

Økt utnyttelse av næringsstoffer fra marint restråstoff

Sissel Albrektsen, Erik-Jan Lock*, Grete Bæverfjord, Mona Pedersen, Harald Takle, Robin Ørnsrud*, Eva Veiseth-Kent, Rune Waagbø* og Elisabeth Ytteborg (*NIFES, 5004 Bergen, Norge)





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 400 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på seks ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra, Averøy og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Postboks 1425 Oasen
NO-5828 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølseng
NO-6600 Sunndalsøra

Averøy:

Ekkilsøy
NO-6530 Averøy

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140
Faks: 64 94 33 14
E-post: post@nofima.no
Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

	ISBN 978-82-8296-169-1 trykt ISBN 978-82-8296-170-7 pdf ISSN 1890-579X
Tittel: Økt utnyttelse av næringsstoffer fra marint restråstoff	<i>Rapportnr.:</i> 11/2014 <i>Tilgjengelighet:</i> Åpen
<i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Sissel Albrektsen, Erik-Jan Lock, Grete Bæverfjord, Mona Pedersen, Harald Takle, Robin Ørnstrud, Eva Veiseth-Kent, Rune Waagbø og Elisabeth Ytteborg	<i>Dato:</i> 6. februar 2014
<i>Avdeling:</i> Ernæring og fôrteknologi	<i>Ant. sider og vedlegg:</i> 14
<i>Oppdragsgiver:</i> Fiskeri- og Havbruksnæringens forskningsfond (FHF)	<i>Oppdragsgivers ref.:</i> FHF # 900558
<i>Stikkord:</i> Sildeavskjær, biprodukter, fosfor, syrehydrolyse, laks	<i>Prosjektnr.:</i> 21109
<i>Sammendrag/anbefalinger:</i>	
<p>Utvikling av nye, marine fosfor (P) kilder vil være avgjørende for fremtidig vekst i akvakulturproduksjonen. Dette prosjektet hadde som mål å øke verdiskapningen fra marint restråstoff ved å utvikle bioteknologiske løsninger som kan øke tilgjengeligheten av næringsstoffer i fiskebein og bidra til en bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser. En prosess for bearbeiding og syrebehandling av sildeavskjær for å frigjøre mineraler fra beinfraksjonen ble utviklet og optimalisert. Utnyttelsen av P fra sildeavskjær ble dokumentert i forsøk med lakseyngel under startfôring og laksesmolt etter sjøutsett. Resultatene viste at omtrent 90 % av P i beinfraksjon fra sildeavskjær kan frigjøres, og at tilgjengeligheten av P er like god som for rene, krystallinske former av P (mono Na-P) i forsøk med laksesmolt. I forsøk med lakseyngel fra startfôring og fram til 30 g størrelse ble det påvist at P hydrolysert fra beinfraksjon av sildeavskjær kan utnyttes effektivt til å opprettholde normal vekst, mineralisering og skjelettutvikling i lakseyngel, men at tilgjengeligheten av P kan være litt lavere enn for Na-P på de tidligste utviklingsstadier før fisken når 15g. Et faglig grunnlag for formulering av fôr med fiskebeinhydrolysat nær reelt P behov ble lagt ved hjelp av en metode som måler ikke-beinbundet P; uttrykt som «løselig P». Ved et innhold av løselig P rundt 0,80 % under startfôring og 0,70 % i perioden rett etter sjøutsett var P behovet hos fisken dekket. Ved formulering av fôr med fiskebeinhydrolysat nær reelt P behov kan man oppnå maksimal P fordøyelighet og P retensjon i fisk og redusert utslipp til miljøet.</p> <p><i>I dette prosjektet ble det vist at det ligger en betydelig økonomisk og miljømessig gevinst basert på bedre utnyttelse av P fra marine biprodukt og redusert behov for å tilsette mineraler i fôret. Prosjektet har bidratt til å utvikle en mer bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser.</i></p>	
<i>English summary/recommendation:</i>	
<p>The aim of the present study was to solubilize nutrients in fish bones and make them more bioavailable in order to contribute to a more sustainable, cost-efficient and environmentally friendly use of available marine feed resources. A technological process using acid treatment of cut-offs from herring was developed and optimized to produce fish bone hydrolysate (FBH). The utilization of P from FBH was tested in feeding trials with A. salmon fry and smolts. The results showed that approximately 90% of P from bone can be liberated and that the availability was equally high as for crystalline P (mono Na-P) in smolts. In the trial with salmon fry, P from herring FBH was shown to efficiently sustain normal growth, mineralization and skeletal development. However, the availability of P seemed to be slightly lower for fry than for smolt. A method that measured "soluble P", i.e. the non-bound P in the bone was developed and proved to be a useful measure of available P. Soluble P at 0.8% during start feeding and 0.7% after sea water transfer covered the requirement for P. By formulating feeds with P from FBH close to the P requirement, maximum P digestibility and retention in addition to reduced environmental impact can be achieved. In conclusion, the results showed that P in fish bones can be made available by acid hydrolysis, and that FBH can provide adequate P for normal growth, mineralisation and skeletal development similar to P from mono Na-phosphate salts in diets of Atlantic salmon smolt.</p>	

