



LeppeProd



2012

# RAPPORT

**Effekt av phospholipid og hydrolysert protein i fôr til Berggylte**



Kristin Hamre, Andreas Nordgreen,  
Anne-Berit Skiftesvik, Ingegjerd Opstad,  
Øystein Sæle  
**NIFES, Nofima, Havforskningsinstituttet**  
**12.03.2012**

## Hovedkonklusjon

Dette forsøket har vist at ved tilsetning av fett i fôr til Berggylte yngel bør en stor andel være i form av fosfolipid (PL). Fôrene i forsøket var tilsatt 6% fett og når 4-6% av dette var PL, hadde fisken en tilvekst på ca 1,4 ganger tilveksten i kontrollgruppen. Forsøket varte i 8 uker.

Tilsetning av hydrolysert protein hadde ingen positiv effekt på veksten hos berggylte i dette forsøket. Fôret var i utgangspunktet tilsatt 20% rekemel og innholdet av vannløselig protein i kontrollfôret var relativt høyt. Vi kan derfor ikke konkludere endelig med at berggylte ikke trenger lett fordøyelig protein.

# Effekt av phospholipid og hydrolysert protein i fôr til Berggylte

## Innledning

Berggylte er en mageløs fisk. Der andre marine fiskelarver går gjennom en metamorfose med utvikling av mage, beholder Berggylte en morfologisk enkel tarm, med utseende som et rør. Tarmen er også kort, bare 50-75% av kroppslengden. Vi vet at Berggyltens føde består av evertebrater. Disse bruker frie aminosyrer til å osmoregulere og har et høyt innhold både av frie aminosyrer og vannløselig protein. De inneholder antagelig også lite fett, noe som gir en høy andel fosfolipid (PL), som finnes i cellemembranene. Yngre stadier av copepoder, fiskelarvers viktigste naturlige byttedyr, har også en slik sammensetning.

Hypotesen i dette studiet er at Berggylte yngel har en tarm som i funksjon ligner på tarmen hos marine fiskelarver. Det betyr at fisken har begrenset kapasitet i fordøyelsen av protein, samt i den prosessen som produserer PL til cellemembraner og transportproteiner for fett i blod. Fôr til Berggylte vil da måtte inneholde lett fordøyelig protein og en høy andel PL i fett for at fisken skal kunne fordøye og absorbere fett og protein, samt produsere cellemembraner.

Lett fordøyelig protein kan man få ved å inkubere fôrproteinene med fordøyelsesenzymer, slik at det blir hydrolysert, før det tilsettes fôret. PL fra soya er kommersielt tilgjengelig, mens PL fra marine kilder er svært kostbart og produseres kun i små volumer. Kun 6% av fettene ble tilsatt mens de resterende 10% var naturlig tilstede i fôrråvarene. Soya PL og -olje ble brukt som tilsatt fett.

## Materialer og metoder

### Hydrolysering av fiskemel

100 l springvann ble varmet i en kjøkkenkoker til 60 °C og 30 kg fiskemel ble tilsatt en kjøkkenkoker og rørt ut. 350 g Protamex (Novazymes) ble rørt ut i blandingen som ble holdt under kontinuerlig røring ved 55 – 60 °C i 60 min. Brix ble målt ved jevne mellomrom under hydrolysen. Etter endt hydrolyse ble blandingen varmet til 90 °C i løpet av 25 min for å inaktivere enzymene. Blandingene ble stående uten omrøring for å bunnfelle uløselige materiale. Væsken ble dekantert fra og silt gjennom 80 mikrometer duk. Væskefasen ble så konsentrert på inndamper for å redusere vanninnhold. Bunnfallet ble tørket i blandetørker (Forberg FT 200) og inndampert væske ble tilsatt tørken. Ferdig hydrolysert mel ble lagret kjølig i plastsekker frem til fôrproduksjon

