$$\text{Vanninnhold (\%)} = \frac{\text{Våtvekt (g)} - \text{Tørrvekt (g)}}{\text{Våtvekt (g)}} * 100\%$$

Tørrstoffinnholdet ble enkelt beregnet:

$$\text{Tørrstoff (\%)} = 100\% - \text{Vanninnhold (\%)}$$

De tørkede prøvene ble videre brukt for bestemmelse av askeinnhold ved å bruke AOAC metoden 938.08 (AOAC, 1975). Prøvene ble forbrent ved 540 °C i forbrenningsovn (Nabartherm GmbH, Program Controller S27, Lilienthal, Tyskland) i 16 timer, før de ble veid på nytt. Askeinnholdet på våtvektsbasis ble beregnet ved hjelp av formelen:

$$\text{Askeinnhold (\%)} = \frac{\text{Vekt etter tørking og forbrenning (g)}}{\text{Våtvekt (g)}} * 100\%$$

For å beregne innholdet av de ulike komponenter i melproduktene, for eksempel aske, på tørrstoffbasis (TS) ble følgende ligning brukt:

$$\text{Aske (\%)} = \frac{\text{Askeinnhold på våtvektsbasis (\%)}}{\text{Tørrstoffinnhold (\%)}} * 100\%$$

2.3.3 Aminosyre- og proteininnhold

Proteininnhold i melproduktene ble beregnet ut fra kromatografisk analyse av aminosyreinnholdet etter syrehydrolyse, opprinnelig beskrevet av Moore og Stein (1963). Det ble laget 2 paralleller av hver prøve. Cirka 40 mg mel ble veid ut i 4 ml glassrør (Thermo Scientific, Langerwehe, Tyskland) før deretter å bli tilsatt 0,7 ml Milli-Q H₂O og 0,5 ml internstandard (20 mM, DL-Norleucine). Dette ble så blandet med 1,2 ml konsentrert saltsyre (12 M) til en sluttkonsentrasjon på 6 M. Prøvene ble deretter «flushet» med N₂-gass i ca. 15 sekunder og raskt lukket med skrukork. Prøvene ble så satt i varmeskap (Heratherm Oven) på 110 °C i ca. 24 timer og avkjølt, før 1 ml ble overført til Eppendorf rør. Rørene ble sentrifugert (Eppendorf sentrifuge 5424 R, Hamburg, Tyskland) på 14 000 rpm i 5 minutter for fjerning av partikler. 100 µl ble overført til analyserør beregnet for aminosyreanalysatoren og dampet til tørrhet med N₂-gass. De tørre prøvene ble så løst ut i 1 ml «loading» buffer (Lithium loading buffer, pH 2,2). Prøvene ble oppbevart med kork i kjøleskap fram til analyse. Aminosyrene ble separert med ionebytterkolonne på en Biochrom 30+ aminosyreanalysator (Biochrom Co., Cambridge, Storbritannia) og derivatisert med Ninhydrin. Aminosyrene ble identifisert ved bruk av to standardblandinger av aminosyrer. Proteininnholdet ble kalkulert ved å bruke DL-norleucine som standard og beregnet ut fra summen av molekylvektene til de individuelle aminosyrene etter at molekylvekta til vann (18 dalton) er fratrukket (Mæhre *et al.*, 2018). Analysene av prøvene som viste lavt innhold av aminosyrer ble gjort på nytt med større innveid prøvemateriale; ca. 120 mg *Porosira glacialis* og *Odontella aurita*, og ca. 200 mg griselang.

2.3.4 Lipidekstraksjon

Fettinnholdet ble bestemt ved å bruke en modifisert utgave av metoden opprinnelig publisert av Folch *et al.* (1957). Det ble brukt 3 - 4 paralleller av hvert mel. Cirka 200 mg ble veid ut i tarerte 15 ml sentrifugerør og nøyaktig vekt ble notert. Prøvene ble tilsatt 4 ml diklormetan/metanol (2:1) og 4 ml 5% NaCl i Milli-Q vann. Det ble satt på lokk og prøvene ble ristet for hånd før sentrifugering i 5 minutter ved 300xg (Eppendorf sentrifuge 5804 R). Den

organiske fasen (nederst) ble overført til 8 ml forhåndsveide glassrør (VWR, Darmstadt, Tyskland), ved hjelp av glasspipette. Diklormetan/metanol (2:1) (4 ml) ble på nytt tilsatt sentrifugerørene, prøvene ble ristet og sentrifugert, før den organiske fasen ble tilsatt de samme 8 ml glassrørene. Rørene ble så dampet til tørrhet med N₂-gass og lipidinnholdet beregnet ved bruk av formelen nedenfor:

$$\text{Fett (\%)} = \frac{(\text{Glassrør med innhold (g)} - \text{Tomt glassrør (g)})}{\text{Innveid mengde prøve (g)}} * 100\%$$

2.3.5 Fettsyresammensetning

Fettsyreanalyse ble utført med modifisert utgave av metoden til Christie & Han (2010). Ekstrahert fett ble løst ut til 10 mg/ml i diklormetan/metanol (2:1) og 100 µl ble overført til metyleringsrør (Duran GL 18, Mainz, Tyskland). Diklormetan (900 µl) og 2 ml H₂SO₄ ble tilsatt før prøvene med lokk ble satt i varmeblokk (Thermo Fisher Scientific, Osterode, Tyskland) og inkubert ved 100 °C i en time. Prøvene ble så tatt ut og kjølt ned før tilsetning av 3 ml heptan og 3 ml 5% NaCl. Den organiske fasen (øverste fasen), ble pipettert over i prøverør ved hjelp av glasspipette og dampet til tørrhet under nitrogengass. Til slutt ble prøvene løst ut i 100 µl heptan og overført til GC rør (VWR, Darmstadt, Tyskland). Rørene ble plassert i en Agilent 6890N gasskromatograf (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for analyse av de metylerte fettsyrene. Gasskromatografen er utstyrt med en 7683-auto-injektor, en Varian CP7419 kapillærkolonne og flammeionisasjonsdetektor. Helium ble benyttet som bæregass og temperaturen var 240 °C på injektoren og på 250 °C i detektoren. Fettsyrene ble identifisert ved å sammenligne retensjonstidene med kjente metylerte fettsyrestandarder (GLC 502, GLC 411 og PUFA 1). Arealprosent av fettsyrene ble beregnet ved hjelp av formelen:

$$\text{Areal (\%)} = \frac{\text{Areal av den enkelte fettsyre i kromatogrammet}}{\text{Totalt areal av alle fettsyrestoppene}} * 100\%$$

2.3.6 Fettsyremengder i melproduktene

Det ble gjort en separat analyse for beregning av mengde fettsyre per 100 gram tørrstoff. Internstandard, heptadekansyre (17:0) ble tilsatt melproduktene før fettekstraksjonen. Det ble tilsatt 200 µl 17:0 (5 mg/ml diklormetan) til prøvene med 3-5% fett, og 400 µl til prøvene med 10-12% fett. Deretter ble lipidene ekstrahert og fettsyrene analysert som beskrevet ovenfor. Mengde fettsyre per 100 gram prøve ble beregnet ved hjelp av formelen:

$$\text{Mengde fettsyre (mg) per 100 g prøve} = \frac{\text{Areal topp FA}}{\text{Areal topp IS}} \times \frac{\text{Tilsatt IS (mg)}}{\text{Vekt prøve (g)}} \times 100$$

2.3.7 Karbohydratinnhold

Karbohydratinnholdet ble estimert ved å trekke fra innholdet av vann, aske, protein og fett i melene (Tibbetts *et al.*, 2015).

$$\text{Karbohydratinnhold (\%)} = 100 - [\text{vann (\%)} + \text{aske (\%)} + \text{protein (\%)} + \text{fett (\%)}].$$

2.3.8 TCA-løselige peptider

Metoden for estimering av trikloreddiksyre (TCA)-løselige peptider var en modifisert utgave av den beskrevet av Lowry *et al.* (1951) ved bruk av aminosyren tyrosin som standard (Gildberg & Raa, 1983).

Løsninger:

Løsning A: 1 g $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ og 0,5 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ løst i Milli-Q vann til 100 ml.

Løsning B: 16 g NaOH og 50 g Na_2CO_3 løst i Milli-Q vann til 500 ml.

Modifisert alkalisk kopper reagens (M.A.C.R): 79 ml Milli-Q vann, tilsatt 1 ml løsning A og 20 ml løsning B (lages daglig før bruk).

Fremgangsmåte:

Standard/prøve (0,2 ml), ble tilsatt 0,8 ml M.A.C.R i 2 ml Eppendorf rør, blandet godt på en reagensrørmikser og satt 30 min i romtemperatur. 1 N Folin & Ciocalteus fenol reagens (FC reagens) (50 µl) ble tilsatt og prøvene ristet før videre henstand i 30 minutter ved romtemperatur. Deretter ble prøvene avlest spektrofotometrisk ved 700 nanometer (nm)

bølgelengde i et Genesys 20 spektrofotometer (Thermo Scientific, MA, USA). For å nullstille spektrofotometeret ble 0,2 ml 5% TCA brukt som prøve.

For å lage standardkurve ble det benyttet ulike konsentrasjoner av tyrosin på henholdsvis 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 og 1,0 $\mu\text{mol/ml}$ 5% TCA. Konsentrasjon på 0,1 $\mu\text{mol tyrosin/ml}$ 5% TCA brukes videre. Ved høyere konsentrasjoner får kurven en mer ikke-lineær utvikling og absorpsjonen øker ikke proporsjonalt med den økende konsentrasjon. For beregning av TCA-løselige peptider ble det brukt følgende formel:

$$\text{TE } \mu\text{mol/ml prøve} = \frac{\text{ABS 700 nm prøve} \times 0,1 \mu\text{mol/ml} \times \text{FF}}{\text{ABS 700 nm tyrosin}}$$

TE = tyrosinekvivalenter. FF = fortynningsfaktor (ved absorpsjon > 0,80 ble prøven fortynnet slik at absorpsjonen ble mellom 0,10 og 0,80).

2.3.9 Molekylvektfordeling under GI-fordøyelse studert med UHPLC MS

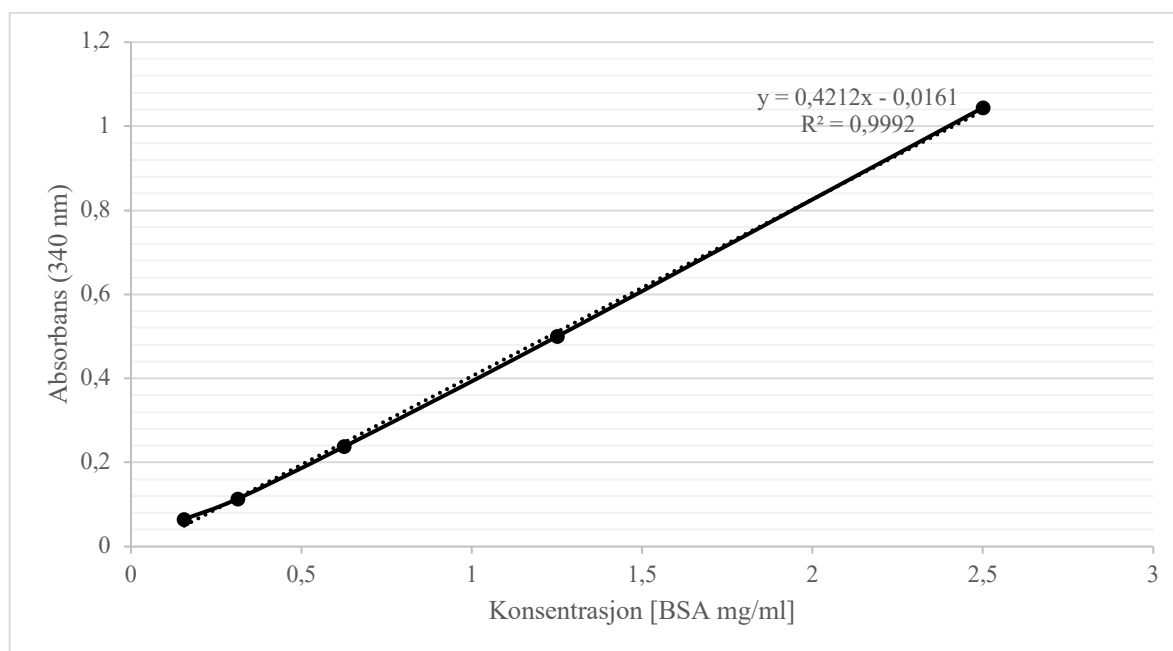
Størrelsesfordelingen av TCA-løselige peptider etter 90 min pepsinfordøyelse og deretter 90 pankreatinfordøyelse av melproduktene, ble analysert ved å bruke en Agilent 1290 Infinity ultra-high-performance væskechromatografi (UHPLC) koblet til en diode array detector og et 6540B Quadruple – Time of Flight massespektrometer (QToF-MS) med en dobbel elektroprayioniseringskilde. Systemet ble styrt av en MassHunter Data Acquisition-programvare (B.06.01, SP1) (alt fra Agilent, Matriks, Oslo, Norge). Størrelsen av TCA-løselige peptider ble også undersøkt ved tid 0 min etter start av pepsinfordøyelsen og i kontrollprøver uten tilsatt enzym inkubert i 180 minutter.

UHPLC-systemet var utstyrt med en Phenomenex Kinetex F5 UHPLC-kolonne (1,7 μm , 100 Å, 150 x 2,1 mm) (Værløse, Danmark) og 5 μl av TCA løselige peptider ble injisert. Den mobile fasen besto av to elueringsmidler, hvor A var vann med 0,1% maursyre, mens B inneholdt acetonitril med 0,1% maursyre. Gradienten i mobilfasen som ble brukt til eluering begynte med 5% B og økte til 50% B i løpet av 8 minutter, deretter økende fra 50-100% B i 2 minutter, og holdt ved 100% B i 2 minutter til. Strømningshastigheten var 0,3 ml/min, kolonnetemperaturen var 40 °C, og ionisering ble utført med positiv polaritetsmodus. Dataanalyse ble utført ved bruk av MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 SP2 (Agilent).

2.3.10 Hydrolysegrad med OPA-metoden

Hydrolysegrad ble estimert ved å bestemme antall frie aminogruyper ved bruk av o-Phthaldialdehyd (OPA). Metoden er en modifisert versjon av de publisert av Held (2006) og Nielsen *et al.* (2001). Mengde frie aminogruyper ble undersøkt i supernatanter fra pepsinfordøyelse (90 minutter) og pankreatinfordøyelse (90 minutter), samt for prøver 0 minutter etter start og kontroll (180 minutters fordøyelse) uten enzym for alle mel. BSA i ulike konsentrasjoner (2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 og 0,156 mg BSA/ml PBS-buffer, fosfatbufret saltvann) ble brukt som mål for antall frie aminogruyper (figur 4). PBS-buffer pH 7,4 bestod av 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM NaH₂PO₄, 137 mM NaCl og 2,7 mM KCl.

Metoden ble utført ved at 30 µl supernatant, BSA-standardløsninger og blank (PBS buffer) ble overført til en blank 96-brønners plate (Thermo Scientific, Roskilde, Danmark). Før bruk ble OPA-reagens aktivert ved å tilsette 0,93 mg dithiothreitol/ml OPA reagens. 225 µl aktivert OPA reagens ble tilsatt hver brønn ved hjelp av en multikanalpipette, og blandet ved å pipetere opp og ned. Etter 5 minutter ble brønnene målt ved 340 nm i SpectraMax i3 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA).



Figur 4: Standardkurve for reaksjon mellom antallet frie aminogruyper og OPA reagens.

2.4 *In vitro* fordøyelse av protein

2.4.1 *In vitro* gastrointestinal fordøyelse av protein i melprodukter

Fordøyelsesforsøkene ble gjennomført i 2 faser, magesekk- og tynntarmfordøyelse (gastrointestinal fordøyelse), med henholdsvis pepsin og pankreatin fra gris. Analysen er en modifisert versjon av tidligere publiserte metoder (Ageeva, 2014; Jensen *et al.*, 2009).

Fordøyelsesforsøkene ble utført med cirka 0,4 - 0,5 g protein per 100 ml saltløsning som inneholdt 50 mM NaCl, 12 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 2,4 mM MgCl₂ og 2,5 mM K₂HPO₄. Surhetsgraden (pH) ble justert i saltløsningen med 1 M HCl til pH 2,0 etter at melet var tilsatt. For å oppnå samme proteinkonsentrasjon i fordøyelsesblandingen ble det brukt 1,0 g fiskemel, 1,3 g mel av *C. vulgaris*, 2,65 g mel av *P. glacialis*, 3,15 g mel av *O. aurita* og 12,05 g grisatangmel. I forsøket med våt biomasse av *P. glacialis* ble det tilsatt 23,3 g biomasse for å oppnå samme proteininnhold i 100 ml saltløsning.