Innhold

1. Bakgrunn og mål	1
2. Prosjektorganisering	2
3. Hovedleveranser og resultat.....	3
Delmål 1: Utvikle nye prosesslinjer for økt mineralutnyttelse fra fiskebein.....	4
Delmål 2: Utvikle nye prosesslinjer for økt proteinutnyttelse fra fiskebein	4
Delmål 3: Dokumentere merverdien av nye marine fôringredienser til fisk.....	5
Delmål 4. Dokumentere miljøeffekter.....	6
4. Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater	8
5. Prosjektgjennomføring og ressursutnyttelse.....	9
6. Nytteverdi og implementering av resultatene i industrien	10
7. Videre FoU behov.....	11
8. Planlagte publikasjoner med referee	12
9. Formidlingsplan i etterkant av prosjektperioden	13
10. Referanser	14

1 Bakgrunn og mål

EU har identifisert redusert tilgang på fosfor (P) som en av de største utfordringene for Europa i det 21. århundret og EU Kommisjonen har iverksatt en rekke initiativ for å redusere overforbruk av denne knappe ressursen (<http://www.phosphorusplatform.eu/>). Marine biprodukter representerer en stor potensiell P kilde for akvakulturproduksjon. Volumet av restråstoff fra pelagisk sektor, oppdrettsfisk og fiskeri i Norge utgjør ca. 929.000 tonn (SINTEF 2012), hvorav 326', 247' og 350' fra hvitfisk, pelagisk fisk og havbrukssektoren. Mye av biproduktene fra pelagisk sektor anvendes i dag som råstoff til fiskemelproduksjon. En betydelig del av næringsstoffene i beinfraksjonen foreligger som tungt løselige komplekser (mineraler i hydroksyapatitt og proteiner i kollagenprotein) som er lite fordøyelig og tilgjengelig for fisk. Nofima har lenge jobbet med å utvikle en prosess for å gjøre særlig mineraler i fiskebein mer vannløselig og lettere tilgjengelig for laks. Det er dokumentert i forsøk med laks at fordøyeligheten av P i beinmel fra kolmule kan økes fra 30 til 50 % ved syre-behandling av beinfraksjon og at P frigjort fra kolmulebein gir minst like god effekt på vekst, mineralisering og skjelettutvikling i laks som andre lett løselige Na salter av P (Albrektsen et al., 2010, 2013). Utvikling av nye marine P kilder og retningslinjer for å dekke fiskens P behov vil være avgjørende for fremtidig vekst i akvakulturproduksjonen, både økonomisk og miljømessig.

Hovedmål

Øke verdiskapningen av marint restråstoff ved å utvikle bioteknologiske løsninger som kan øke tilgjengeligheten av næringsstoffer i fiskebein og bidra til en bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser.