### Fôrproduksjon

Alle ingredienser ble veid inn og blandet i en mikser i minimum 20 minutter (tabell 1 og 3). For å sikre god homogenitet av alle råvarer ble ingredienser som skulle tilføres i små mengder først blandet og mikset separat før blandingen ble tilsatt hovedingrediensen. Siden rekemelet ikke er tilsatt antioksidanter fra produsent, ble fôrblendingen tilsatt 25 mgkg<sup>-1</sup> etoxiquin (0,05 g FEQ 500 per kg fôrblending. Etoxiquin ble løst ut i 96 % Ethanol (Arcus) og blandingen ble sprøytet på fôrblendingen under kontinuerlig miksing. Alle fôrblendingene ble etter blanding siktet gjennom en industri sikt med duk på 0.6 mm (Allgaier 1200 mm). Fraksjonen som var større en 0.6 mm ble

formalt på en Retsch mølle og blandet tilbake i fôrblendinge. Dette for å unngå tetting av dyser under produksjon. Fôret ble produsert på en twin screw forsøksekstruder med dyse på 1.5 mm(Wenger). Fôret ble tørket ved 60 °C i 50-60 min i en karusell tørke. Fôret stod så i et døgn ved romtemperatur for avkjøling før det ble knust på en retsch mølle og siktet ut i ulike partikkelstørrelser. Fôret ble pakket i plastposer og lagret på kjøll ved 4 °C.

Tabell 1: Råvareinnhold (% av ww) i diett 1-4 med økende mengde soya lecithine (PL).

Diett nr:	1	2	3	4
<b>PL (% av diett)</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
Fiskemel <sup>a</sup>	41,8	41,8	41,8	41,8
Rekemel <sup>b</sup>	20	20	20	20
Hvete <sup>c</sup>	17,8	17,8	17,8	17,8
Hydrolysert fiskemel <sup>d</sup>	10	10	10	10
Soy lecithin <sup>e</sup>	0	2	4	6
Soy Oil <sup>f</sup>	6	4	2	0
Monosodiumphosphate <sup>g</sup>	2	2	2	2
Vitamin – mix <sup>h</sup>	0,31	0,31	0,31	0,31
Betaine <sup>i</sup>	1,5	1,5	1,5	1,5
Mineral mix <sup>j</sup>	0,52	0,52	0,52	0,52
Yttrium <sup>k</sup>	0,05	0,05	0,05	0,05
Carop. Pink (10%) <sup>l</sup>	0,03	0,03	0,03	0,03

<sup>a</sup>LT-Fishmeal, Karmsund Fiskemel AS, Norway

<sup>b</sup>Shrimp powder (7411), Seagarden AS, Avaldsnes Norway

<sup>c</sup>Wheat grain (510130), Norgessmøllene AS, Nesttun Norway.

<sup>d</sup>See text.

<sup>e</sup>Soylecithin GMO powder (20022), Agrosom, Mölln Germany

<sup>f</sup>Mills Soy oil. Mills DA, Sofienberg, Norway.

<sup>g</sup> D3 3000 IE<sup>-kg</sup>, E 160 mg<sup>-kg</sup>, K3 20 mg<sup>-kg</sup>, C 500 mg<sup>-kg</sup>, B1 20 mg<sup>-kg</sup>, B2 30 mg<sup>-kg</sup>, B6 25 mg<sup>-kg</sup>, B12 5 µg<sup>-kg</sup>, B5 60 mg<sup>-kg</sup>, 200 mg<sup>-kg</sup> Taurine, Folic acid 10 mg<sup>-kg</sup>, Niacin 200 mg<sup>-kg</sup>, Biotin 1 mg<sup>-kg</sup>,

<sup>h</sup> BOLIFOR® MSP, Yara AS, Norway.

<sup>i</sup>Betafin S1, Danisco Animal Nutrition, Helsinki Finland.

<sup>j</sup>Mn 30 mg<sup>-kg</sup>, Mg 750 mg<sup>-kg</sup>, Fe 60 mg<sup>-kg</sup>, Zn mg<sup>-kg</sup>, 120 mg<sup>-kg</sup>, Cu 6 mg<sup>-kg</sup>, K 800 mg<sup>-kg</sup>, Se 0,3 mg<sup>-kg</sup>.

<sup>k</sup>Yttrium(III) oxide, Reacton 99,99 %. Alfa Aesar, Ward Hill USA.