Prosedyre fordøyelsesforsøk:

1. Melblandingen ble pre-inkubert i varmeskap (Heratherm Oven) ved 37 °C i 15 minutter før tilsats av 0,4 g pepsin/100 ml. Inkubasjonsblandingen var under konstant røring med magnetrører (250 rpm), og prøver ble tatt ut ved ulike tidspunkt fra tid 0 og opptil 180 min magesekkkfordøyelse.
2. På hvert uttakstidspunkt ble fordøyelsen stoppet ved å tilsette 1 ml 10% TCA til 1 ml prøve i Eppendorf rør og blandet ved bruk av reagensrørmikser i 5 sekunder. Blandingen ble avkjølt på is i minimum 30 minutter før sentrifugering ved 14000 rpm i 5 minutter (Eppendorf sentrifuge 5424 R). Mengden TCA-løselige peptider i supernatanten ble bestemt.
3. Etter siste uttak av magesekkkfordøyelse ble pH justert opp til cirka 7,5 ved dråpevis tilsetning av 2 M NaOH. 10 ml 0,1 M K₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer pH 7,5 ble tilsatt. pH ble eventuelt justert til 7,5 med 2 M NaOH før tilsats av 0,4 g pankreatin.
4. Etter tilsats av pankreatin ble 1 ml inkubasjonsblanding tatt ut ved tid 0 og ved ulike tidspunkt ved opptil 90 min tynntarmsfordøyelse. Ved hvert uttak ble enzymfordøyelsen stoppet med 1 ml 10% TCA og mengden TCA-løselige peptider ble bestemt i supernatant etter avkjøling og sentrifugering som beskrevet ovenfor.
5. Kontrollforsøk ble gjennomført uten tilsatte enzymer for alle melproduktene.

2.4.2 Pepsinfordøyelse (24 timer)

For å undersøke om det var noen videre nedbrytning i magesekken, ble det gjort et 24 timers magesekkkfordøyelsesforsøk for fiskemel. Her ble det benyttet samme prosedyre som i 2.4.1, men med uttak etter 0, 1, 2, 3, 4, 10 og 24 timer. Det ble gjort 3 parallelle uttak for hvert tidspunkt.

2.4.3 Pepsinfordøyelse med ulike konsentrasjoner av pepsin

For å undersøke hvordan ulike konsentrasjoner av pepsin påvirket nedbrytningen i magefordøyelse ble det utført et hydrolyseforsøk i 4 timer med ulike konsentrasjoner av pepsin for alle de 5 melene. Det ble gjort uttak etter 0; 0,5; 1; 2 og 4 timer. Mengde tilsatt pepsin var 0,4; 0,8 og 2,0 g pepsin/ 100 ml saltløsning. En kontrollgruppe (uten enzym) ble også undersøkt for alle melprodukter. Det ble gjort to parallelle uttak for hvert tidspunkt.

2.4.4 Tarmfordøyelse av varmebehandlet fiskemel

For å undersøke om varmebehandling påvirket tarmfordøyelse av fiskemel ble 1,0 g fiskemel suspendert i 100 ml saltløsning, som beskrevet i 2.4.1. Det ble tilsatt 10 ml 0,1 M kaliumfosfatbuffer (pH 7,5) og surhetsgraden justert med 2 M NaOH til pH 7,5. Løsningen ble varmebehandlet på kokende vannbad i 15 min. Etter avkjøling til 37 °C, ble blandingen tilsatt 0,4 g pankreatin og plassert med magnetrøring i varmeskap (37 °C) (Heratherm Oven). Prøver for bestemmelse av TCA-løselige peptider ble tatt ut etter 0 min og ved ulike tidspunkt fram til 30 minutters fordøyelse. Kontrollforsøk uten kokt fiskemel, men med tilsatt enzym ble inkludert i forsøket.

3 Resultater

3.1 Kjemisk sammensetning

Fiskemel hadde et vanninnhold på 8,0% og inneholdt 51,3% protein, 11,0% fett og 17,2% aske på tørrstoffbasis (tabell 2). Frysetørket *P. glacialis* inneholdt 0,8% vann og 17,9% protein, 12,1% fett og 50,7% aske på tørrstoffbasis. Mel av *O. aurita* hadde et vanninnhold på 8,1% og på tørrstoffbasis et protein-, fett- og askeinnhold på henholdsvis 16,2; 5,7 og 19,5%. Mel av *C. vulgaris* inneholdt 4,9% vann, og 38,1% protein, 3,5% fett og 8,0% aske på tørrstoffbasis. For mel av grisetang ble i samme rekkefølge verdiene funnet å være 8,9; 4,3; 4,0 og 24,9%.

Innholdet av karbohydrat ble beregnet til 20,5% i fiskemel, mens tilsvarende verdier i melene av *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris* og grisetang ble funnet å være henholdsvis 19,3; 58,7; 50,5 og 66,9%.

Tabell 2: Vanninnhold (%) og innhold (% tørrstoff) av protein, fett, aske og karbohydrat i fiskemel og mel av *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris* og grisetang. Verdiene er basert på 3-6 parallelle analyser av hver melprøve.

	Vann	Protein	Fett	Aske	Karbohydrat
Fiskemel	8,0 ± 0,1	51,3 ± 3,4	11,0 ± 0,4	17,2 ± 0,1	20,5
<i>P. glacialis</i>	0,8 ± 2,2	17,9 ± 0,1	12,1 ± 0,7	50,7 ± 1,1	19,3
<i>O. aurita</i>	8,1 ± 0,2	16,2 ± 0,2	5,7 ± 0,2	19,5 ± 0,1	58,7
<i>C. vulgaris</i>	4,9 ± 0,1	38,1 ± 0,0	3,5 ± 0,2	8,0 ± 0,1	50,5
Grisetang	8,9 ± 0,1	4,3 ± 0,1	4,0 ± 0,2	24,9 ± 0,3	66,9

Vanninnholdet i våt biomasse av *P. glacialis* mottatt fra Finnfjord AS var $90,4 \pm 0,2\%$.

3.2 Aminosyresammensetning

Det totale innholdet av essensielle aminosyrer i fiskemel og mel av *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris* og grisetang ble målt til å være henholdsvis 514,1; 503,8; 482,1; 618,7 og 413,9 mg/g protein (tabell 3). Det totale innholdet av de ikke-essensielle aminosyrene var for melene i samme rekkefølge henholdsvis 575,5; 661,5; 592,6; 544,3 og 639,5 mg/g protein.

Fiskemel inneholdt 98,4 mg lysin og 39,2 mg metionin/g protein. Algemelene inneholdt mellom 55,8 og 76,5 mg lysin/g protein med høyst innhold i mel av *P. glacialis*. I algemelene varierte metionininnholdet mellom 18,6 og 30,2 mg/g protein. Også for denne essensielle aminosyren var det høyest innhold i *P. glacialis* av algemelene. Innholdet av arginin i

C. vulgaris ble funnet til å være særlig høyt, hele 220,7 mg/g protein. Den totale summen av aminosyrer i mg i produktene var 5-16% høyere enn det kalkulerte proteininnholdet i gram.

Tabell 3: Aminosyresammensetning (mg AA/g protein) i fiskemel og mel av *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris*, grisetang. ID = ikke detektert, EAA = essensielle aminosyrer, IEAA = ikke essensielle aminosyrer. Verdiene er basert på 2 parallelle analyser av hver melprøve. ID= ikke detektert.

	Fiskemel	<i>P. glacialis</i>	<i>O. aurita</i>	<i>C. vulgaris</i>	Grisetang
Arginin	38,2 ± 0,7	6,1 ± 0,1	84,6 ± 0,3	220,7 ± 0,2	53,5 ± 0,2
Histidin	40,2 ± 0,5	25,1 ± 0,0	16,0 ± 0,1	22,0 ± 0,1	16,3 ± 0,0
Isoleucin	47,0 ± 0,2	60,3 ± 0,2	47,5 ± 0,3	37,0 ± 0,0	39,5 ± 0,0
Leucin	89,9 ± 0,2	103,9 ± 0,2	80,9 ± 0,1	92,9 ± 0,3	72,1 ± 0,1
Lysin	98,4 ± 0,6	76,5 ± 0,1	61,1 ± 0,0	67,7 ± 0,5	55,8 ± 0,0
Metionin	39,2 ± 0,0	30,2 ± 0,0	25,3 ± 0,0	23,1 ± 0,5	18,6 ± 0,0
Fenylalanin	50,1 ± 0,2	70,4 ± 0,0	51,9 ± 0,1	48,0 ± 0,1	48,8 ± 0,1
Treonin	54,0 ± 0,2	63,1 ± 0,1	57,4 ± 0,2	47,2 ± 0,1	55,8 ± 0,1
Valin	57,1 ± 1,0	68,2 ± 0,2	57,4 ± 0,4	60,1 ± 0,2	53,5 ± 0,1
Tryptofan	ID	ID	ID	ID	ID
EAA	514,1	503,8	482,1	618,7	413,9
Alanin	81,9 ± 4,5	120,7 ± 0,0	93,8 ± 0,1	113,6 ± 0,4	79,1 ± 0,2
Asparaginsyre*	88,7 ± 0,4	120,7 ± 0,1	101,2 ± 0,5	82,9 ± 0,2	116,3 ± 0,1
Glutaminsyre**	169,0 ± 2,0	165,9 ± 0,0	174,1 ± 1,0	131,8 ± 1,8	234,9 ± 0,2
Glycin	79,1 ± 1,4	75,4 ± 0,1	69,1 ± 0,4	75,6 ± 0,3	65,1 ± 0,1
Serin	51,3 ± 0,3	63,1 ± 0,0	56,8 ± 0,4	45,9 ± 0,3	55,8 ± 0,1
Tyrosin	40,0 ± 0,3	42,5 ± 0,0	28,4 ± 0,2	37,3 ± 0,0	20,9 ± 0,0
Prolin	54,2 ± 5,6	66,5 ± 0,1	63,0 ± 1,0	50,1 ± 1,2	55,8 ± 0,2
Cystein	11,3 ± 0,0	6,7 ± 0,0	6,2 ± 0,1	7,1 ± 0,0	11,6 ± 0,0
IEAA	575,5	661,5	592,6	544,3	639,5
AA tot.	1089,6	1165,3	1074,7	1163,0	1053,4

*inneholder også asparagin. **inneholder også glutamin

3.3 Fettsyresammensetning og fettsyremengder

I tabell 4 er fettsyresammensetningen uttrykt i prosent av det totale fettsyreinholdet (arealprosent). Det totale innholdet av mettede fettsyrer (SFA) var 35,6% i fiskemel, 12,1% i *P. glacialis*, 56,3% i *O. aurita*, 32,2% i *C. vulgaris* og 26,6% i grisetang. Palmitinsyre (16:0) var den dominerende mettede fettsyren i produktene med unntak av i *P. glacialis* hvor innholdet av laurinsyre (14:0) var nesten like høyt.

Fett i fiskemel, *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris* og grisetang inneholdt henholdsvis 22,1; 36,5; 39,4; 5,3 og 53,9% enumettede fettsyrer (MUFA). Disse fettsyrene besto nesten utlukkende av palmitolensyre (16:1n-7) og oljesyre (18:1n-9) der sistnevnte var den

dominerende fettsyren. Unntaket var i fett fra *O. aurita* hvor MUFA nesten utelukkende var 16:1n-7. Fett ekstrahert fra fiskemel inneholdt også små mengder av langkjedede enumettede fettsyrer (20:1n-9, 22:1n-9 og 24:1n-9).

Tabell 4: Fettsyreinnehold (areal %) i fett ekstrahert fra fiskemel og mel av *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris* og grisetang. SFA = mettede fettsyrer, MUFA = enumettede fettsyrer, PUFA = flerumettede fettsyrer, LC-PUFA= langkjedede flerumettede fettsyrer, n-3 = omega-3 fettsyrer, n-6 = omega-6 fettsyrer. ID=ikke detektert (tilstede i 0,5% eller mindre areal). Verdiene er basert på 3 parallelle analyser av hver melprøve.

Fettsyrer	Fiskemel	<i>P. glacialis</i>	<i>O. aurita</i>	<i>C. vulgaris</i>	Grisetang
C14:0	6,3 ± 0,5	5,4 ± 0,4	14,8 ± 0,8	0,7 ± 0,0	9,9 ± 0,6
C16:0	23,5 ± 1,5	6,7 ± 0,4	40,0 ± 0,3	29,8 ± 0,3	14,7 ± 0,3
C18:0	5,8 ± 0,4	ID	1,5 ± 0,0	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,2
Total SFA	35,6	12,1	56,3	32,2	26,6
C16:1 n-7	6,9 ± 0,4	10,1 ± 0,4	38,3 ± 0,6	0,8 ± 0,2	1,4 ± 0,0
C18:1 n-9*	12,9 ± 0,9	26,4 ± 1,2	1,1 ± 0,1	4,5 ± 0,0	52,5 ± 0,3
C20:1 n-9	0,9 ± 0,1	ID	ID	ID	ID
C22:1 n-9	0,7 ± 0,5	ID	ID	ID	ID
C24:1 n-9	0,7 ± 0,4	ID	ID	ID	ID
Total MUFA	22,1	36,5	39,4	5,3	53,9
C18:2 n-6	3,0 ± 0,1	ID	0,7 ± 0,2	40,0 ± 0,1	8,9 ± 0,2
C20:2 n-6	ID	ID	ID	ID	1,2 ± 0,0
C18:3 n-3	0,7 ± 0,1	ID	ID	21,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1
C20:3 n-3	1,1 ± 0,0	ID	ID	ID	4,4 ± 0,1
C18:4 n-3	ID	4,6 ± 0,3	ID	ID	ID
C20:5 n-3	15,1 ± 0,8	37,2 ± 1,4	2,1 ± 0,2	ID	1,5 ± 0,1
C22:5 n-3	2,2 ± 0,1	ID	ID	ID	ID
C22:6 n-3	18,6 ± 1,0	5,5 ± 0,2	0,6 ± 0,0	ID	ID
Total PUFA	40,7	47,3	3,4	61,8	17,9
Total FA	98,4	95,9	99,1	99,3	98,4
PUFA n-6	3,0	ID	0,7	40,0	10,1
PUFA n-3	37,7	47,3	2,7	21,8	7,8
LC-PUFA n-3	35,9	42,7	2,7	ID	1,5

*Kan også inneholde C16:4 n-1

Fiskemel, *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris* og grisetang inneholdt henholdsvis 40,7, 47,3; 3,4; 61,8 og 17,9% flerumettede fettsyrer (PUFA). LC-PUFA n-3 utgjorde 35,9% av alle fettsyrene i fiskemelet. Innholdet av eikosapentaensyre (EPA; 20:5n-3), dokosapentaensyre (DPA; 22:5n-3) og dokosaheksaensyre (DHA; 22:6n-3) var henholdsvis 15,1; 2,2 og 18,6%. I mel av *P. glacialis* var andelen EPA, stearidonsyre (SDA; 18:4n-3) og DHA henholdsvis 37,2; 4,6 og 5,5%. Totalt utgjorde LC-PUFA n-3 42,7% av fettsyrene. Linolsyre (LA; 18:2n-6) ble ikke påvist i *P. glacialis* mens i fiskemel var det 3,0% av denne fettsyren. *O. aurita* hadde et

svært lavt innhold av PUFA og her bidro linolsyre, EPA og DHA til henholdsvis 0,7; 2,1 og 0,6% av fettsyrene. PUFA i *C. vulgaris* inneholdt bare LA (40,0%) og α -linolensyre (ALA; 18:3n-3) (21,8%). Den dominerende PUFA i mel av griselang var LA (8,9%), mens EPA bare utgjorde 1,5%. Omega - 3 fettsyren 20:3n-3 ble funnet å utgjøre 4,4% av fettsyrene i melet.

I en separat analyse ble en internstandard (17:0) tilsatt melene før ekstraksjon av fett, for å undersøke hvor mye det var av de enkelte fettsyrene per 100 g tørrstoff (tabell 5). I fiskemel var innholdet LC-PUFA n-3 (EPA, DPA og DHA) 2,41g per 100 g tørt mel. I mel av *P. glacialis* var det 1,94 g per 100 gram. I 100 gram av *O. aurita* og griselang ble det funnet henholdsvis 36,9 og 14,9 mg til sammen av disse fettsyrene. LC-PUFA n-3 ble ikke påvist i *C. vulgaris*.