Delmål

- Utvikle nye prosesslinjer for økt mineralutnyttelse fra fiskebein
- Utvikle nye prosesslinjer for økt proteinutnyttelse fra fiskebein
- Dokumentere merverdi av nye marine ingredienser som fôrmiddel til fisk
- Dokumentere miljøeffekter

2 Prosjektorganisering

Prosjekt #90558 er et samarbeidsprosjekt mellom Nofima og NIFES, der Nofima har prosjektledelsen. Prosjektet har ikke en formell styringsgruppe, men representanter fra fôrindustrien (Skretting, Ewos, Biomar og Polarfeed) har vært invitert til prosjektets årlige workshoper.

Nofima har hatt ansvar for bearbeiding og hydrolyse av fiskeavskjær, produksjon av nye fôringredienser og forsøksfôr, og for gjennomføring av 2 fiskeforsøk. Mye av det analytiske er gjennomført ved Nofima, både kjemiske basisanalyser og molekylærbiologiske analyser i tarm og beinvev, herunder genmarkører for opptak av mineraler i tarm og genmarkører for brusk og beinutvikling i virvler.

NIFES har hatt ansvar for å analysere makro- og mikromineraler i alle vev ved alle uttak, og har dokumentert effekter av P på sensitive P -markører i bein og skjell (ALP, TRAP), og på plasma vitamin D₃ metabolitter som er viktig for P homeostase i fisk.

3 Hovedleveranser og resultat

Prosjektet har generert 2 hovedrapporter fra henholdsvis smoltforsøket og startfôringsforsøket med laks, og en samlerapport som beskriver resultat fra flere *in vitro* forsøk med leverceller. Rapportene er skrevet på manuskriptform og skal bearbeides videre til publisering i internasjonalt anerkjente tidsskrift i 2014. Prosjektet har gjennomført 3 workshops (2010, 2011, 2012), 1 FHF fakta ark (2011), 6 foredrag (Aquafeed horizon 2011, NFR Havbrukskonferanse 2012, ISFNF Molde 2012, Farm animal proteomics, COST Action 2013, FHF Verdikjede Havbruk 2013, FHF Marint restråstoff 2013), 1 short note i proceedings (*Farm animal proteomics 2013*), 1 poster (EuPA 2013 Scientific meeting) og 1 populærvitenskapelig artikkel på løselig P (Norsk Fiskeoppdrett, 2013) foruten at det er publisert 3 prosjekttaler (Fiskaren 2011, Biomening Fiskaren 2011, Norsk Fiskerinæring 2012). Det er påmeldt 2 nye foredrag vår 2014 (Programkonferanse HAVBRUK i Tromsø og ISFNF XVI i Cairns, Australia) der resultat fra prosjektet skal formidles dersom foredrag blir akseptert.

En oppsummering av prosjektet vil bli presentert på Nofimas webside, og det gjenstår å formulere et FHF faktaark (2014) og en populærvitenskapelig artikkel i Norsk Fiskeoppdrett (2014), samt å gjennomføre en avsluttende workshop (2014).

Resultatene for de ulike delmålene er presentert i de påfølgende kapitlene.

Hovedresultatene og prosjektleveranser er kort oppsummert under:

- En alternativ prosess for bearbeiding og syrebehandling av sildeavskjær for å frigjøre mineraler fra beinfraksjonen er utviklet og optimalisert.
- Nye P ingredienser fra sildeavskjær er utviklet og utnyttelsen av P fra denne fôringrediensen er dokumentert på to ulike stadier i laksens utvikling; lakseyngel under startfôring og laksesmolt etter sjøutsett.
- Det er dokumentert at omtrent 90 % av P i beinfraksjon fra sildeavskjær kan frigjøres og at tilgjengeligheten av P i FBH er like god som for mono-Na-P i laksesmolt basert på vekst, P fordøyelighet, P status i hel kropp, bein og skjell og P retensjon i hel fisk, samt gjennom røntgen og molekylære analyser.
- Det er funnet oppregulering av en markør for opptak av P i tarm (NaP1) og av en markør for beinutvikling i virvler (ALP) i smolt fôret med suboptimalt P nivå i fôret, noe som indikerer at disse markørene kan fungere som sensitive P mangelmarkører.
- Det er lagt et grunnlag for hvordan transkripsjonsprofilene til en rekke opptaksmarkører i tarm ser ut ved suboptimale P nivåer, denne profilen vil kunne brukes som en referanse ved fremtidige, tilsvarende problemstillinger.
- I forsøk med lakseyngel fra startfôring er det vist at P hydrolysert fra beinfraksjon av sildeavskjær kan utnyttes effektivt til å opprettholde normal vekst, mineralisering og skjelettutvikling, men at tilgjengeligheten av P kan være litt lavere enn for Na -P i lakseyngel, på de tidligste utviklingsstadier før fisken når 15g størrelse.
- Dokumenterte cellulære effekter av suboptimal P fôring på vevsnivå har bidratt til å utvide vår generelle kunnskap og samtidig gitt oss en dypere forståelse av mekanismer involvert i beindannelse hos lakseyngel, der tilgang til en omfattende og komplementær metodepakke har vært avgjørende.