<sup>l</sup>Carophyll Pink (10 %),DSM, Basel Switzerland.

Tabell 2: Næringsinnhold (% av dw) i diett 1-4 med økende mengde soyalecithin (PL).

Diett	1	2	3	4
<b>PL (% av diett)</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
<b>Protein</b>	55,0	55,7	55,9	56,1
<b>Aske</b>	13,8	13,8	14,0	14,1
<b>Fett (Bligh and Dyer)</b>	17,6	17,1	17,1	16,3
<b>Analysert PL (% av fett)</b>	29	41	47	60

Tabell 3: Råvareinnhold (% av ww) i diett 5-8 med økende mengde hydrolysert protein (HPRO).

Diett nr	5	6	7	8
HPRO (% av protein)	0	10	25	45
Fiskemel <sup>a</sup>	52,8	42,8	27,8	7,8
Hydrolysert fiskemel <sup>b</sup>	0	10	25	45
Rekemel <sup>c</sup>	20	20	20	20
Hvete <sup>d</sup>	17,8	17,8	17,8	17,8
Fiskeolje <sup>e</sup>	3	3	3	3
Soy lecithin <sup>f</sup>	2	2	2	2
Vitamin mix <sup>g</sup>	0,31	0,31	0,31	0,31
Monosodiumphosphate <sup>h</sup>	2	2	2	2
Betaine <sup>i</sup>	1,5	1,5	1,5	1,5
Mineral mix <sup>j</sup>	0,52	0,52	0,52	0,52
Yttrium <sup>k</sup>	0,05	0,05	0,05	0,05
Carop. Pink (10%) <sup>l</sup>	0,03	0,03	0,03	0,03

<sup>a</sup>LT-Fishmeal, Karmsund Fiskemel AS, Norway

<sup>b</sup>See section \*\*\*

<sup>c</sup>Shrimp powder (7411), Seagarden AS, Avaldsnes Norway

<sup>d</sup>Wheat grain (510130), Norgesmøllene AS, Nesttun Norway.

<sup>e</sup>NorSalmoil (Batch: 11304), Egersund Sildeoljefabrikk, Egersund Norway.

<sup>f</sup>Soylecithin GMO powder (20022), Agrosom, Mölln Germany

<sup>g</sup>D3 3000 IE<sup>-kg</sup>, E 160 mg<sup>-kg</sup>, K3 20 mg<sup>-kg</sup>, C 500 mg<sup>-kg</sup>, B1 20 mg<sup>-kg</sup>, B2 30 mg<sup>-kg</sup>, B6 25 mg<sup>-kg</sup>, B12 5 µg<sup>-kg</sup>, B5 60 mg<sup>-kg</sup>, 200 mg<sup>-kg</sup> Taurine, Folic acid 10 mg<sup>-kg</sup>, Niacin 200 mg<sup>-kg</sup>, Biotin 1 mg<sup>-kg</sup>,

<sup>h</sup>BOLIFOR® MSP, Yara AS, Norway.

<sup>i</sup>Betafin S1, Danisco Animal Nutrition, Helsinki Finland.

<sup>j</sup>Mn 30 mg<sup>-kg</sup>, Mg 750 mg<sup>-kg</sup>, Fe 60 mg<sup>-kg</sup>, Zn mg<sup>-kg</sup>, 120 mg<sup>-kg</sup>, Cu 6 mg<sup>-kg</sup>, K 800 mg<sup>-kg</sup>, Se 0,3 mg<sup>-kg</sup>.

<sup>k</sup>Yttrium(III) oxide, Reacton 99,99 %. Alfa Aesar, Ward Hill USA.

<sup>l</sup>Carophyll Pink (10 %), DSM, Basel Switzerland.

### Resultater hydrolyse av fiskemel og fôrproduksjon

Alle fôrene hadde like mengder protein, fett og aske (Tabell 2 og 4) og andel PL i fettet økte fra 29 til 60 % i fôr 1-4 (Tabell 2). Innhold av PL i fôr 5-8 var 41-42% av fett, det samme som i fôr 2.