Tabell 5: Fettsyreinnehold mg fettsyre/100 g tørrstoff, for fiskemel, *P. glacialis*, *O. aurita*, *C. vulgaris* og griselang. Forkortelser som i tabell 4. Verdiene er basert på 3 parallelle analyser av hvert mel.

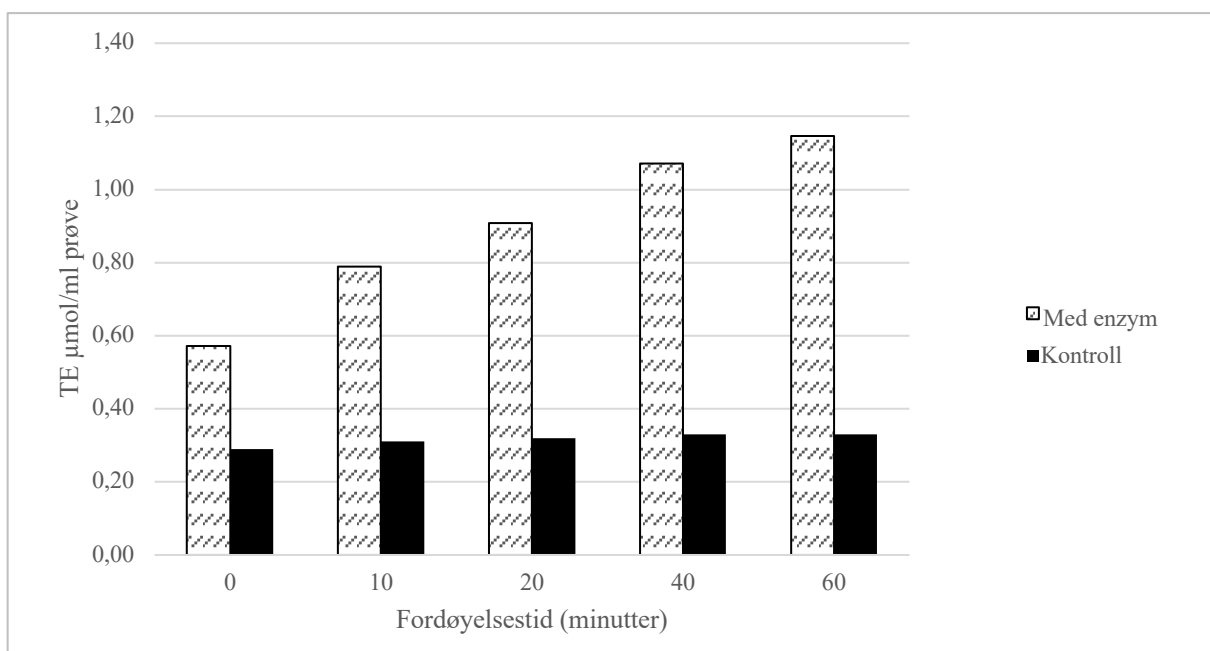
Fettsyrer	Fiskemel	<i>P. glacialis</i>	<i>O. aurita</i>	<i>C. vulgaris</i>	Griselang
C14:0	487,6 ± 7,9	353,9 ± 5,4	302,4 ± 8,8	ID	126,6 ± 7,3
C16:0	1520,3 ± 17,0	367,1 ± 3,7	709,3 ± 4,1	283,8 ± 5,1	155,6 ± 7,5
C18:0	362,3 ± 5,5	ID	23,9 ± 0,9	14,1 ± 0,5	22,0 ± 1,1
Total SFA	2370,2	721,0	1035,6	297,9	304,2
C16:1 n-7	498,4 ± 6,9	551,3 ± 7,3	708,0 ± 11,0	10,6 ± 0,3	14,1 ± 0,8
C18:1 n-7	209,7 ± 5,0	ID	33,6 ± 2,4	12,0 ± 0,2	ID
C18:1 n-9*	743,5 ± 22,3	1375,3 ± 17,3	18,1 ± 0,8	42,7 ± 0,3	526,3 ± 17,3
C22:1 n-9	57,1 ± 1,0	ID	ID	ID	ID
C24:1 n-9	70,4 ± 0,9	ID	ID	ID	ID
Total MUFA	1579,1	1926,6	759,7	65,3	540,4
C18:2 n-6	203,3 ± 3,4	ID	ID	395,0 ± 5,7	89,0 ± 3,8
C20:2 n-6	ID	ID	ID	ID	12,5 ± 0,5
C18:3 n-3	46,3 ± 0,7	ID	ID	218,1 ± 2,9	18,3 ± 0,9
C18:4 n-3	136,7 ± 2,4	303,9 ± 2,8	ID	ID	ID
C20:4 n-6	69,4 ± 1,6	ID	ID	ID	43,9 ± 1,7
C20:5 n-3	1005,5 ± 21,5	1692,2 ± 18,3	36,9 ± 4,7	ID	14,9 ± 0,7
C22:5 n-3	150,4 ± 3,3	ID	ID	ID	ID
C22:6 n-3	1255,2 ± 24,6	249,8 ± 0,9	ID	ID	ID
Total PUFA	2866,8	2245,9	36,9	613,1	178,6
Total FA	6816,1	4893,5	1832,2	976,3	1023,2
PUFA n-6	272,7	ID	ID	395,0	145,4
PUFA n-3	2594,1	2245,9	36,9	218,1	33,2
LC-PUFA n-3	2411,1	1942,0	36,9	ID	14,9

*Kan også inneholde C16:4 n-1

3.4 Innledende forsøk. *In vitro* GI-fordøyelse

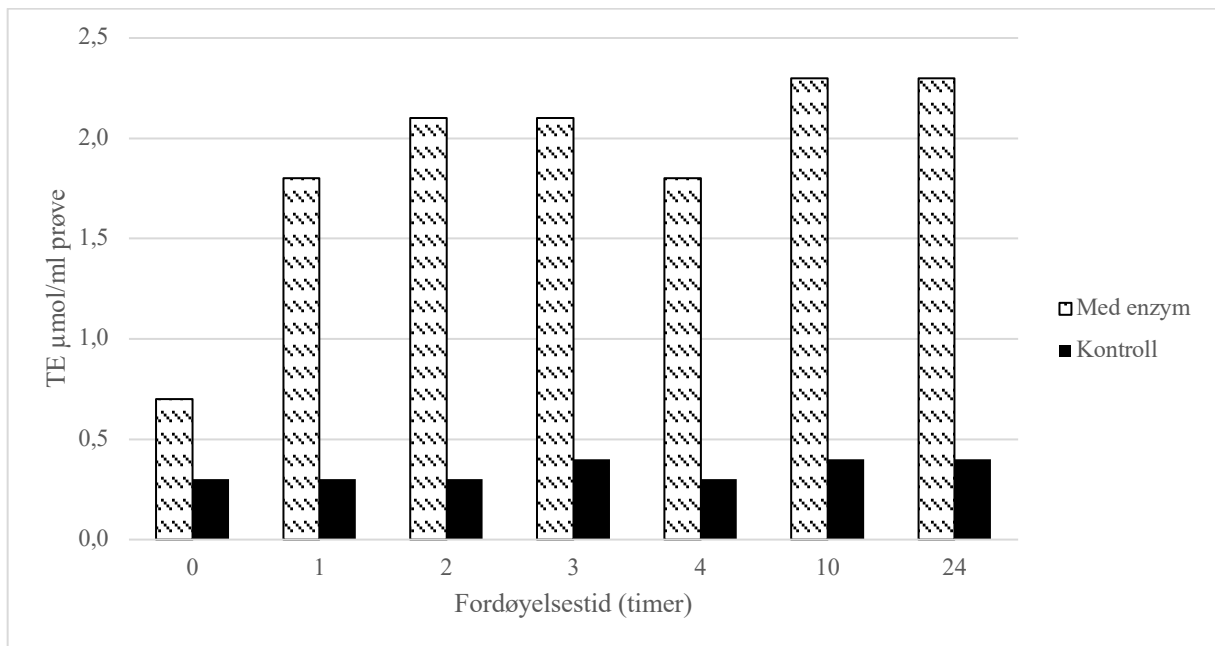
3.4.1 Magesekkkfordøyelse

I et innledende forsøk beskrevet i 2.4.1 (prosedyre 1-2) ble *in vitro* magesekkkfordøyelse av fiskemel undersøkt. Resultatene viste at konsentrasjonen av TCA-løselige peptider økte allerede fra 0 minutter (0,58 TE $\mu\text{mol/ml}$) i prøven etter tilsats av pepsin og fortsatte å øke gjennom forsøket. Etter 60 minutter var konsentrasjonen på cirka 1,16 TE $\mu\text{mol/ml}$. Kontrollgruppen uten enzym, holdt seg på et tilnærmet stabilt nivå (0,3 TE $\mu\text{mol/ml}$) gjennom fordøyelsen (figur 5).



Figur 5: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider (TE $\mu\text{mol/ml}$) i supernatant ved ulike tidspunkt i magesekkkfordøyelsen av fiskemel. Kontrollgruppen var uten tilsatt pepsin.

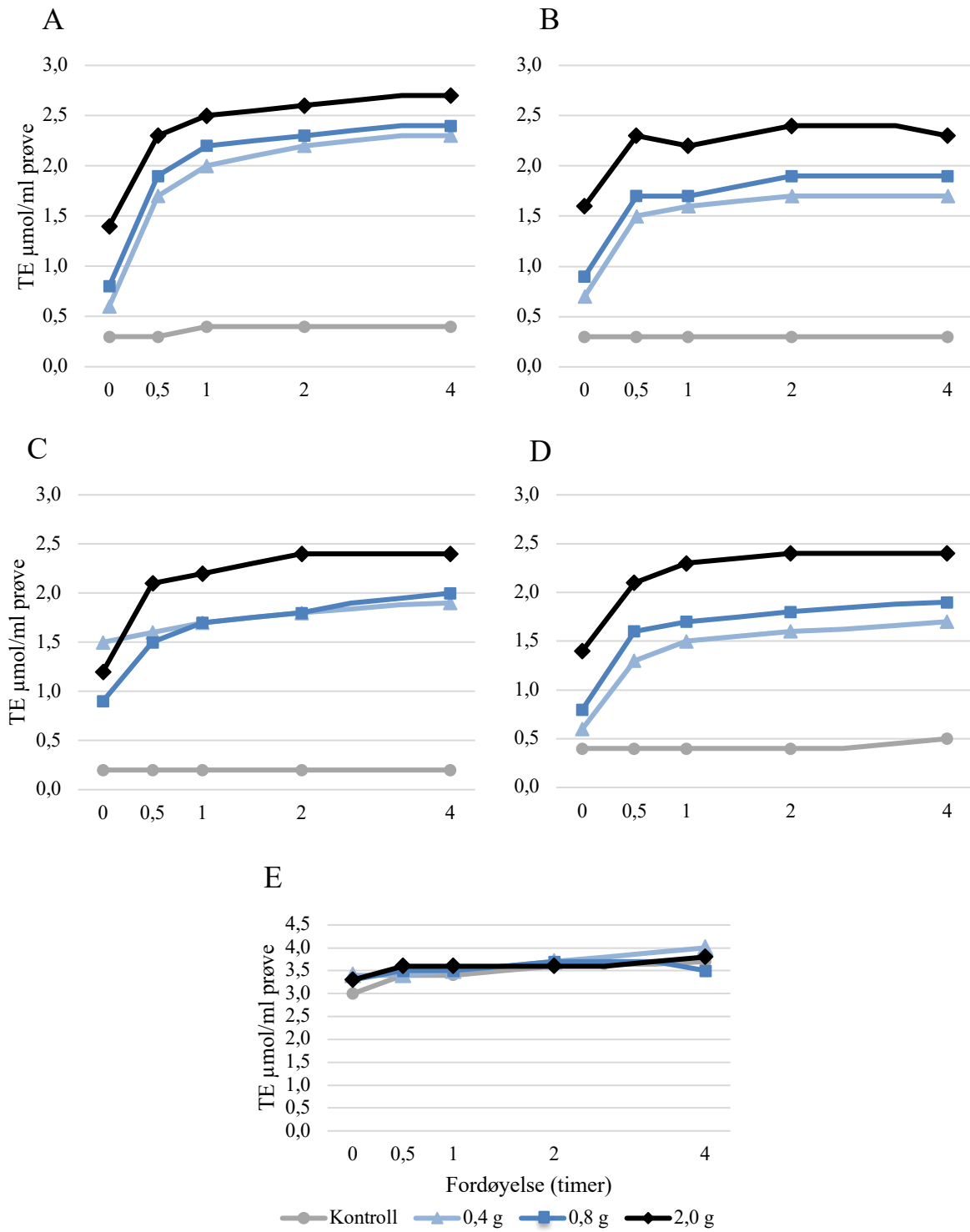
Det ble også gjennomført et langtidsforsøk på 24 timer med pepsinfordøyelse av fiskemel beskrevet i 2.4.2 (figur 6). Resultatene viste størst økning i TCA-løselige peptider med en økning på nesten 2,5x den første timen (ca. 0,7 til 1,8). Etter ett til to timers fordøyelse stabiliserte mengden seg på rundt 2,1 TE $\mu\text{mol/ml}$.



Figur 6: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider i fiskemel ved ulike tidspunkt ved 24 timers pepsinfordøyelse (pH = 2,0). Verdiene er basert på to parallelle uttak av hvert mel.

3.4.2 Magesekkkfordøyelse – ulike konsentrasjoner av pepsin

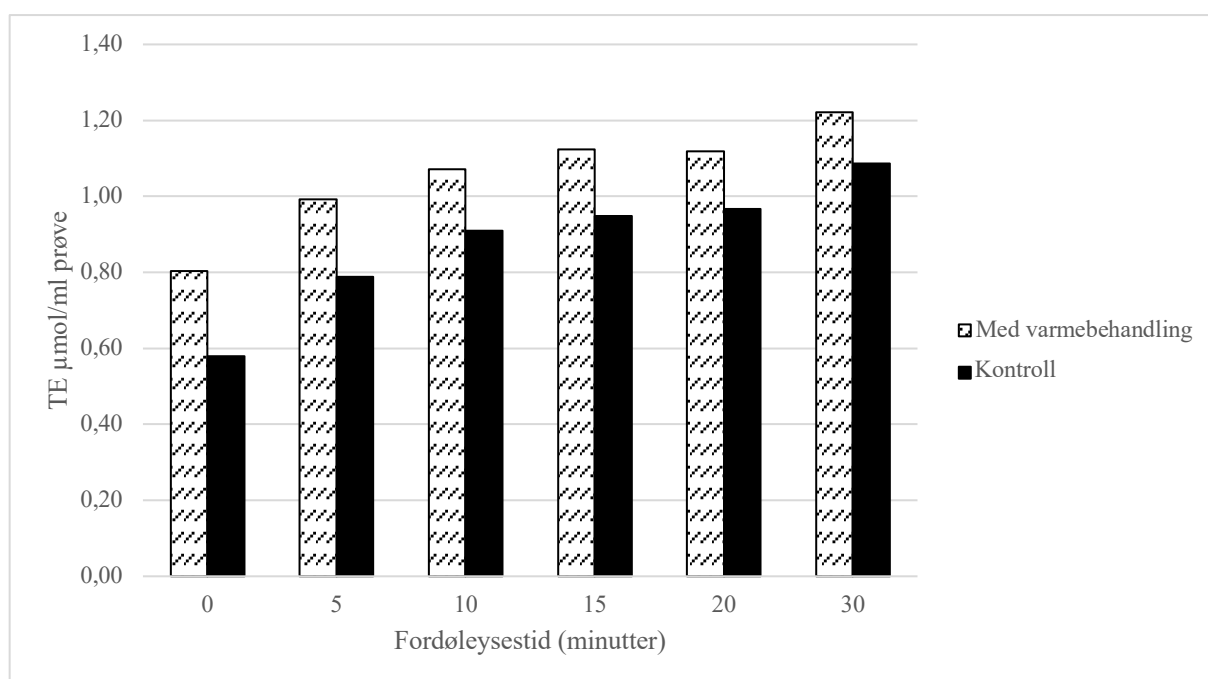
Det ble gjennomført en 4 timers magesekkkfordøyelse med ulike konsentrasjoner av pepsin (Materialer og metoder 2.4.3). Resultatene for fiskemel (A), *P. glacialis* (B), *C. vulgaris* (C), *O. aurita* (D) og grisetang (E) er vist i figur 7. Allerede etter 0 min fordøyelse, tilsats av pepsin, hadde konsentrasjonen av TCA-løselige peptider økt sammenlignet med kontrollforsøket for både fiskemel (A) og for melene av mikroalger (B, C og D). Med unntak av *C. vulgaris* (C), var det tydelig korrelasjon mellom TCA-løselige peptider og mengde tilsatt enzym ved alle uttakstidspunkt. Den største økningen i TCA-løselige peptider fant sted fra tiden 0 og til 0,5 timer ved alle konsentrasjoner av pepsin. Ved fordøyelsen av fiskemel tyder resultatene på at mengden frigjorte peptider generelt var høyere, særlig ved de to laveste konsentrasjoner av pepsin, enn for mikroalgemelene. I fordøyelsesforsøket med grisetangmel (E), ble det uavhengig av uttakstidspunkt og pepsinkonsentrasjon, ikke funnet noen forskjell i konsentrasjon av TCA-løselige peptider mellom disse og kontrollforsøket. Det ble heller ikke funnet noen økning i TCA-løselige peptider i løpet av inkubasjonsforløpet.