- Behovet for P målt som løselig P i fôr til laks er dokumentert under startfôring til 0,80 % løselig P, og i perioden rett etter sjøutsett til 0,70 % løselig P.
- Prosjektet har vist at analyse av løselig P (ikke beinbundet P) gir et sikrere grunnlag for å anslå P tilgjengelighet fra fôr og fôringredienser enn å analysere total P.
- Et faglig grunnlag for formulering av fôr nær reelt P behov basert på løselig P er dokumentert i prosjektet – dette gjør det mulig å oppnå maksimal P fordøyelighet og P retensjon i fisk og redusert utslipp til miljøet.
- Det er dokumentert at det ligger en betydelig miljømessig gevinst basert på bedre utnyttelse av P fra marine biprodukt og redusert behov for å tilsette mineraler i fôret.

Resultatene totalt i prosjektet har bidratt til å utvikle en mer bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser.

Delmål 1: Utvikle nye prosesslinjer for økt mineralutnyttelse fra fiskebein

Innledningsvis ble det gjennomført laboratorieforsøk for å optimalisere prosessbetingelser for syrehydrolyse av rensede sildebein der effekt av syrekonsentrasjon for å frigjøre mest mulig P fra bein ble testet under kontrollerte betingelser. Andre fysiske parametere som temperatur, tid, syre/bein ratio, vannmengde, nøytraliseringsmiddel (KOH, NH₃ løsning) og pH optimum for nøytralisering er tidligere testet med andre råstofftyper og erfaringene ble brukt i pilotproduksjon av P fra sildeavskjær. Sildebein inneholder mindre aske og mineraler, samt mer fett enn kolmulebein. Resultatene fra pilotforsøket viste at behovet for syre og nøytraliseringsmiddel for hydrolyse av sildebein var lavere enn for kolmule, samtidig som det oppstod produksjonstekniske utfordringer i form av protein- og saltutfellinger, høyere fettinnhold som krevde separasjon, og etter hvert problemstillinger omkring riktig valg av nøytraliseringsmiddel basert på erfaringer i forsøk med laks. *Det er utviklet et teknologisk grunnlag for produksjon av nye marine P ingredienser fra sildebein, ingrediensene er testet i forsøk med laks, og det er lagt et faglig grunnlag for kommersialisering av FoU resultat.*

Dersom teknologien blir tatt i bruk i fiskemel- og fiskeindustri, må det jobbes videre med å utvikle optimale industrielle løsninger. Nærmere detaljer for behandling og syrehydrolyse av sildeavskjær er gitt i de to hovedrapportene.

Delmål 2: Utvikle nye prosesslinjer for økt proteinutnyttelse fra fiskebein

Etter at mineralene er frigitt ved syrehydrolyse av sildebein står man igjen med en betydelig restfraksjon av kollagenprotein. Kollagener har lav fordøyelighet og det er derfor gjennomført forsøk med varmebehandling for å bryte ned den komplekse trippel-heliksstrukturen i kollagen til kortere proteinkjeder, mindre peptider og frie aminosyrer. I prosjektet er det framstilt 3 ulike kollagen- ingredienser basert på henholdsvis A) Ubehandlet kollagen fra sildebein (restprotein i bein etter syrehydrolyse); B) Varmebehandlet kollagen fra sildebein (120 °C/60min i autoklav); og C) Enzymbehandlet kollagen fra sildebein (Papain, Promod 144P). Kjemiske analyser viste at både varmebehandling og enzymbehandling brøt ned kollagenprotein til mindre peptider og frie aminosyrer og det ble registrert høyt utbytte i prosessen. Det ble framstilt nye marine proteiningredienser i tilstrekkelige mengder til å gjennomføre forsøk med mink for å analysere effekter på fordøyelighet av protein. Mink fôret med samtlige 3 kilder til kollagen fikk diare av ukjente årsaker og forsøket måtte avsluttes i løpet av kort tid. *Det er behov for å gå igjennom det*