Hydrolysen av fiskemel gav en dobling i innhold av vannløselig nitrogen (tabell 5), mens protein, fett og aske innhold var relativt likt mellom det ikke hydrolyserte og hydrolyserte produktet. Det gjenstår

Tabell 4: Næringsinnhold i diett 5-8 (% av dw) med økende mengde hydrolysert protein (HPRO)

Diett	5	6	7	8
HPRO (% av protein)	0	10	25	45
Protein	56,4	56,7	56,3	56,4
Aske	14,1	14,2	14,3	14,5
Fett (Bligh and Dyer)	16,5	15,9	16,3	16,1
Vannløselig protein(% av total protein)	26,6	28,6	31,8	36
Hydrolysegrad OPA	0,6	1,1	2	3,5

Tabell 5: Analyser av fiskemel og hydrolysert fiskemel

Analyser	Fiskemel	Hydrolysert fiskemel
<b>Protein (%)</b>	69,9	70,4
<b>Fett (%)</b>	14,8	14,8
<b>Aske (%)</b>	12,6	13,9
<b>Vann (%)</b>	6,7	4,1
<b>Vannløselig råprotein (%)</b>	19,2	38,7
<b>Fosfor (ikke beinbundet) (%)</b>	0,96	0,97
<b>T-Bars (mg/kg)</b>	7	9

et par analyser for å bedre definere kvaliteten på det hydrolyserte produktet. Relativt lik mengde T-Bars i de to produktene antyder at det ikke har skjedd en kraftig oksidasjon som følge av hydrolyse og tørkeprosessen. I fôr 5-8 var det en økning på innhold av vannløselig råprotein fra ca 27 % - 36 % av totalprotein (tabell 4). Det hadde vært ønskelig med en større økning, men en 5.8 ganger økning i frie amine ender fra fôr 5-8 (tabel I 5) indikerer at det har vært god hydrolyse og dermed redusert molekylvekt i den vannløselige fraksjonen.

#### Forsøksbetingelser

Forsøksfisken var oppdrettet fra egg gytt fra stamfisk ved Austevoll Havbruksstasjon. Etter klekking ble larvene overført til 1500 L kar og vannet ble tilsatt leire. Larvene ble tilbudt anrikede rotatorier fra dag 3 til dag 19 etter klekking, og etter en dag med kombinasjonsfôring med rotatorier/*Artemia*, fikk de bare *Artemia* de neste 4 ukene. Fisken ble så overført til 500 L kar før weaning som startet med en kombinasjonsfôring med *Artemia* og weaningfôr, og der andelen av *Artemia* ble redusert gradvis. Etter 3 uker fikk fisken bare formulert fôr uten *Artemia* tilsatt i karet. I perioden før forsøksstart ble fisken holdt i 2 kar. Tjue fisk fra hvert kar ble veid til startvekt  $1,00 \pm 0,43$  g. Fisken ble overført til 24 runde 50L kar, 5 fisk om gangen, først fra det ene, så fra det andre karet, dette for å unngå forskjeller i startvekt mellom forsøks-karene. Vanntemperaturen var 16 °C, den samme temperaturen fisken hadde gått på siden klekking. Forsøkskarene fikk naturlig lys via takvinduer så fisken gikk derfor under normal døgnrytme for november/desember. Karene hadde en vannutskifting på 1.6 L/min og vannets saltholdighet var 34.7 – 34.8 ‰. Oksygen ble målt i 3 kar hver dag og holdt seg stabilt rundt 91 % gjennom hele forsøket. Alle karene ble røktet hver dag. Fiskens fôropptak fulgte dagslyset. I denne perioden, fra slutten av oktober til 20. desember tok fisken til seg fôr mellom ca. 9:30 og 16:00. Forsøket varte i 8 uker.