Figur 7: Dannelse av TCA-løselige peptider ved fordøyelse av fiskemel (A) og mel av *P. glacialis* (B), *C. vulgaris* (C), *O. aurita* (D) og grisetang (E) med ulike konsentrasjoner av pepsin. Kontroll var uten tilsatt enzym. Resultatene er basert på to parallelle uttak av hver konsentrasjon.

3.4.3 Tarmfordøyelse

Innledende forsøk med direkte *in vitro* tarmfordøyelse i 30 minutter av fiskemel og av varmebehandlet fiskemel ble undersøkt som beskrevet i Materialer og metoder 2.4.4. Resultatet viste noe høyere konsentrasjon av TCA-løselige peptider i den varmebehandlede prøven (0,80 til 1,22 $\mu\text{mol/ml}$), sammenlignet med kontrollgruppen uten varmebehandling (0,58 til 0,90 $\mu\text{mol/ml}$). Frigjøringen av peptider avtok noe etter rundt 15 minutters fordøyelse i begge gruppene (figur 8).

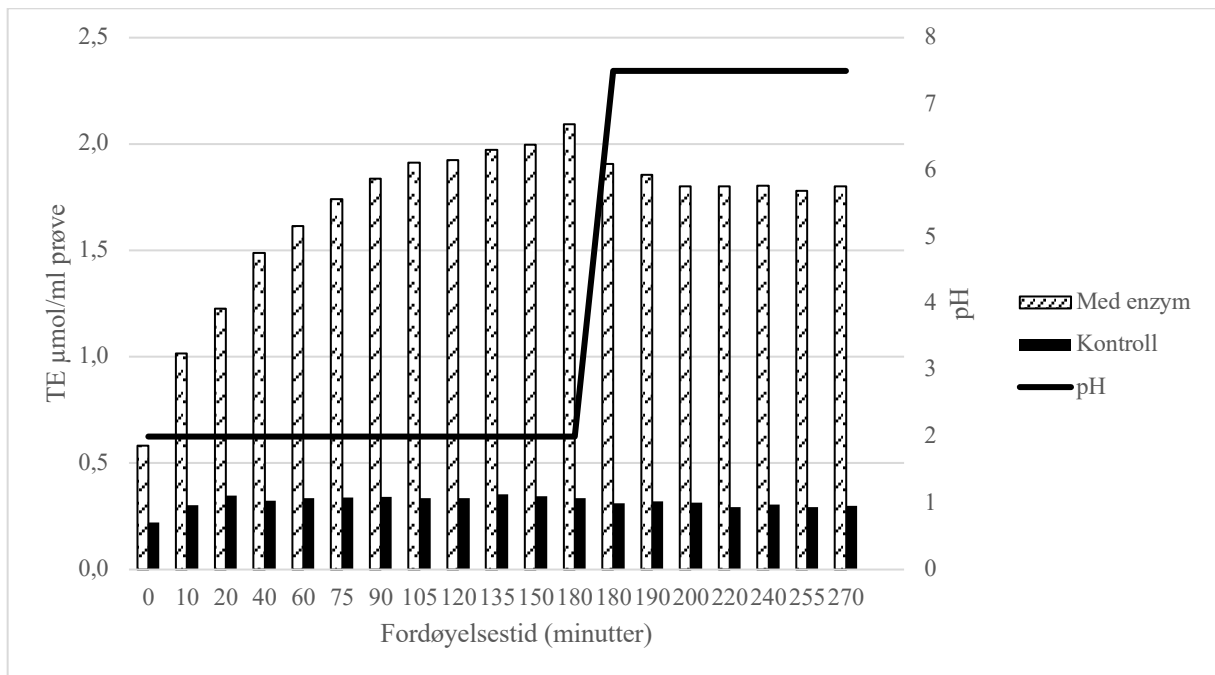


Figur 8: Konsentrasjon av TCA-løselig peptider i supernatant (TE $\mu\text{mol/ml}$) ved ulike tidspunkt i tarmfordøyelse med varmebehandlet fiskemel. Kontrollgruppen var ikke varmebehandlet.

3.4.4 Mage og tarmfordøyelse

I *in vitro* GI-fordøyelse ble de innledende forsøkene fra magesekk og tynntarmfasen satt sammen. Det ble gjennomført GI-fordøyelse med 180 min magesekkkfordøyelse og 90 min tarmfordøyelse av fiskemel (figur 9). Resultatene viste at den største frigjøringen av TCA-løselige peptider fant sted mellom 0 og 90 minutters pepsinfordøyelse med en økning på 3x den opprinnelige konsentrasjonen (0,6 til 1,8 TE $\mu\text{mol/ml}$). Etter 180 minutters fordøyelse var konsentrasjonen ca. 2,1 TE $\mu\text{mol/ml}$. Etter 180 minutter ble pH justert til 7,5, og tilsatt pankreatin (2.4.1). Konsentrasjon av frigjorte peptider ble noe redusert og stabiliserte seg på rundt 1,8 TE $\mu\text{mol/ml}$ i pankreatinfordøyelsen. I kontrollgruppen uten tilsatt enzymer var

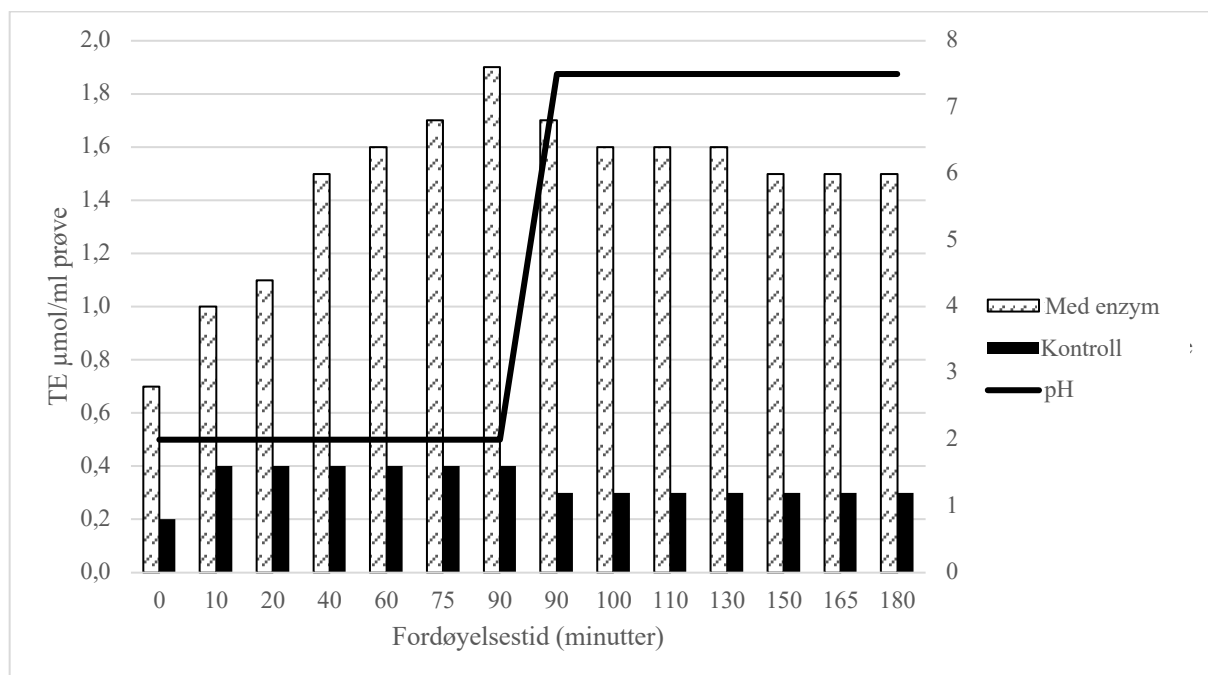
konsentrasjonen av TCA-løselige peptider stabilt lav gjennom hele forsøket (ca. 0,3 TE $\mu\text{mol/ml}$).



Figur 9: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider (TE $\mu\text{mol/ml}$) i supernatant ved ulike tidspunkt ved *in vitro* GI-fordøyelse av fiskemel. Etter 180 minutter ble pH justert til 7,5 for å simulere tarmfordøyelse.

3.5 *In vitro* gastrointestinal fordøyelse

Basert på resultatene fra innledende forsøk med fiskemel, ble det besluttet å gjøre forsøk med 90 minutters varighet for både magesekk og tynntarmfasen. Resultatene for GI-fordøyelse av fiskemel (figur 10) viste at konsentrasjon av frigjorte TCA-løselige peptider økte hele tiden mellom 0 og 90 minutter i magesekkkfasen (0,7 til 1,9 TE $\mu\text{mol/ml}$). Ved pH justering fra 2,0 til 7,5 etter 90 minutter og tilsetning av pankreatin ble konsentrasjonen av TCA-løselige peptider redusert (1,7 TE $\mu\text{mol/ml}$) og fortsatte å reduseres i løpet av 90 min tarmfordøyelse. Kontrollgruppen holdt seg relativt stabil på mellom 0,2 og 0,4 TE $\mu\text{mol/ml}$ gjennom hele fordøyelsen, med en liten reduksjon i tarmfasen.

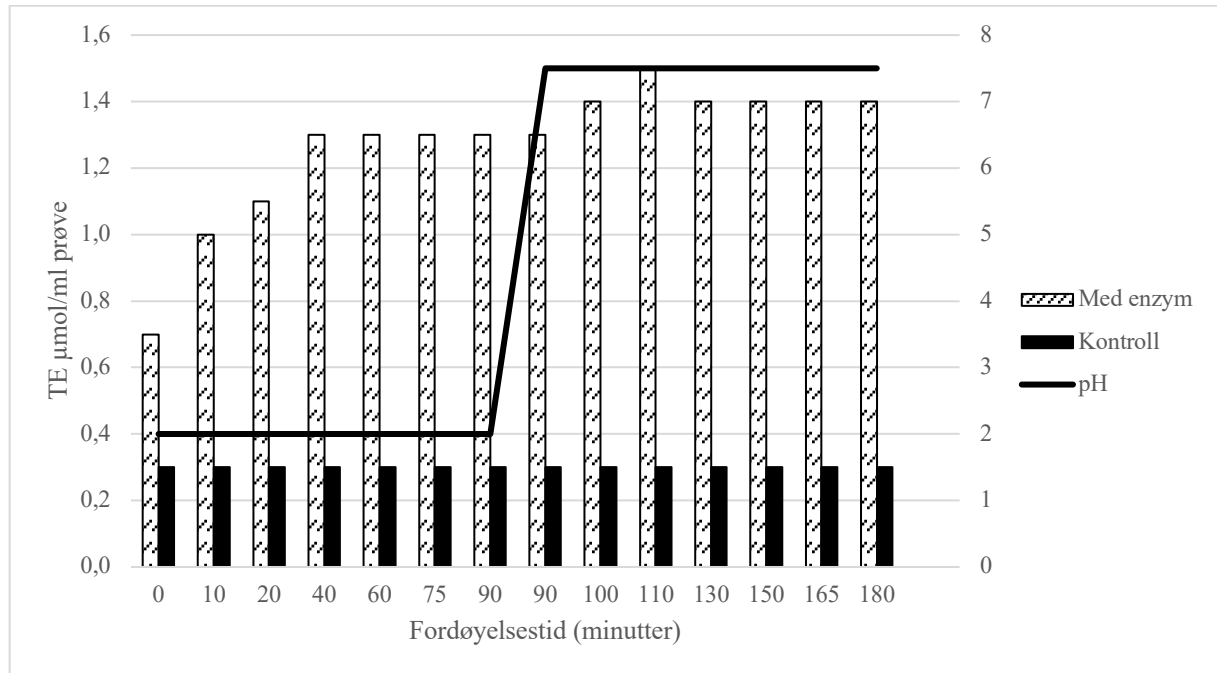


Figur 10: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider (TE $\mu\text{mol/ml}$) i supernatant ved ulike tidspunkt ved *in vitro* GI-fordøyelse av fiskemel. Etter 90 minutter ble pH justert fra 2,0 til 7,5 for å simulere tarmfordøyelse.

Resultatene fra *in vitro* GI-fordøyelse av frysetørket mel av *P. glacialis* er vist i figur 11. Allerede 0 minutter etter tilsetning av pepsin var konsentrasjonen av TCA-løselige peptider i prøven med enzym på 0,7 TE $\mu\text{mol/ml}$, noe som er mer enn det dobbelte av verdien i kontrollgruppen (0,3 TE $\mu\text{mol/ml}$) uten enzym. Pepsinbehandlingen førte til at konsentrasjonen av peptider økte i rundt 40 minutter av magesekkkfasen, for deretter å stabilisere seg på 1,3 TE $\mu\text{mol/ml}$. Etter pH ble justert til 7,5 og pankreatin ble tilsatt, økte mengden TCA-løselige peptider til 1,5 TE $\mu\text{mol/ml}$ de første 20 minuttene før den stabiliserte seg. I kontrollgruppen

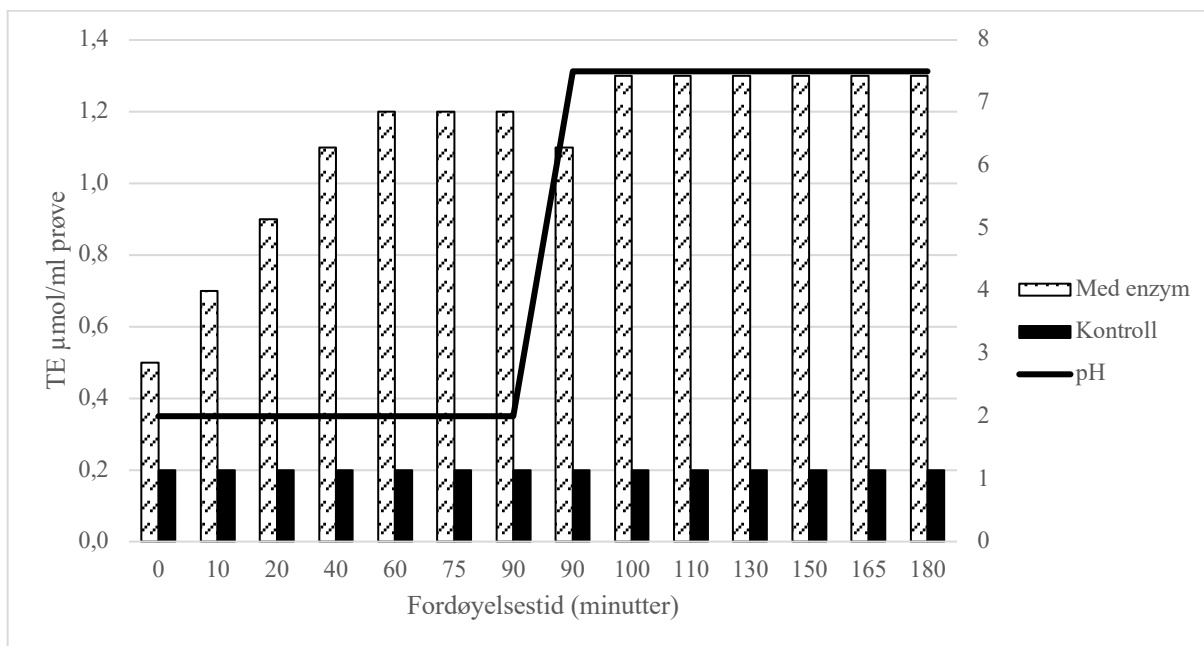
uten enzym var konsentrasjonen av TCA-løselige peptider lav og tilnærmet konstant gjennom forsøket.

Det ble også gjennomført et forsøk hvor fordøyelse av våt biomasse og frysetørket mel av *P. glacialis* ble sammenlignet (resultater ikke vist). Det var ingen signifikante forskjeller mellom forsøkene og resultatene lignet de vist i figur 11.