metodiske oppsettet og prøve å forstå mulige årsaker. Det er foreløpig ikke skrevet en oppsummerende rapport for dette delmålet.

Delmål 3: Dokumentere merverdien av nye marine fôringsredienser til fisk

Planlagte FoU aktiviteter er gjennomført når det gjelder framstilling av fiskebeinhydrolysat fra sildeavskjær og uttesting av nye P ingredienser i forsøk med laks. Det er gjennomført fôringsforsøk med laks både i ferskvann og i sjøvann for å kartlegge forskjeller i mineralbehov i de ulike livsfasene, for å dokumentere effekter av alternative P kilder i fôr til laks på ulike utviklingstrinn og for å studere mulige merverdi av å fôre laks med en balansert kilde til mineraler helt fra startfôring med tanke på hvordan dette vil påvirke skjelettutvikling på de tidlige utviklingstrinnene.

Våren 2011 ble det gjennomført et forsøk med 0+ høstsmolt der effekter av nye marine P ingredienser produsert fra pelagisk fisk (kolmule og sild) ble studert. Forsøket ble evaluert basert på vekst, fôrutnyttelse, fordøyelighet av P og andre næringsstoffer, retensjon av P i hel fisk, røntgen analyser av skjelett, samt mineralinnhold i hel fisk, bein, skjell og plasma. Molekylære markører for opptak av ulike mineraler i tarm samt enzymmarkører av betydning for mineralopptak og resorpsjon i bein og skjell (ALP, TRAP) ble analysert for å vurdere egnethet av disse markører som tidlig indikatorer på mineraleffekter før kritiske tilstander oppstår i fisk. *Hovedkonklusjonen fra forsøket er at P fra fiskebeinhydrolysat er like biologisk tilgjengelig som rene krystallinske former av mineralet (mono Na-P) og ga god vekst og mineralstatus i hurtigvoksende laksesmolt rett etter utsett. Behovet for P, uttrykt som løselig P, i laksesmolt rett etter sjøutsett er i nærheten av 0,70 %.*

Våren 2012 ble det gjennomført et startfôringsforsøk for å undersøke effekter av P fra sildebeinhydrolysat på vekst og mineralisering i lakseyngel, og for å studere hvordan den alternative P kilden kan påvirke beinutvikling på tidlige utviklingstrinn. Forsøket inkluderte en lav P kontrolldiett og graderte nivåer av P fra henholdsvis syrehydrolysert beinhydrolysat (FBH sild) og fra et lett løselig kommersielt mono-Na-P salt. Behovet for P i lakseyngel under startfôring er høyere enn for smolt, minimum 0,80 % løselig P basert på resultat for vekst, mineralisering i hel fisk og bein, røntgen, FTIR og gjennom studier av ulike molekulære markører for brus og bein. FTIR analyser og molekulære markører for brus og beinutvikling indikerer at 0,65 % løselig P er utilstrekkelig og mer begrensende for normal beinutvikling basert på P fra FBH sild enn for Na-P, mens løselig P på 0,80 % i fôret ikke gir avvik for noen av P kildene. Dette indikerer at P ingrediensen i seg selv ikke er begrensende for normal beinutvikling, men at det kreves noe høyere tilførsel av P fra FBH for å oppnå et tilsvarende godt produksjonsresultat. Dette kan skyldes litt lavere P tilgjengelighet fra FBH, alternativt andre begrensende faktorer i FBH ettersom det innledningsvis i vekstperioden fra 0 til 6 g ble observert begrensninger i tilvekst hos fisk fôret med FBH, særlig uttalt på det laveste P nivået (0,65 % løselig P).