#### Prøvetaking

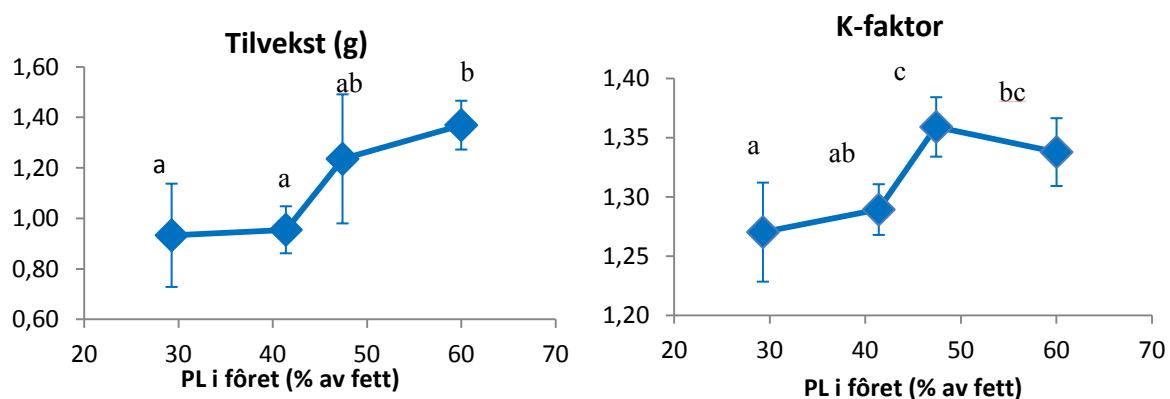
Det ble tatt vekt og lengde av 40 fisk ved start og av all fisk ved slutten av forsøket. Ved forsøksslutt visste vi at det ikke var positive effekter av å tilsette hydrolysert protein i fôret, derfor ble prøvetakingen konsentrert om den delen av forsøket som omhandlet PL. Fisken var sultet i 2 døgn før prøvetaking. Det ble tatt prøver av fisk som hadde fått fôr 1 og 3 på morgenen. Denne fisken ble så fôret mens det ble tatt prøver fra de andre karene. På slutten av dagen ble det igjen tatt prøver fra fisk som gikk på fôr 1 og 3. All fisken hadde da full tarm. Det ble dermed tatt prøver av tarm, lever, muskel og hjerne fra sultet og fôret fisk som fikk ulike nivå PL i fôret. Seks fisk per kar ble avlivet med bedøvelse, målt og veid, de ulike organene ble dissekert ut, lagt i eppendorfrør og frosset på flytende

N2. Etter transport til NIFES ble det laget en samleprøve per organ per kar som ble homogenisert under flytende N2 og så lagret ved -80°C. Disse prøvene skal brukes til å undersøke opptak, transport og metabolisme av fett i fisken, samt effekter av fôr og fôringsstatus på appetitt, ved å måle uttrykk av utvalgte gener, samt kjøre proteomics. Proteomics analysene blir finansiert gjennom et annet prosjekt på NIFES. Analysene er ikke ferdige og resultater av disse vil bli rapportert senere.

### Resultater fra vekst og overlevelse

Det ble tilsatt 6% fett i fôret. I forsøket med økende mengde PL, ble 0, 2, 4 eller 6 % av fôret tilsatt som soya PL byttet mot soya olje. Dette ga en økning i totalt PL fra 30 til 60% av fett. Råvarene bidro med 10% marint fett. Tabell 4 og figur 1 viser at tilsetning av 4-6 % PL i fôret ga økt vekst hos fisken. Blant fisken som fikk 4% PL, vokste 2 kar omtrent som fisken som fikk 6% PL og ett kar som fisken som fikk 2% PL. Overlevelse og kondisjonsfaktor var høyest hos fisk som fikk 4% PL og 2% soyaolje, men ikke signifikant høyere enn hos fisk som fikk 6% PL. Optimal andel PL ser derfor ut til å være 50-60 vekt% av fett, omtrent det samme som hos marine fiskelarver.