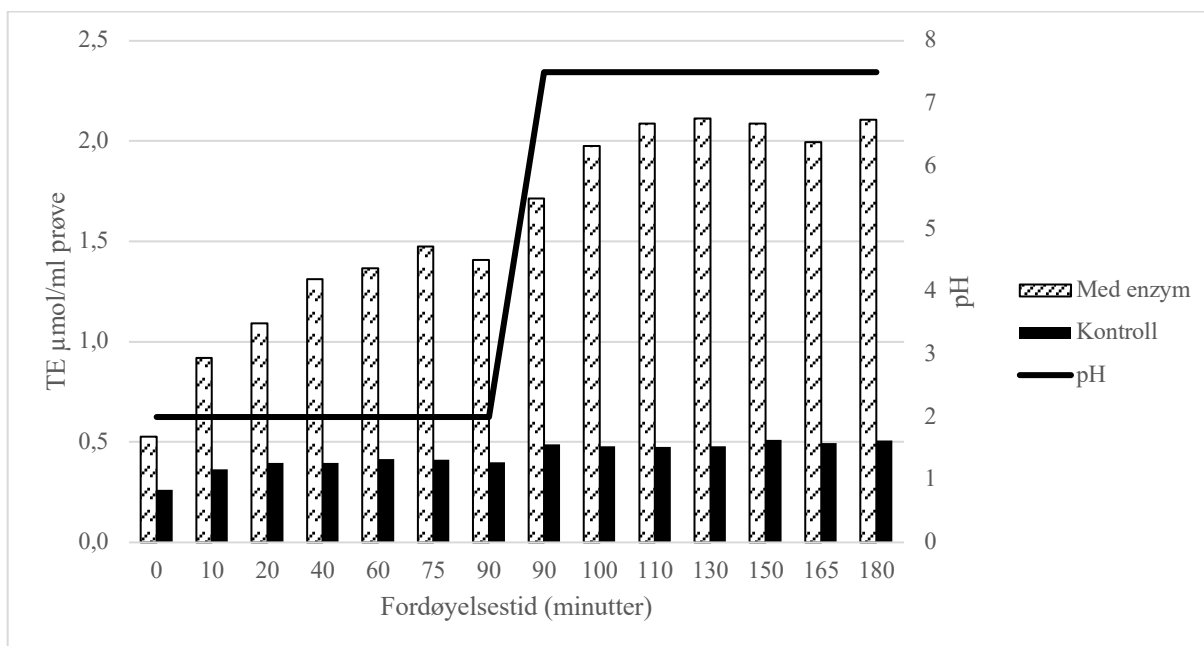
Figur 11: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider (TE $\mu\text{mol/ml}$) i supernatant ved ulike tidspunkt ved *in vitro* GI-fordøyelse av *Porosira glacialis*.

Resultatene ved *in vitro* GI-fordøyelsesforsøk av mel av *C. vulgaris* er vist i figur 12. Konsentrasjonen av TCA-løselige peptider allerede ved 0 minutter etter tilsetning av pepsin var 0,5 TE $\mu\text{mol/ml}$ prøve noe som er over dobbelt så mye som i kontrollforsøket (0,2 TE $\mu\text{mol/ml}$). I de første 60 minutter økte konsentrasjonen av TCA-løselige peptider før den stabiliserte seg på 1,2 TE $\mu\text{mol/ml}$ prøve. I tynntarmsfasen skjedde det en videre frigjøring de første 10 minutter før stabilisering på 1,3 TE $\mu\text{mol/ml}$ prøve (figur 12). Konsentrasjonen av peptider i kontrollgruppen holdt seg stabil gjennom hele forsøket (0,2 TE $\mu\text{mol/ml}$).



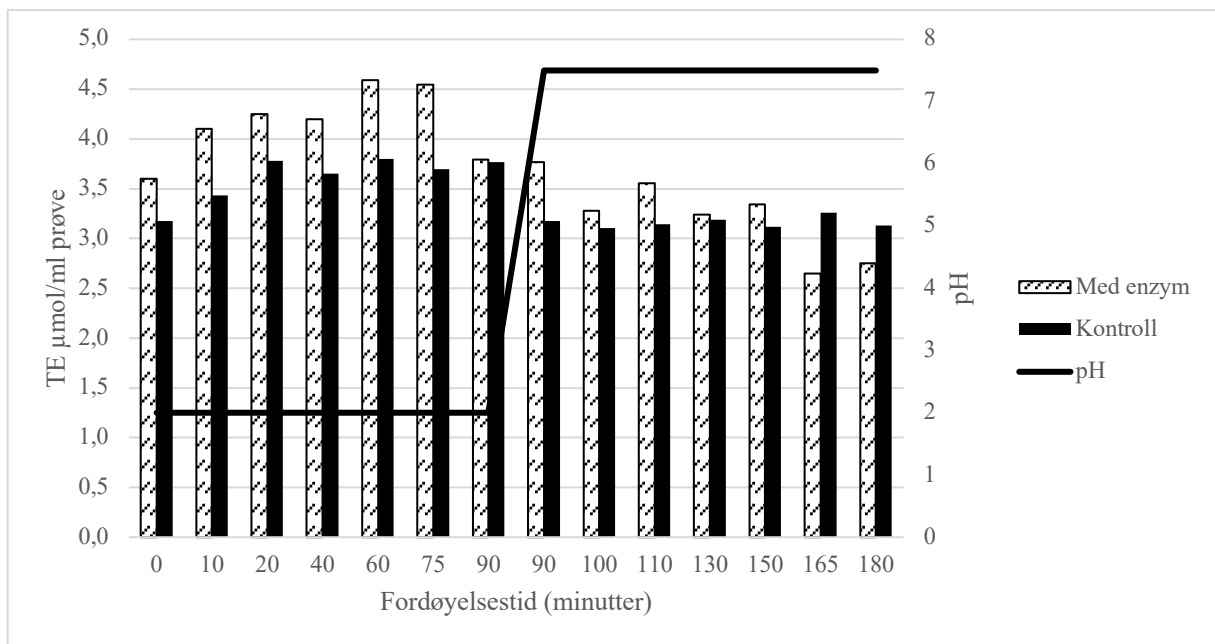
Figur 12: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider (TE µmol/ml) i supernatant ved ulike tidspunkt ved *in vitro* GI-fordøyelse av *Chlorella vulgaris*.

Resultatene fra *in vitro* GI- fordøyelse av *Odontella aurita* (figur 13), viste til en økning i konsentrasjonen av TCA-løselige peptider fra 0 minutter (0,55 TE µmol/ml) og til 60 minutter pepsinhydrolyse (1,5 TE µmol/ml). I tynntarmfasen var det en videre frigjøring de første 20 minuttene før stabilisering på rundt 2,1 TE µmol/ml. Kontrollgruppen holdt seg stabil på 0,4 i magesekkkfasen og 0,5 TE µmol/ml i tarmfasen.



Figur 13: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider (TE µmol/ml) i supernatant ved ulike tidspunkt ved *in vitro* GI-fordøyelse av *Odontella aurita*.

Resultatene fra *in vitro* fordøyelse av griselangmel viste en tilsynelatende høy konsentrasjon av TCA-løselige peptider ved 0 minutter både i kontrollprøven (3,1 TE $\mu\text{mol/ml}$) og etter tilsetning av pepsin (3,5 TE $\mu\text{mol/ml}$) (figur 14). Deretter var det svak økning frem til 60 minutter både i kontrollgruppen (3,6 TE $\mu\text{mol/ml}$) og i blandingen tilsatt pepsin (4,5 TE $\mu\text{mol/ml}$). Etter 90 minutters inkubasjon var konsentrasjonen av TCA-løselige peptider lavere og omtrent lik (3,7 TE $\mu\text{mol/ml}$) både i kontroll og ved inkubasjon av pankreatin.

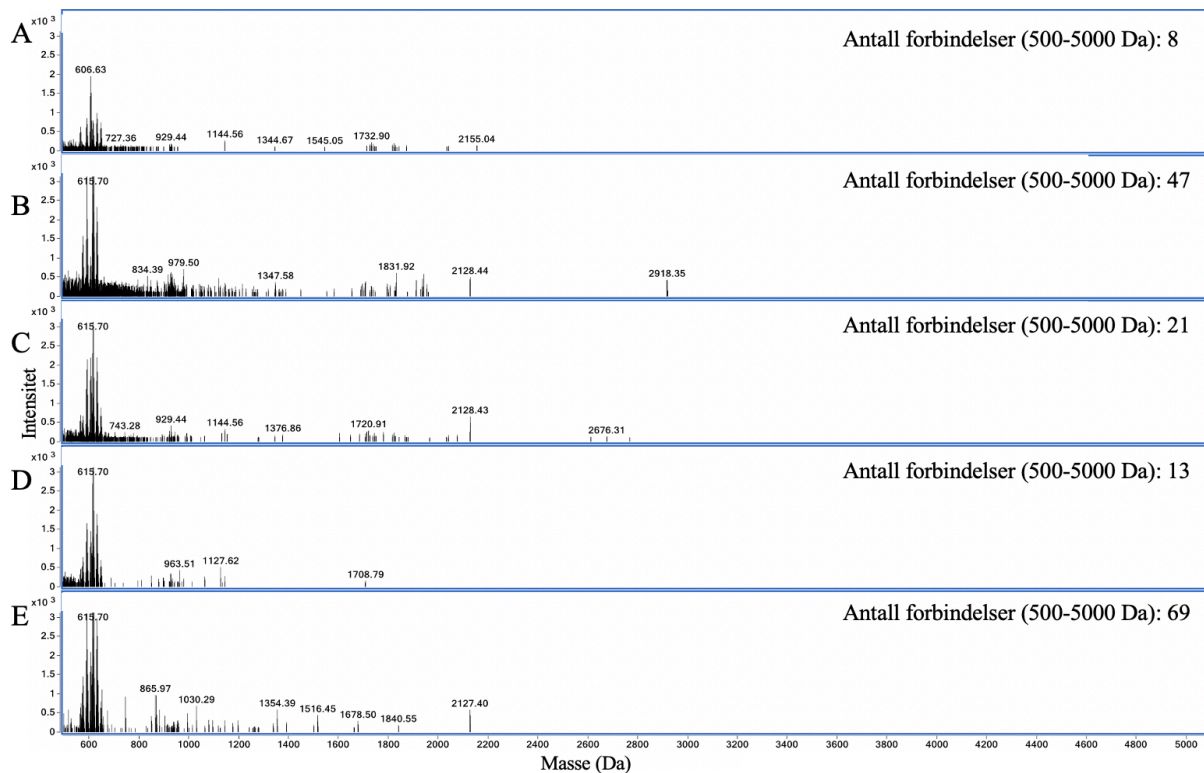


Figur 14: Konsentrasjon av TCA-løselige peptider (TE $\mu\text{mol/ml}$) i supernatant ved ulike tidspunkt ved *in vitro* GI-fordøyelse av griselang.

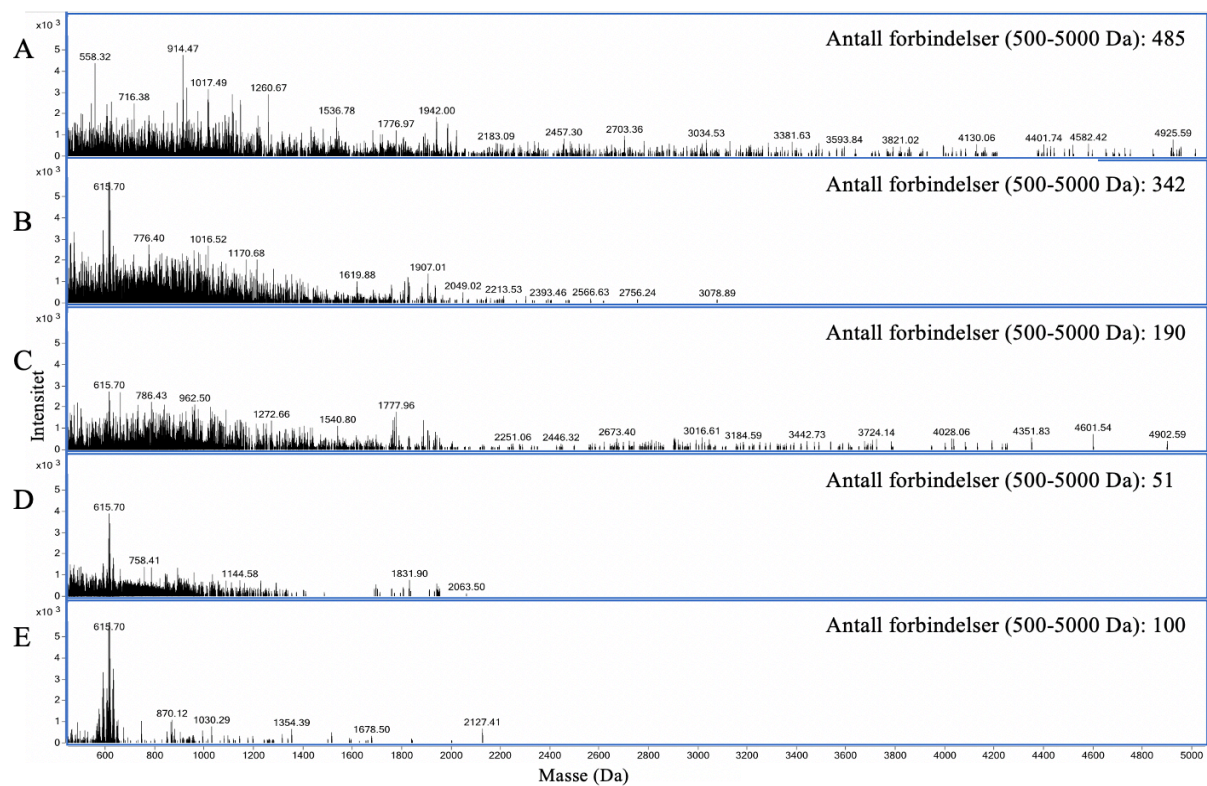
3.6 Molekylvektfordeling under GI-fordøyelse studert med UHPLC MS

Antall TCA-løselige peptider/forbindelser med molekylvekt mellom 500 til 5000 dalton (Da) ved ulike tidspunkt i *in vitro* GI-fordøyelse av fiskemel og algemelene ble undersøkt med UHPLC koblet til massespektrograf. Antall forbindelser ble undersøkt ved tidspunkt 0 og 90 min pepsinhydrolyse, og ved 180 min fordøyelse (90 min pepsin- og 90 min pankreatinfordøyelse). Prøve gjennomgått 180 min GI-fordøyelse uten enzym ble brukt som kontroll.