Det er mulig at NH_3 -løsning brukt som nøytraliseringsmiddel etter syrehydrolyse kan ha vært uheldig for lakseyngel på de aller tidligste utviklingsstadier, selv om dette ikke var et problem på smoltstadiet. Begrenset næringsopptak ved startfôring kan forklare tendensen til lavere vekst i fisk fôret med FBH de første ukene, og sekundært kan dette ha medført små forsinkelser i beinutvikling som observert i 15 g fisk. Det var ikke problem med tilvekst etter at fisken passerte 6 g, og det ble ikke funnet avvik i beinutvikling i fisk som var større enn 30 g.

I 2013 ble det gjennomført et *in vitro* forsøk for å vurdere om ulike nøytraliseringsmidler kan ha betydning for biologiske responser, og eventuelt forklare avvik under startfôring og ulike resultat i forsøk med fisk på ulike livsstadier. Totalt i prosjektperioden er det gjennomført 3 *in vitro* forsøk, ett

med beinceller og 2 med leverceller for å «scree» effekter av P i FBH relativt til andre P kilder, kartlegge bioaktivitet i FBH og for å kunne vurdere om disse modellsystemene er egnet til å predikere *in vivo* effekter, da dette vil være svært tid og kostnadsbesparende. Med unntak av det siste *in vitro* forsøket der vi produserte nye marine ingredienser, så er de marine P kildene fra FBH evaluert *in vitro* nøyaktig de samme som de evaluert *in vivo* i forsøk med laks, slik at det er grunnlag for direkte sammenligning. *Hovedkonklusjonen fra in vitro forsøkene er at de fleste positive effekter av FBH var av samme karakter som P alene, men at både type nøytraliseringsmiddel og sulfat mengde tilført fra svovelsyre under hydrolyse kan være faktorer som kan ha betydning for optimalt produksjonsresultat i laks.*

Delmål 4. Dokumentere miljøeffekter

Prosjektet hadde som formål å utvikle nye marine fôringredienser som kunne bidra til mindre miljøutslipp. Prosjektet har dokumentert at ca. 90 % av P i sildebein kan frigjøres ved syrehydrolyse, tilsvarende andre råstoffslag, basert på en prosess tilpasset denne type råstoff. Fordøyeligheten av P i fiskebein er i utgangspunktet lav, anslagsvis 0 - 5 %. Mest sannsynlig er P bundet i hydroksyapatitt ikke tilgjengelig i laks i det hele tatt fordi pH i magen (pH=4) ikke er tilstrekkelig lav til å bryte ned mineralkomplekset. Oppholdstiden av pellet i laksetarm er også så kort at det heller ikke er tilstrekkelig tid til å frigjøre og bryte ned P til frie fosfater som kan tas opp i tarmen.

Det er vist i forsøk med smolt at fordøyelighet og retensjon av P fra FBH sild etter syrehydrolyse er like høy som for andre lett løselige kommersielle mono-Na-P salt, opp mot 80 % fordøyelighet når fôrene er formulert nær eller litt i underkant av P behovet. *Ved å frigjøre og øke tilgjengeligheten av P fra beinfraksjonen, øker man fordøyeligheten av total P i det marine råstoffet, samtidig som man reduserer behovet for å tilsette andre løselige P salter i fôret. Begge deler vil bidra til å redusere miljøutslipp og gjøre det lettere å møte restriksjoner i utslipp av P pålagt i EU-s vanddirektiv.*

Fiskemel i norske laksefôr gikk ned fra 20 til 18 % fra 2010 til 2013, samtidig som mengde avskjær i fiskemel økte fra 25 til 30 %, Tabell 1. Vi har sett på fordelingen av P i fiskemel (2 % P) og i avskjær (2,55 % P). Tabell 1 viser at P fra avskjær øker i volum og utgjør henholdsvis 30 og 35 % av P i det marine råstoffet i 2010 og 2013, til tross for at nivået av fiskemel går ned. Dersom alt P kan frigjøres fra beinfraksjon i avskjær, så vil dette tilsvare en P mengde som kan erstatte omtrent 70 % av den P mengde som ble tilsatt norske laksefôr i 2010 (2468 tonn). Marint råstoff, planteprotein og P salter tilførte henholdsvis 55, 25 og 20 % av total P i laksefôr i 2010 (Ytrestøy 2011) mens tall for 2013 ikke er tilgjengelig. Omtrent 40 % av P i et vanlig fiskemel vil være bundet i bein og frigjøring av dette volumet i tillegg tilsvarer en P mengde som er nesten like høy som P i fiskeavskjær.