Det var ingen positiv effekt av å tilsette hydrolysert protein i fôret. Ved de laveste tilsetningene, 10 og 25% av proteinet, hadde fisken lavere kondisjonsfaktor og overlevelse enn i kontrollgruppen, mens ved 40% tilsetning var det ingen signifikante forskjeller i forhold til kontrollgruppen. Her er det verdt å merke seg at kontrollfôret allerede hadde et høyt innhold av vannløselig protein (27%). Det hadde vært ønskelig om kontrollfôret hadde hatt et lavere innhold av vannløselig protein for å bedre se eventuelle positiv effekt av tilsetning av hydrolysert protein. Analyse av et kommersielt larvefôr testet av flere Bergylte oppdrettere med god suksess hadde et innhold av vannløselige nitrogen på 36 % som er tilsvarende vårt høyeste nivå. Dette kommersielle fôret er også tilsatt større mengder hydrolysert protein.



Figur 1. Tilvekst og kondisjonsfaktor hos Bergylte gitt økende mengde fosfolipid i fôret. Startvekt på fisken var 1,0g. Data er gitt som snitt±std av gjennomsnittet i 3 kar.

Forskjellen på fôr 2 og 6 er at fôr 2 er tilsatt soyaolje, mens fôr 6 er tilsatt marint fett. Begge inneholder ca 40% PL av totalt fett og 10% hydrolysert protein av totalt protein. Det er ikke forskjeller i vekst, lengde eller kondisjonsfaktor ( $p=0,09-0,10$ ) mellom fisk gitt de to fôrene, men overlevelsen er signifikant forskjellig ( $p=0,02$ ). Dette skyldes antagelig forskjell i fettkvalitet.

### Konklusjon

Dette forsøket har vist at ved tilsetning av fett i fôr til Berggylte yngel bør en stor andel være i form av fosfolipid (PL). Fôrene i forsøket var tilsatt 6% fett og når 4-6% av dette var PL, hadde fisken en tilvekst på ca 1,4 ganger tilveksten i kontrollgruppen. Forsøket varte i 8 uker.

Tilsetning av hydrolysert protein hadde ingen positiv effekt på veksten hos berggylte i dette forsøket. Fôret var i utgangspunktet tilsatt 20% rekemel og innholdet av vannløselig protein i kontrollfôret var relativt høyt. Vi kan derfor ikke konkludere endelig med at berggylte ikke trenger lett fordøyelig protein.

Tabell 4. Vekst og overlevelse hos Berggylte som har fått økende andel fosfolipid (PL) eller hydrolysert protein (HPRO) i fôret. Data angir gjennomsnitt og standardavvik av snittmålinger i 3 parallelle kar. Startvekt på fisken var 1,00g. Data merket med forskjellige bokstaver innen hvert av de to forsøkene, er signifikant forskjellige. Data merket med stjerne angir forskjell mellom like fôr i forskjellige forsøk.

Fôr	PL i fôr		Sluttvekt (g)	Tilvekst (g)	Lengde (cm)	K-faktor	Overlevelse (%)
		% av fett					
1	29		1,93±0,20 <sup>a</sup>	0,93±0,20 <sup>a</sup>	5,24±0,11	1,27±0,04 <sup>a</sup>	80±4 <sup>a</sup>
2	41		1,95±0,09 <sup>a</sup>	0,95±0,09 <sup>a</sup>	5,21±0,11	1,29±0,02 <sup>ab</sup>	89±5 <sup>ab*</sup>
3	47		2,24±0,26 <sup>ab</sup>	1,24±0,26 <sup>ab</sup>	5,36±0,19	1,36±0,03 <sup>c</sup>	94±6 <sup>b</sup>
4	60		2,37±0,10 <sup>b</sup>	1,37±0,10 <sup>b</sup>	5,52±0,10	1,34±0,03 <sup>bc</sup>	81±11 <sup>ab</sup>
		HPRO i fôr					
		% av prot					
5	0		2,33±0,18	1,33±0,18	5,37±0,10	1,38±0,01 <sup>b</sup>	86±1 <sup>b</sup>
6	10		2,15±0,09	1,15±0,09	5,32±0,09	1,33±0,02 <sup>a</sup>	75±3 <sup>a*</sup>
7	25		2,18±0,18	1,18±0,18	5,35±0,14	1,34±0,01 <sup>a</sup>	77±5 <sup>a</sup>
8	40		2,25±0,06	1,25±0,06	5,41±0,07	1,36±0,03 <sup>ab</sup>	82±6 <sup>ab</sup>