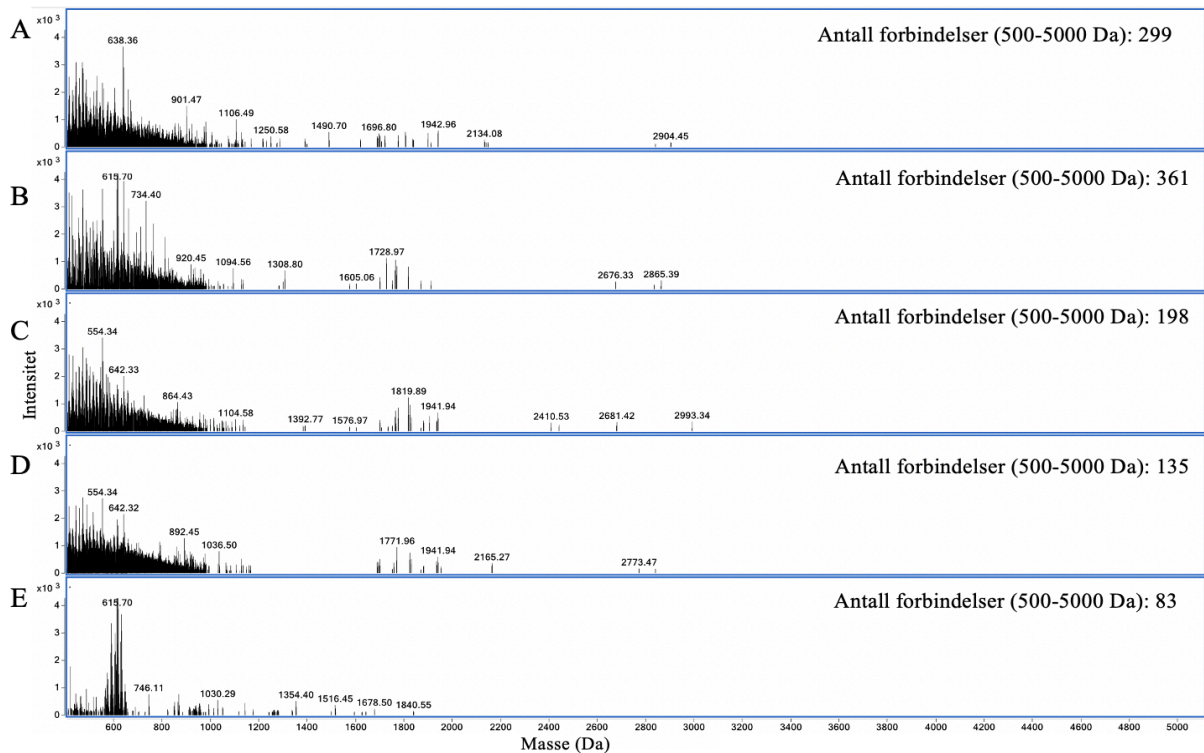
Resultatene viste en betydelig økning i antall peptider (forbindelser) med molekylvekt fra 500 til 5 000 Da fra 0 min (figur 15) til 90 min fordøyelse (figur 16) for flere av melene. For fiskemel økte antallet fra 8 (figur 15A) til 485 (figur 16A), mens tilsvarende tall for *P. glacialis* var 47 (figur 15B) og 342 (figur 16B). Ved tid 0 og 90 min ble det funnet at *C. vulgaris* inneholdt henholdsvis 21 (figur 15C) og 190 forbindelser (figur 16C) innen nevnte molekylvektssområde. For *O. aurita* økte antallet fra 13 til 51 i denne perioden (figur 15D og 16D). Griselang hadde en tilsvarende forandring på bare fra 69 (figur 15E) og til 100 (figur 16E). Ved 90 minutters tarmfordøyelse (figur 17) var antall peptider (forbindelser) innenfor det valgte molekylvektssområdet synkende i fiskemel (299) og griselang (83), svært stabilt i *P. glacialis* (361) og *C. vulgaris* (198), men økende i *O. aurita* (135). Ved sammenligning av kromatogrammene etter 90 min pepsinfordøyelse (figur 16) og 90 min tarmfordøyelse (figur 17) var det tydelig at antall større peptider (> cirka 2000 Da) var blitt redusert i fiskemel (A) og melene av *P. glacialis* (B) og *C. vulgaris* (C). Samtidig ble en høyere andel små peptider (< cirka 1000 Da) observert. Det ble også observert en litt større andel små peptider (< cirka 600 Da) i mel av *O. aurita* (D) etter 90 min tarmfordøyelse (figur 17D) sammenlignet med 90 min pepsinfordøyelse (figur 16D). Griselang viste fortsatt liten forandring fra 90 min pepsinfordøyelse (figur 16E) til 90 min tarmfordøyelse (figur 17E). Kontrollforsøkene etter 180 min GI-fordøyelse uten tilsatt enzym (figur 18) viste ingen eller bare liten forskjell i antall peptider (forbindelser) sammenlignet med etter 0 min fordøyelse med pepsin (figur 15).



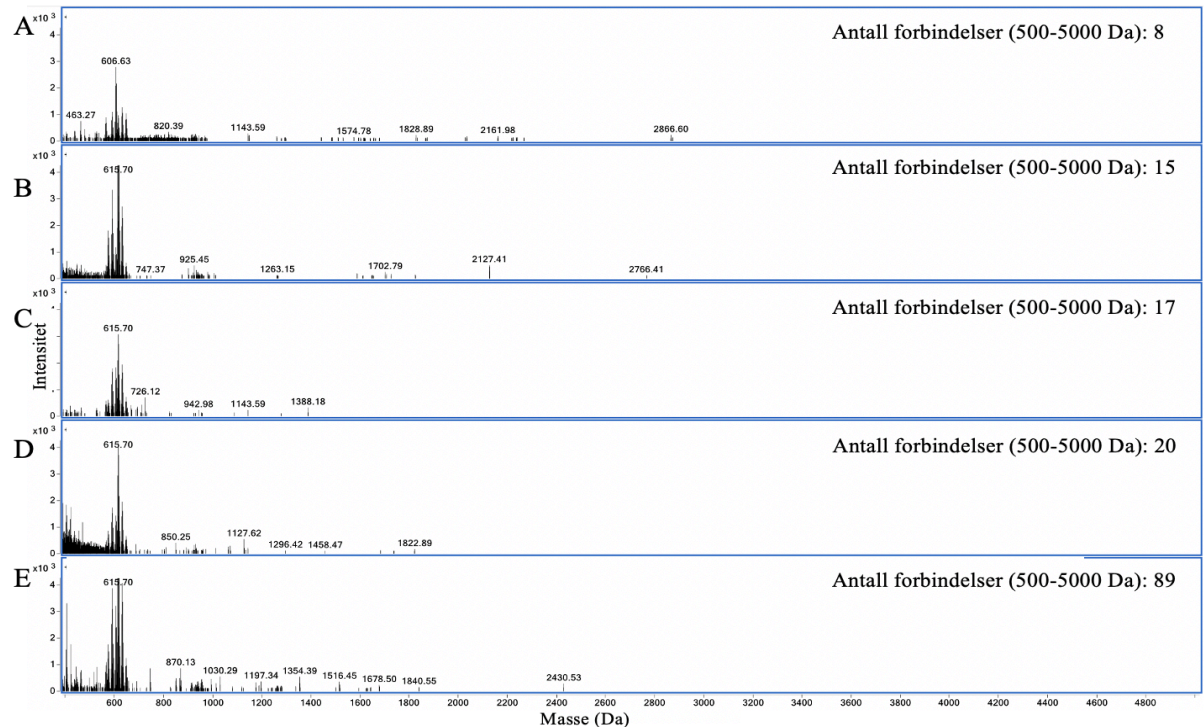
Figur 15: Antall peptider (forbindelser) med molekylvektsområde 500-5000 Da etter 0 min pepsinfordøyelse. A) fiskemel, B) *P. glacialis*, C) *C. vulgaris*, D) *O. aurita* og E) grisetang.



Figur 16: Antall peptider (forbindelser) med molekylvektsområde 500-5000 Da etter 90 min pepsinfordøyelse. A) fiskemel, B) *P. glacialis*, C) *C. vulgaris*, D) *O. aurita* og E) grisetang



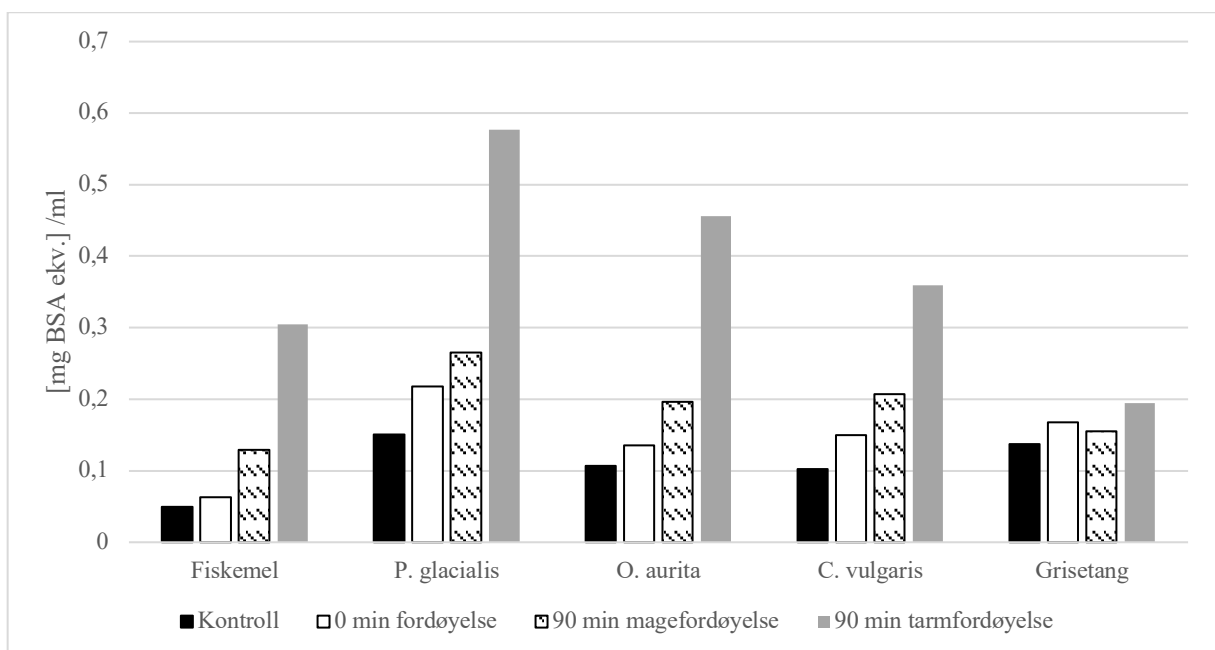
Figur 17: Antall peptider (forbindelser) med molekylvektsområde 500-5000 Da etter 90 min pepsinfordøyelse og 90 min tarmfordøyelse (180 min GI-fordøyelse). A) fiskemel, B) *P. glacialis*, C) *C. vulgaris*, D) *O. aurita* og E) grisetang



Figur 18: Antall peptider (forbindelser) med molekylvektsområde 500-5000 Da i kontrollforsøkene uten tilsatt enzym etter 180 min inkubasjon. A) fiskemel, B) *P. glacialis*, C) *C. vulgaris*, D) *O. aurita* og E) grisetang

3.7 Hydrolysegrad med OPA-metoden.

Hydrolysegraden av proteinene i fiskemel og algemelene ved *in vitro* GI-fordøyelse ble bestemt med OPA-metoden beskrevet i Materialer og metoder (2.3.10) og uttrykt som BSA ekvivalenter. Metoden kvantifiserer antall frie aminogruyper og resultatene viser at antallet øker gjennom hele fordøyelsen for fiskemel og mikroalgeomelene (figur 19). Den største økningen for disse fant sted i tarmfasen. Fordøyelsen av grisetangmel viste ingen eller bare små forskjeller i antallet frie aminogruyper gjennom den 180 minutters lange inkubasjonen. Innholdet av frie aminogruyper i kontrollgruppen for fiskemel (uten tilsatt enzym) var bare cirka halvparten av det som ble funnet i algemelene.



Figur 19: Konsentrasjon av BSA ekvivalent (mg/ml) for kontroll uten enzym (180 min inkubasjon), 0 og 90 minutters magefordøyelse, og 90 minutter tarmfordøyelse (180 min fordøyelse totalt). To paralleller ble analysert av hvert uttak.

4 Diskusjon

Det er stor etterspørsel etter alternative og mer bærekraftige proteinkilder til bruk i fiskefôr. En rekke krav må oppfylles og alternative råstoffer blir sammenlignet med dagens beste ernæringsmessige alternativ, nemlig fiskemel. Målet med masteroppgaven var å undersøke om mel av tre ulike mikroalger og en makroalge kan være mulige proteinråstoff i fiskefôr. Den kjemiske sammensetningen og *in vitro* proteinfordøyelse til algemelene ble sammenlignet med «gullstandarden» i fiskefôr, fiskemel.

Den kjemiske sammensetningen av melproduktene var ganske forskjellige (tabell 2). Proteininnholdet i fiskemel var på 51,3% som er til dels betydelig høyere enn i algemelene. Mikroalgene *P. glacialis*, *C. vulgaris* og *O. aurita* hadde et proteininnhold som var henholdsvis 17,9; 38,1 og 16,2% mens grisetang inneholdt kun 4,3% protein. Det relativt lave proteininnholdet i algemelene kommer av at disse artene inneholder mye aske (mineraler) og/eller ufordøyelig karbohydrat fra celleveggene (tabell 2). Proteininnholdet er litt mindre eller noenlunde i samsvar med tidligere rapporterte resultater. Eilertsen *et al.* (2022) fant at *P. glacialis* inneholdt 25,4-28,6% protein mens for *C. vulgaris* og *O. aurita* er det rapportert henholdsvis 51-58% (Becker, 2007) og 9,2-28,3% (Xia *et al.*, 2013) avhengig av dyrkningsbetingelser. Proteininnholdet i grisetang er forventet å være 3,5-8,2% avhengig av analysemetode (Biancarosa *et al.*, 2017; Cruz-Suárez *et al.*, 2009; Tibbetts *et al.*, 2016)

Det er kjent at kommersielt fiskemel inneholder 67-70% protein, 8-10% vann og 11-16% fett. I tillegg kommer 12-16% aske avhengig av mengden bein i råstoffet (Glencross, 2020). Proteininnholdet ble i denne masteroppgaven beregnet ut fra det totale innholdet av aminosyrer. Metoden er forventet å gi et litt for lavt innhold på grunn av at tryptofan ødelegges helt mens for eksempel tyrosin, serin og treonin delvis ødelegges under hydrolyse med 6 M HCl ved 110 °C (Fountoulakis & Lahm, 1998; Mæhre *et al.*, 2018). Kanskje den vanligste metoden for å beregne proteininnhold er å måle det totale nitrogeninnholdet med Kjeldals metode (Mæhre *et al.*, 2018). Metoden tar utgangspunkt i at protein i gjennomsnitt inneholder 16% nitrogen. Det er imidlertid sannsynlighet for noe feilaktig resultat fordi andre molekyler som f.eks. nukleinsyrer og fosfolipider også inneholder nitrogen. I tillegg kommer det at de ulike proteiner kan ha litt forskjellig innhold av nitrogen.

Karbohydratinnholdet ble estimert etter at innholdet av vann, protein, fett og akse var summert. Det relativt lave proteininnholdet funnet i fiskemel har ført til at det ble feilaktig beregnet til å inneholde ca. 20% karbohydrat. Fiskemel inneholder svært lite eller i praksis

ingen karbohydrat (Glencross, 2020; Shah *et al.*, 2018). Denne overestimeringen av karbohydrater gjelder også for algemelene, men med estimert innhold på over 50% for noen av algemelene betyr det likevel at mengden karbohydrater i disse melproduktene er høyt.

Askeinnholdet representerer mengden mineraler, som fosfor, kalsium, kalium, magnesium, mikromineraler og ikke minst silisium i kiselalger. Høyt askeinnhold i fôret til fisk kan føre til miljømessige og økonomiske konsekvenser i form av redusert fôrutnyttelse og økt utskillelse av fosfor og fett som kan føre til eutrofieringer (Shearer *et al.*, 1992). Et høyt askeinnhold i en fôringrediens vil derfor begrense hvor mye som kan inkluderes i fôret. Det høyeste askeinnholdet blant de undersøkte melene ble funnet i *P. glacialis* (50,7%) noe som skyldes innhold av silisium i kiselskallet. Grønnalgen *C. vulgaris* hadde lavest askeinnhold av de undersøkte melproduktene på 8,0%. Askeinnholdet i grisetang var 24,9% som er sammenlignbart med tidligere publiserte verdier på mellom 21,1 og 30,9% (Cruz-Suárez *et al.* 2009; Lorenzo *et al.*, 2017; Tibbetts *et al.* 2016). *O. aurita* ble funnet å ha et askeinnhold og karbohydratinnhold på henholdsvis 19,5 og 58,7% (tabell 2). Det kan synes at det er et lavt askeinnhold og høyt karbohydratinnhold til å være en kiselalge, men verdiene er i overenstemmelse med andres funn (Xia *et al.*, 2013).

Dersom man skal bruke algemel som proteinråstoff i fôr vil det føre til at fôrfaktoren og faecesvolumet øker på grunn av det høye innholdet av ufordøyelige karbohydrater og aske. I tillegg bør prisen på algemelene stå i forhold til proteininnholdet. Dersom man skal erstatte noe av fiskemelet i fôret med for eksempel mel av kiselalgene (*P. glacialis* og *O. aurita*) må man ut fra det målte proteininnhold tilsette 3 ganger større mengde i fôret. Et mulig alternativ kunne vært å ekstrahere og konsentrere protein slik man gjør med soyaprotein fra soyamel. Antinæringsstoffer vil da også i stor grad bli fjernet. Et viktig spørsmål i dette tilfellet er hva prisen på proteinkonsentratet i så fall blir.