Hovedgevinsten ved de nye marine ingrediensene er at en stor andel av P i fiskebein kan frigjøres og utnyttes som en effektiv P kilde i fôr til laks og redusere behovet for å tilsette P salter. Prosjektet har dokumentert hvor mye løselig P man må ha i fôret for å oppfylle behovet hos smolt. Dette har gitt grunnlag for å formulere laksefôr tett opp til reelt P behov slik at man oppnår maksimal P fordøyelighet og P retensjon i fisk samtidig som utslipp til miljøet blir redusert.

Prosjektet har derfor bidratt til å utvikle en mer bærekraftig, kostnads- og miljøvennlig utnyttelse av tilgjengelige marine ressurser.

Tabell 1 Fosfor (P) i fiskemel og fiske biprodukter i 2010 og 2013

	2010	2013
Fiskemel, MT	325 000	291 000
Andel biprodukter	25 %	30 %
Biprodukter, MT	81 250	87 300
Basis fiskemel, MT	243 750	203 700
P i fiskemel, MT	4875	4074
P i biprodukter, MT	2072	2226
Total P, marint råstoff	6947	6300

4 Kvalitetssikring av prosjektgjennomføring og resultater

Det vitenskapelige arbeidet er gjennomført iht vanlige vitenskapelige standarder som sikrer mulighet for publisering av resultat i internasjonalt anerkjente tidsskrift med referee og presentasjoner av resultat på internasjonale kongresser. Standard kjemiske analyser er utført i duplikat ved akkrediterte laboratorier. Både Nofima og NIFES har anvendt molekylærbiologiske metoder og molekylære markører som sikrer høy faglig kvalitet i prosjektet. Nofima har også egne rutiner for korrekturlesing og kvalitetssikring av rapporter.

5 Prosjektgjennomføring og ressursutnyttelse

Prosjektet er gjennomført i henhold til budsjett og kontrakt med FHF, med noen små endringer i prioriteringene i faglige aktiviteter og ressurser for de ulike delmål. Prosjektet ble satt i gang allerede oktober 2010, basert på tilgjengelig silderåstoff. Prosjektet har brukt 785', 4480', 3444' og 3530', henholdsvis i 2010, 2011, 2012 og 2013. Forbruket totalt ved utgang 2013 er 12 239', noe som er 47' over kontraktfestet beløp. Det gjenstår likevel ca. 300' i prosjekt basert på endring i FHF timepris, disse midlene vil bli brukt i januar 2014 til å ferdigstille rapporter og til å sluttrapportere.