Proteinkvaliteten gjenspeiles som tidligere nevnt også av proteinets innhold av essensielle aminosyrer. Andelen essensielle aminosyrer var 51,4% i fiskemel, 50,4% i *P. glacialis*, 61,9% i *C. vulgaris*, 48,2% i *O. aurita* og 41,4% i grisetang (tabell 3). Safi *et al.* (2013) fant i sin undersøkelse et lavere innhold essensielle aminosyrer (41%) i *C. vulgaris* enn hva som er vist i tabell 3. Dette kan forklares av det svært høye innholdet av arginin, som utgjorde mer enn 20% av aminosyrene i proteinene (tabell 3). Annen litteratur har rapportert et arginininnhold på kun 1/3 av dette (Becker, 2007; Kholif *et al.*, 2017; Lamminen *et al.*, 2017). Mye tyder på at det var noe galt med den spesifikke deteksjon av arginin i

aminosyreanalysatoren i perioden prøvene til denne masteroppgaven ble analysert. I planteråstoff er det ofte metionin og/eller lysin som er de begrensede aminosyrer (Damodaran, 1996). Det høyeste innholdet av begge disse essensielle aminosyrene ble funnet i fiskemel. I fiskemel ble det funnet 98,4 mg lysin/g protein, mens i algemelene var det mellom 55,8-76,5 mg/g protein med høyest innhold i *P. glacialis* (tabell 3). Det var 39,2 mg metionin/g protein i fiskemel, mens i algemelene varrierte mengdene mellom 18,6 og 30,2 mg/g protein med høyest mengde også her i *P. glacialis*. Det litt lavere innholdet av disse to viktige aminosyrene i algemelene vil føre til noe redusert proteinkvalitet sammenlignet med fiskemel.

Fettinnholdet i fiskemel ble i denne oppgaven funnet å være 11,0% på tørrvektbasis og dette stemmer godt overens med funnene publisert av Glencross (2020). Mikroalgene *P. glacialis*, *C. vulgaris* og *O. aurita* hadde ulike mengder fett på henholdsvis 12,1; 3,5 og 5,7%, mens grisetang hadde et innhold på kun 4,0%. (tabell 2). Annen litteratur har rapportert et fettinnhold i *P. glacialis* på rundt 10% (Artamonova *et al.*, 2017; Eilertsen *et al.*, 2022), i *C. vulgaris* på 14-22% (Becker, 2007) og i *O. aurita* på 12,8-19,7 (Xia *et al.*, 2013). I grisetang er innholdet på 2,7- 8,6% ifølge Cruz-Suárez *et al.* (2009) og Tibbetts *et al.* (2016). Når fettinnholdet i algemelene sammenlignes med fiskemel må man ha i mente at ved produksjonen av fiskemel blir fiskeolje utvunnet før proteinfasen blir tørket til fiskemel, noe som ikke ble gjort ved tørking av algene.

I fiskeførsammenheng er det først og fremst innholdet av de langkjede flerumettede omega-3 fettsyrene (LC PUFA n-3) som er av interesse ved vurdering av fettstoffer. I fiskemel utgjorde disse til sammen 35,9% av fettsyrene, mens i mel av *P. glacialis* var andelen 42,7% (tabell 4). Dalheim *et al.* (2021) fant at i olje ekstrahert fra *P. glacialis* var det 33,8% LC-PUFA n-3 og av disse utgjorde EPA ca. 86% som er i samsvar med resultatene i tabell 4. Også ifølge Dalheim *et al.* (2021) har oljesyre (18:1 n-9) og (16:4 n-1) samme elueringstid ved den gasskromatografiske analysen og i motsetning til de fleste andre oljer så fins det mye av sistnevnte fettsyre og svært lite av oljesyre i *P. glacialis*. I fett fra *O. aurita* og grisetang var innholdet av LC-PUFA n-3 lavt og i *C. vulgaris* ble det ikke påvist. Det er i overensstemmelse med med resultater publisert av Svenning *et al.* (2020) og Lorenzo *et al.* (2017).

I tabell 5 er det oppsummert hvor mye LC-PUFA n-3 det er i 100 gram av de ulike melproduktene. Her kommer det tydelig frem at det bare er fiskemel og mel av *P. glacialis* som i praksis har noe å tilføre av LC-PUFA n-3 i et fiskefôr.

In vitro fordøyelsesforsøk ble utført for å sammenligne nedbrytningen av protein i de undersøkte melene. Graden av fordøyelse ble undersøkt ved å analysere mengden trikløreddiksyre (TCA) løselige peptider som dannes under fordøyelsesforsøkene. Peptider med molekyler mindre enn 5000 Da, men ikke større peptider og intakte proteiner, er til en viss grad løselig i TCA. Peptider med molekylvekt lavere enn 2000 Da er fullstendig løselig (Yvon *et al.*, 1989). Mengden TCA-løselige peptider under inkubasjonsforløpet ble analysert med Folin & Ciocalteus fenol reagens (FC reagens) som kvantifiserer mengden fenol, det vil si aminosyren tyrosin i protein (Resultater 3.4-3.5). Molekylvektsfordelingen ble også undersøkt ved hjelp av høytrykks væskechromatografi koblet til massespektrograf (UHPLC MS; resultat 3.6). I tillegg ble hydrolysegraden bestemt ved å kvantifisere mengden frie aminogruupper med OPA metoden (resultat 3.7).

Innledende forsøk med pepsinfordøyelse av fiskemel ble gjennomført for å undersøke dannelse av TCA-løselige peptider med FC reagens som funksjon av inkubasjonstida (figur 5 og 6). Resultatene viste til en økning ved 1-2 timers inkubasjon og deretter var det ganske stabilt. Det er verdt å merke seg at allerede ved tiden 0 min etter tilsats av pepsin var innholdet av TCA-løselige peptider målt som tyrosin ekvivalenter fordoblet i forhold til kontrollgruppen uten tilsatt enzym. Dette ble observert i alle tilsvarende forsøk og indikerer at nedbrytningen av protein skjer veldig raskt etter pepsintilsetning. Det kan også være at mulige TCA-løselige peptider i selve pepsinløsningen bidrar noe.

For å undersøke hvor vidt mengden tilsatt pepsin påvirket mengden TCA-løselige peptider ble det gjort forsøk med ulike konsentrasjoner av tilsatt pepsin. Basert på resultatene fra det innledende 24 timers pepsinforsøket, ble det besluttet å gjøre uttak gjennom 4 timer (figur 7). Frigjøringen av TCA-løselige peptider økte i fiskemel og mikroalgeomelene med økt mengde pepsin, med unntak av i de to laveste konsentrasjonene i *O. aurita*, hvor det tok litt tid før prøven med tilsatt 0,8 g passerte prøven med tilsatt 0,4 g pepsin. Effekten av økt mengde tilsatt pepsin var størst i starten. Etter 0,5 timer med tilsats av 0,4 g pepsin i fiskemel (A), *P. glacialis* (B) *C. vulgaris* (C), *O. aurita* (D) og grisetang (E) var konsentrasjonen av TCA-løselige peptider på henholdsvis 1,7; 1,5; 1,6; 1,3 og 3,4 TE $\mu\text{mol/ml}$. I samme mel med tilsats av 2,0 g pepsin var mengden mer lik i melproduktene på henholdsvis 2,4; 2,4; 2,1; 2,1 og 3,5 TE $\mu\text{mol/ml}$ på samme tidspunkt. Uavhengig av tilsatt mengde pepsin var det ingen markant økning i konsentrasjonen av TCA-løselige peptider i grisetang. Dette tyder på at tilsatt mengde pepsin ikke i seg selv påvirker mengden TCA-løselige peptider.

Det er kjent at lett denaturerte proteiner fordøyes raskere enn ikke-denaturerte proteiner. I forsøk 3.4.2 ble det derfor undersøkt om 15 minutter i kokende vannbad før tilsats av pankreatin til fiskemel kunne bidra til raskere dannelsen av TCA-løselige peptider i tarmfasen (figur 8). Bare svakt større mengder ble funnet etter 30 minutter inkubasjon sammenlignet med ikke varmebehandlet fiskemel. En årsak kan være at under produksjon av fiskemel inngår varmebehandling under tørkingen. Det ble derfor valgt å ikke varmebehandle melproduktene i senere forsøk.

Resultatene etter 180 minutters magesfase i GI-fordøyelse (figur 9), viste at økningen i konsentrasjonen av TCA-løselige peptider avtok etter 90 minutter og det ble derfor besluttet å gjennomføre forsøk med en varighet på 90 minutter, både i magesekk og tarmfasen.

Resultatene fra GI-fordøyelse av fiskemel og algemelene ved å måle mengden TCA-løselige peptider med FC reagens er vist i figur 10 til 14. Som tidligere observert hadde det allerede ved 0 minutter etter tilsats av pepsin skjedd en frigjøring av TCA-løselige peptider. Mengden frigjorte TCA-løselige peptider på dette tidspunktet i forhold til kontrollgruppen (uten enzym) var 3,0x høyere i fiskemel (figur 10), 2,3x i *P. glacialis* (figur 11), 2,5x i *C. vulgaris* (figur 12), 1,7x i *O. aurita* (figur 13) og 1,1x mengden i grisetang (figur 14). Disse forskjellene mellom melene tyder på at peptidene i stor grad kommer fra nedbrytning av protein og ikke fra selve pepsinløsningen. Mengden TCA-løselige peptider fortsatte å øke i magesekkkfasen og var størst i starten av hydrolysen (ca. 0 - 60 min), før frigjøringen stabiliserte seg på ulike tidspunkt for ulike mel. Mengden TCA-løselige peptider ved stabilisering i magesekkkfasen var for fiskemel, *P. glacialis*, *C. vulgaris* og *O. aurita* henholdsvis 2,0; 1,3; 1,2 og 1,4 TE $\mu\text{mol/ml}$ prøve. Fiskemel viste en økning i mengden peptider gjennom hele den 90 min lange magesekkkfordøyelsen (figur 10). For mel av mikroalgene ble det observert en utflating av TCA-løselige peptider etter 40 til 60 min (figur 11, 12 og 13). Dette sammen med de absolutte verdier av tyrosinekvivalenter tyder på at protein i fiskemel er mer tilgjengelig for nedbrytning i magesekkkfasen enn protein av algemelene. Dette kan eventuelt forklares med at mikroalgene har cellevegger eller kiselskall som hemmer eller reduserer kontakt mellom proteinene i algene og fordøyelsesenzymene (Colgrave *et al*, 2021). Grisetang var melet som klart skilte seg ut (figur 14). Her var tilsynelatende mengden frigjort TCA-løselige peptider mye høyere enn i de andre melene gjennom hele fordøyelsen for både kontroll og enzymgruppen. Årsaken er at FC reagens, som navnet sier, (Folin & Ciocalteus fenol reagens) kvantifiserer mengden fenoler generelt og ikke bare aminosyren tyrosin som har en fenolgruppe som sidekjede (Blainski *et*

al., 2013). Makroalgene inneholder betydelige mengder polyfenoler som for eksempel tanniner og catechiner (Colgrave *et al*, 2021; Fleurence, 1999), og FC-reagens vil reagere med disse og gi et tilsynelatende høyt innhold av TCA-løselige peptider.

Resultatene fra tarmfordøyelsen av melproduktene (figur 10-14) viste en tilsynelatende liten videre nedbrytning av protein/peptider. Konsentrasjonen av peptider var uendret i *P. glacialis* (figur 11) og *C. vulgaris* (figur 12), men sank i fiskemel (figur 10) og grisetangmel (figur 14). «Fallet» i konsentrasjon kan forklares av tilsetningen av fosfatbuffer og NaOH som ble brukt for å øke pH. Stabiliseringen kan kanskje tyde på at pankreatin ikke i særlig grad bryter ned intakte ikke-TCA-løselige proteiner og større polypeptider i disse melene. Det vil si at pepsin må bryte ned proteinene først før enzymene i pankreatin kan fungere som illustrert i figur 3 i Introduksjon. Man kan i midlertid ikke si noe om størrelsene til de TCA-løselige peptidene i tarmfasen fordi den absolutte mengden tyrosin er den samme uansett om peptidene er store eller små. Det var kun mel av *O. aurita* som hadde en økning i konsentrasjonen av TCA-løselige peptider i tarmfasen.

For å undersøke om pankreatin bryter ned TCA-løselige peptider dannet under magesekkefordøyelsen ble molekylvektfordelingen undersøkt i løpet av 180 min GI-fordøyelse med UHPLC MS (figur 15-18). Antallet og størrelsen på peptider etter 90 min magesekkefordøyelse tydet på at fiskemel (figur 16A) fordøyes lettere enn mikroalgeomelene (figur 16B, C og D). Etter 90 min tarmfordøyelse (180 min totalt) var størrelsen på peptidene i alle fire melene blitt betydelig redusert (figur 17A, B, C og D). Dette bekrefter at bukspyttkjertelenzymene bryter ned de store TCA-løselige peptidene dannet under magesekkefasen. Analysene etter GI-fordøyelsen av tangmel viste at proteinene ikke ble fordøyd (figur 15E, 16E og 17E). Disse kromatogrammene var svært lik kromatogrammet fra kontrollforsøket (19E).

OPA-analyse ble brukt for å undersøke mengden frie aminogrupeer gjennom 180 minutters GI-fordøyelse for alle mel (figur 19). Resultatene viser at fiskemel hadde kun halvparten av mengden frie aminogrupeer i kontrollprøven (uten enzym) sammenlignet med kontrollgruppen i algeomelene. Dette kan forklares av at andre forbindelser enn peptider kan inneholde frie aminogrupeer. Gjennom fordøyelsen økte mengden frie aminogrupeer mest fra magesekk til tarmfasen i fiskemel og mel av mikroalger. I fiskemel økte mengden med 6x fra kontrollgruppen til 90 min tarmfordøyelse. I *P. glacialis*, *C. vulgaris* og *O. aurita* var denne økningen på henholdsvis 3,9x, 3,5x og 4,6x. For *P. glacialis* tyder resultatene på at mengden frie aminogrupeer dannes særlig i tarmfasen. OPA-analysene bekrefter at protein og peptider

hydrolyseres av pankreatin til mindre enheter i tarmfasen. I grisetang var det ingen signifikant økning i mengden aminogrupeer gjennom fordøyelsen og dette er også i overenstemmelse med resultatene fra målingene av TCA-løselige peptider og UHPLC MS- analysen.

5 Konklusjoner

Det lave proteininnholdet i algemelene og særlig mel av grisetang, gjør at de i utgangspunktet er lite egnet til bruk som proteiningredienser i fiskefôr. Innholdet av de viktige essensielle aminosyrene lysin og metionin i proteinene var også lavere i algemelene enn i fiskemel. Et høyt innhold av ufordøyelige karbohydrater og/eller aske i algemelene vil også kunne bidra til at større mengder ikke kan brukes i fôr. Det gjenstår imidlertid å undersøke om proteinene i algemelene kan ekstraheres på en kostnadseffektiv måte. Bare mel av *Porosira glacialis* og fiskemel inneholdt betydelige mengder langkjedede omega-3 fettsyrer.

In vitro fordøyelse med pepsin og pankreatin viste at protein i mikroalgemelene, spesielt *P. glacialis*, ble brutt ned nesten like effektivt som fiskemel. I magefasen dannes det et relativt høyt antall større peptider (500 – 5000 Da) som ble brutt ned til mindre forbindelser i tarmfasen. Protein i grisetangmel ble bare i liten grad brutt ned i fordøyelsesforsøkene. Det lave proteininnholdet og ufordøyeligheten gjør at melet ikke egnet seg som proteiningrediens i fôr.

6 Referanseliste

- Acién Fernández, F. G., Reis, A., Wijffels, R. H., Barbosa, M., Verdelho, V. & Llamas, B. (2021). The role of microalgae in the bioeconomy. *New Biotechnology*, **61**, 99-107.
- Ageeva, T. N. (2014). *Sammenlignende in vitro fordøyelse av fiskemuskel og kjøtt*. Masteroppgave i Fiskeri og havbruksvitenskap, UiT Norges arktiske universitet.
- Albrektsen, S., Kortet, R., Skov, P. V., Ytteborg, E., Gitlesen, S., Kleinegris, D., Mydland, L. T., Hansen, J. Ø., Lock, E. J., Mørkøre, T., James, P., Wang, X., Whitaker, R. D., Vang, B., Halten, B., Daneshvar, E., Bhatnagar, A., Jensen, L. B. & Øverland, M. (2022). Future feed resources in sustainable salmonid production: A review. *Reviews in Aquaculture*. Til trykking. Tilgjengelig på nett. DOI: 10.1111/raq.12673
- Alvheim, A. R., Kjellebold, M., Strand, E., Sanden, M. & Wiech, M. (2020). Mesopelagic species and their potential contribution to food and feed security—a case study from Norway. *Foods*, **9**, art.nr 344.
- Angell, A. R., Angell, S. F., de Nys, R. & Paul, N. A. (2016). Seaweed as a protein source for mono-gastric livestock. *Trends in Food Science & Technology*, **54**, 74-84.
- Annamalai, S. N., Das, P., Thaher, M. I., Abdul Quadir, M., Khan, S., Mahata, C. & Al Jabri, H. (2021). Nutrients and Energy Digestibility of Microalgal Biomass for Fish Feed Applications. *Sustainability*, **13**, art.nr 13211.
- AOAC. (1975). *Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists* (12. utg.).
- Artamonova, E., Vasskog, T. & Eilertsen, H. C. (2017). Lipid content and fatty acid composition of *Porosira glacialis* and *Attheya longicornis* in response to carbon dioxide (CO₂) aeration. *PLoS ONE*, **12**, e0177703.
- Beal, C. M., Gerber, L. N., Thongrod, S., Phromkunthong, W., Kiron, V., Granados, J., Archibald, I., Greene, C. H. & Huntley, M. E. (2018). Marine microalgae commercial production improves sustainability of global fisheries and aquaculture. *Scientific Reports*, **8**, art.nr 15064
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, **25**, 207-210.
- Belghit, I., Liland, N. S., Gjesdal, P., Biancarosa, I., Menchetti, E., Li, Y., Waagbø, R., Krogdahl, Å. & Lock, E.-J. (2019). Black soldier fly larvae meal can replace fish meal in diets of sea-water phase Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, **503**, 609-619.
- Biancarosa, I., Espe, M., Bruckner, C., Heesch, S., Liland, N., Waagbø, R., Torstensen, B. & Lock, E. (2017). Amino acid composition, protein content, and nitrogen-to-protein conversion factors of 21 seaweed species from Norwegian waters. *Journal of Applied Phycology*, **29**, 1001-1009.
- Blainski, A., Lopes, G. C., & De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*, **18**, 6852-6865.
- Brambilla, G. & Filippis, S. D. (2005). Trends in animal feed composition and the possible consequences on residue tests. *Analytica Chimica Acta*, **529**, 7-13.
- Cerri, R., Niccolai, A., Cardinaletti, G., Tulli, F., Mina, F., Daniso, E., Bongiorno, T., Zittelli, G. C., Biondi, N. & Tredici, M. (2021). Chemical composition and apparent digestibility of a panel of dried microalgae and cyanobacteria biomasses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **544**, art.nr 737075.
- Christie, W. W. & Han, X. (2010). *The preparation of methyl and other esters of fatty acids*. I *Lipid Analysis*, part 3, (4. utg.). Oily Press, Bridgewater, England.

- Colgrave, M. L., Dominik, S., Tobin, A. B., Stockmann, R., Simon, C., Howitt, C. A., Belobrajdic, D. P., Paull, C & Vanhercke, T. (2021). Perspectives on Future Protein Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**, 15076-15083.
- Cruz-Suárez, L. E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M., Guajardo-Barbosa, C. & Riquemarie, D. (2009). Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aquaculture Nutrition*, **15**, 421-430.
- Dalheim, L., Svenning, J. B., & Olsen, R. L. (2021). *In vitro* intestinal digestion of lipids from the marine diatom *Porosira glacialis* compared to commercial LC n-3 PUFA products. *PLoS ONE*, **16**, e02521125.
- Damodaran, S. (1996). Amino Acids, Peptides, and Proteins. I *Food Chemistry* (3. utg.), kap. 6, O. R. Fennema (red.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- De Cruz, C. R., Lubrano, A. & Gatlin III, D. M. (2018). Evaluation of microalgae concentrates as partial fishmeal replacements for hybrid striped bass *Morone* sp. *Aquaculture*, **493**, 130-136.
- Eilertsen, H. C., Eriksen, G. K., Bergum, J.-S., Strømholth, J., Elvevoll, E., Eilertsen, K.-E., Heimstad, E. S., Giæver, I. H., Israelsen, L., Svenning, J. B., Dalheim, L., Osvik, R., Hansen, E., Ingebrigtsen, R. A., Aspen, T. & Wintervoll, G.-H. (2022). Mass Cultivation of Microalgae: I. Experiences with Vertical Column Airlift Photobioreactors, Diatoms and CO₂ Sequestration. *Applied Sciences*, **12**, art.nr 3082.
- Espe, M., Berge, G. E. & Lied, E. (2001). Protein og Aminosyrer, I *Fiskeernæring*, kap. 2, R. Waagbø, M. Espe, K. Hamre og Ø. Lie, (red.), Kystnæringen Forlag og Bokklubb AS.
- FAO. (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I. & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, **29**, 751-760.
- Ferreira, I., Pinho, O., Vieira, E. & Tavarela, J. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, **21**, 77-84.
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*, **10**, 25-28.
- Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509.
- Fountoulakis, M. & Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, **826**, 109-134.
- Gephart, J. A., Henriksson, P. J., Parker, R. W., Shepon, A., Gorospe, K. D., Bergman, K., Eshel, G., Golden, C. D., Halpern, B. S., Hornborg, S., Jonell, M., Metian, M., Mifflin, K., Newton, R., Tyedmers, P., Zhang, W., Ziegler, F. & Torell, M. (2021). Environmental performance of blue foods. *Nature*, **597**, 360-365.
- Gilani, G. S., Cockell, K. A. & Sepehr, E. (2005). Effects of Antinutritional Factors on Protein Digestibility and Amino Acid Availability in Foods. *Journal of AOAC International*, **88**, 967-987.
- Gilberg, A. & Raa, J. (1983). Purification and characterization of pepsins from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and physiology. A, Comparative Physiology*, **75**, 337-342.
- Gjøsund, S. H., Skjermo, J., Forbord, S., Jafarzadeh, S., Sletta, H., Aasen, I. M., Hagemann, A., Chauton, M. S., Aursand, I. G., Evjemo, J. O., Slizyte, R., Standal, I. B., Grimsmo,

- L. & Aursand, M. (2020). *Bærekraftig fôr til norsk laks*, K. A. Almås & K. D. Josefsen, (red.). Rapport nr 01128, SINTEF Ocean AS, Trondheim.
- Gjøsæter, J. & Kawaguchi, K. (1980). A review of the world resources of mesopelagic fish. FAO Fisheries Technical Paper No. 193, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma Italia.
- Glencross, B. D. (2020). A feed is still only as good as its ingredients: An update on the nutritional research strategies for the optimal evaluation of ingredients for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition*, **26**, 1871-1883.
- Glencross, B. D., Huyben, D. & Schrama, J. W. (2020). The application of single-cell ingredients in aquaculture feeds—a review. *Fishes*, **5**, art.nr 22.
- Harnedy, P. A. & FitzGerald, R. J. (2013). Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT-Food Science and Technology*, **51**, 375-382.
- Hatlen, B., Berge, K., Nordrum, S., Johnsen, K., Kolstad, K. & Mørkøre, T. (2017). The effect of low inclusion levels of Antarctic krill (*Euphausia superba*) meal on growth performance, apparent digestibility and slaughter quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture Nutrition*, **23**, 721-729.
- Held, P. (2006). Quantitation of total protein using OPA. *Nature Methods*, | Application Notes, DOI: 10.1038/an1781.
- Hua, K., Cobcroft, J. M., Cole, A., Condon, K., Jerry, D. R., Mangott, A., Praeger, C., Vucko, M. J., Zeng, C. & Zenger, K. (2019). The future of aquatic protein: implications for protein sources in aquaculture diets. *One Earth*, **1**, 316-329.
- Irigoiien, X., Klevjer, T. A., Røstad, A., Martinez, U., Boyra, G., Acuña, J. L., Bode, A., Echevarria, F., Gonzalez-Gordillo, J. I. & Hernandez-Leon, S. (2014). Large mesopelagic fishes biomass and trophic efficiency in the open ocean. *Nature Communications*, **5**, art.nr 3271.
- Jensen, I.-J., Abrahamsen, H., Maehre, H. K. & Elvevoll, E. O. (2009). Changes in antioxidative capacity of saithe (*Pollachius virens*) and shrimp (*Pandalus borealis*) during *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 10928-10932.
- Kharas, H. (2017). The unprecedented expansion of the global middle class: An update. Working paper 100, Global Economy and Development, Brookings, Washington, USA
- Kholif, A., Elghandour, M., Salem, A., Barbabosa, A., Márquez, O. & Odongo, N. (2017). The effects of three total mixed rations with different concentrate to maize silage ratios and different levels of microalgae *Chlorella vulgaris* on *in vitro* total gas, methane and carbon dioxide production. *The Journal of Agricultural Science*, **155**, 494-507.
- 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**, 99-104.
- Kroeckel, S., Harjes, A.-G., Roth, I., Katz, H., Wuertz, S., Susenbeth, A. & Schulz, C. (2012). When a turbot catches a fly: Evaluation of a pre-pupae meal of the Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute—Growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, **364**, 345-352.
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Simpura, I., Jaakkola, S. & Vanhatalo, A. (2017). Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, **234**, 295-311.
- Li, M., Robinson, E., Oberle, D. & Lucas, P. (2010). Effects of various corn distillers by-products on growth, feed efficiency, and body composition of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture Nutrition*, **16**, 188-193.

- Llagostera, P. F., Kallas, Z., Reig, L. & De Gea, D. A. (2019). The use of insect meal as a sustainable feeding alternative in aquaculture: Current situation, Spanish consumers' perceptions and willingness to pay. *Journal of Cleaner Production*, **229**, 10-21.
- Lorenzo, J. M., Agregán, R., Munekata, P. E., Franco, D., Carballo, J., Şahin, S., Lacomba, R & Barba, F. J. (2017). Proximate composition and nutritional value of three macroalgae: *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* and *Bifurcaria bifurcata*. *Marine Drugs*, **15**, art.nr 360.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Mattilsynet. (2017). Insekter til bruk i fôr. *Faktaartikkel*. https://www.mattilsynet.no/dyr_og_dyrehold/for/insekter_til_bruk_i_for.25298
- Moore, S. & Stein, W. H. (1963). Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. *Methods in Enzymology*, **6**, 819-831
- Myhre, M. S., Richardsen, R., Nystøyl, R. & Strandheim, G. (2021). Analyse marint restråstoff 2020. Rapport nr 2021:00633, SINTEF Ocean AS, Tromsø
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O. & Jensen, I.-J. (2018). Protein determination—method matters. *Foods*, **7**, art.nr 5.
- Mæhre, H. K., Malde, M. K., Eilertsen, K. E. & Elvevoll, E. O. (2014). Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds and evaluation of their potential as food and feed. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **94**, 3281-3290.
- Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Mahata, C., Al-Jabri, H., Vatland, A. K. & Kumar, G. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*, **341**, 1-20.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000). *Lehninger Principles of Biochemistry* (3. utg.). Worth Publishers, New York.
- Nielsen, P., Petersen, D. & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, **66**, 642-646.
- Nunes, A. J., Sabry-Neto, H., Oliveira-Neto, S. & Burri, L. (2019). Feed preference and growth response of juvenile *Litopenaeus vannamei* to supplementation of marine chemoattractants in a fishmeal-challenged diet. *Journal of the World Aquaculture Society*, **50**, 1048-1063.
- Oliva-Teles, A. & Gonçalves, P. (2001). Partial replacement of fishmeal by brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diets for sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, **202**, 269-278.
- Olsen, R. E., Strand, E., Melle, W., Nørstebø, J. T., Lall, S. P., Ringø, E., Tocher, D. R. & Sprague, M. (2020). Can mesopelagic mixed layers be used as feed sources for salmon aquaculture? *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **180**, art.nr 104722.
- Olsen, R. L. & Hasan, M. R. (2012). A limited supply of fishmeal: Impact on future increases in global aquaculture production. *Trends in Food Science & Technology*, **27**, 120-128.
- Olsen, R. L. & Toppe, J. (2017). Fish silage hydrolysates: Not only a feed nutrient, but also a useful feed additive. *Trends in Food Science & Technology*, **66**, 93-97.
- Orlien, V., Aalaei, K., Poojary, M. M., Nielsen, D. S., Ahrné, L. & Carrascal, J. R. (2021). Effect of processing on in vitro digestibility (IVPD) of food proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-50. DOI: 10.1080/10408398.2021.1980763
- Poore, J. & Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, **360**, 987-992.

- Reyes, M., Rodríguez, M., Montes, J., Barroso, F. G., Fabrikov, D., Morote, E. & Sánchez-Muros, M. J. (2020). Nutritional and growth effect of insect meal inclusion on seabass (*Dicentrarchus labrax*) feeds. *Fishes*, **5**, art.nr 16.
- Rimm, E. B., Appel, L. J., Chiuve, S. E., Djoussé, L., Engler, M. B., Kris-Etherton, P. M., Mozaffarian, D., Siscovick, D. S. & Lichtenstein, A. H. (2018). Seafood long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation*, **138**, e35-e47.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C. & Pontalier, P.-Y. (2013). Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *Journal of Applied Phycology*, **25**, 523-529.
- Shah, M. R., Lutz, G. A., Alam, A., Sarker, P., Chowdhury, K., Parsaeimehr, A., Liang, Y. & Daroch, M. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, **30**, 197-213.
- Shearer, K. D., Maage, A., Opstvedt, J. & Mundheim, H. (1992). Effects of high-ash diets on growth, feed efficiency, and zinc status of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, **106**, 345-355.
- Svenning, J. B. (2020). *Towards mass cultivation of diatoms as a source of marine lipids*. Doktorgradsavhandling, UiT Norges arktiske universitet.
- Svenning, J. B., Dalheim, L., Vasskog, T., Matricon, L., Vang, B. & Olsen, R. L. (2020). Lipid yield from the diatom *Porosira glacialis* is determined by solvent choice and number of extractions, independent of cell disruption. *Scientific Reports*, **10**, art.nr 22229.
- Tacon, A. G., Hasan, M. R. & Metian, M. (2011). Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 564*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Tacon, A. G., Hasan, M. R., Subasinghe, R. P. & FAO. (2006). *Use of fishery resources as feed inputs to aquaculture development: trends and policy implications*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.
- Tibbetts, S. M., Mann, J. & Dumas, A. (2017). Apparent digestibility of nutrients, energy, essential amino acids and fatty acids of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) diets containing whole-cell or cell-ruptured *Chlorella vulgaris* meals at five dietary inclusion levels. *Aquaculture*, **481**, 25-39.
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E. & Lall, S. P. (2015). Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*, **27**, 1109-1119.
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E. & Lall, S. P. (2016). Nutritional quality of some wild and cultivated seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility. *Journal of Applied Phycology*, **28**, 3575-3585.
- Troell, M., Naylor, R. L., Metian, M., Beveridge, M., Tyedmers, P. H., Folke, C., Arrow, K. J., Barrett, S., Crépin, A.-S., Ehrlich, P. R., Gren, Å., Kautsky, N., Levin, S. A., Nyborg, K., Ôsterblom, H., Polasky, S., Scheffer, M., Walker, B. H., Xepapadeas, T. & Zeeuw, A. d. (2014). Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 13257-13263.
- Webster, C. D., Tidwell, J. H., Goodgame, L. S., Yancey, D. H. & Mackey, L. (1992). Use of soybean meal and distillers grains with solubles as partial or total replacement of fish meal in diets for channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, **106**, 301-309.

- Woodgate, S. L., Wan, A. H., Hartnett, F., Wilkinson, R. G. & Davies, S. J. (2022). The utilisation of European processed animal proteins as safe, sustainable and circular ingredients for global aquafeeds. *Reviews in Aquaculture*. Til trykking. Tilgjengelig på nett. DOI: 10.1111/raq.12663
- Xia, S., Wan, L. L., Li, A. F., Sang, M. & Zhang, C. W. (2013). Effects of nutrients and light intensity on the growth and biochemical composition of a marine microalga *Odontella aurita*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **31**, 1163-1173.
- Yarnold, J., Karan, H., Oey, M. & Hankamer, B. (2019). Microalgal aquafeeds as part of a circular bioeconomy. *Trends in Plant Science*, **24**, 959-970.
- Yvon, M., Chabanet, C., & Pélissier, J. P. (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions hypothesis on the precipitation mechanism. *International Journal of Peptide and Protein Research*, **34**, 166-176.
- Øverland, M., Mydland, L. T. & Skrede, A. (2018). Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **99**, 13-24.
- Øverland, M., Tauson, A.-H., Shearer, K. & Skrede, A. (2010). Evaluation of methane-utilising bacteria products as feed ingredients for monogastric animals. *Archives of Animal Nutrition*, **64**, 171-189.
- Aas, T. S., Grisdale-Helland, B., Terjesen, B. F. & Helland, S. J. (2006). Improved growth and nutrient utilisation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets containing a bacterial protein meal. *Aquaculture*, **259**, 365-376.
- Aas, T. S., Ytrestøyl, T. & Åsgård, T. (2019). Utilization of feed resources in the production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway: An update for 2016. *Aquaculture Reports*, **15**, art.nr 100216.
- Aas, T. S., Ytrestøyl, T. & Åsgård, T. (2022). *Utnyttelse av fôrressurser i norsk oppdrett av laks og regnbueørret i 2020*. Rapport nr 2/2022, Nofima.