De manuelle prosessene for uttak, bearbeiding og rensing av råstoff, samt opparbeiding av nye ingredienser i pilotskala har vært mer tid- og kostnadskrevende enn forventet. De to første årene var det likevel høy progresjon i prosjektet, med gjennomføring av smoltforsøk vår 2011 og startfôringsforsøk vår/sommer/høst 2012. Gjennomføringen av det analytiske arbeidet tok mer tid enn forventet både ved Nofima og NIFES, noe som til en viss grad forsinket leveransene i prosjektet. Ressurssituasjonen når det gjaldt personell var krevende i 2013, med sentralt FoU personell i permisjon, og med omorganisering av Nofima høst 2013. Det ble prioritert å bruke ledige ressurser til å ferdigstille norske rapporter på manus form som utgangspunkt for publisering, og det er gjort en betydelig innsats for å forstå hvordan de nye ingrediensene påvirker fysiologiske prosesser og hvilket potensiale de har i fisk. Det kan se ut for at FBH ingrediensene kan ha mulige tilleggsverdier i laks knyttet til effekter på fordøyelighet og opptak av næringsstoffer i tarm, og til oksidasjonsforsvar. Vi har prøvd å kartlegge betydningen av ulike prosessbetingelser og nøytraliseringsmidler som vi tror kan ha betydning for lakseproduksjon. Det har vært viktig å få avklaring på hvorfor de nye P ingrediensene fra marint avskjær kan ha litt ulik påvirkning i ulike forsøk utover å fungere som en effektiv P kilde. Prosjektet hadde svært god økonomi i 2013, og grunnet uavklarte problemstillinger knyttet til valg av nøytraliseringsmiddel, ble det gjennomført en småskala pilotproduksjon for hydrolyse av P fra torskeavskjær der det ble brukt to ulike nøytraliseringsmidler (NH₃ løsning, KOH). Effektene av disse er testet på leverceller *in vitro* for å se om valg av nøytraliseringsmiddel kan forklare noe av den biologiske variasjonen vi har sett i forsøk, se resultat oppsummert under pkt. 3.

6 Nytteverdi og implementering av resultatene i industrien

Bedre utnyttelse av næringsstoffer i beinfraksjon av marine biprodukter representerer betydelige tilleggsverdier for både leverandører og produsenter av råstoff til fiskefôr. I 2012 representerte restråstoffet 926.000 tonn, hvorav beinfraksjon vil utgjøre omtrent 185.000 tonn. Mineraler (50 %) og kollagener (35 %) i bein kan i liten grad utnyttes på den form de foreligger. Dette prosjekt har dokumentert at det er mulig å frigjøre mineraler fra sildebein ved syrehydrolyse, og effektivitet i P utnyttelse er dokumentert i laks på ulike livsstadier. Prosjektet har også dokumentert at det er mulig å bryte ned kollagenene ved varmebehandling og ved enzymatisk hydrolyse, men biologiske effekter på proteinfordøyelighet er ikke dokumentert fordi det oppstod problemer under gjennomføring av forsøk med mink.

Produksjonsprosessen for syrehydrolyse krever relativt små og enkle omlegginger i bedriften, og det er også relativt små krav til kompetanseheving for å håndtere nye prosesser og produktlinjer. Investeringsbehovet antas å være moderat, og baserer seg primært på investeringer ved oppstart, herunder behov for egen syrehydrolysetank, mulighet for bufring av vannfraksjon etter hydrolyse, samt egnet tørketeknologi. En slik teknologi bør etableres i samarbeid med en eksisterende fiskeindustri eller fiskemelfabrikk, ettersom dette vil sikre tilgangen på råstoff og relevant utstyr, særlig på tørkesiden. Anvendelse av sterke syrer i prosessen er en sikkerhetsmessig risiko som krever utarbeidelse av egne rutiner. Implementering av FoU resultat i industrien krever både nytenkning og motivasjon for utradisjonelle tilnærminger for å kunne realisere nye skreddersydde produksjonslinjer for mineral- og proteinprodukter fra fiskebein. Gode bedriftsøkonomiske kalkyler må utarbeides for å minimalisere risiko i prosjektet.

Totalutnyttelse av hele råstoffet er nødvendig for å oppnå god økonomi i prosjektet. Ved separasjon og bearbeiding av beinfraksjon vil man stå igjen med omtrent 80 % rent muskelprotein. I vårt prosjekt har vi separert bein fysisk over en beinseparator. I en kommersiell prosess vil det være naturlig å starte med en enzymatisk hydrolyse av biproduktene for å ta ut den merverdi som fiskeproteinhydrolysat (FPH) representerer. Etter enzymatisk frigjøring av muskelprotein, står man tilbake med en beinfraksjon som vil være utgangspunkt for videre utvikling av mineral- og kollagenprodukter. Prosjektet har dokumentert et stort potensial og en enorm nytteverdi for oppgradering av beinråstoff som til dels har vært vurdert som problemavfall i fiskemelproduksjonen.

Målet med dette prosjektet har vært verdiskapning av marint restråstoff ved å utvikle teknologiske løsninger som kan øke tilgjengeligheten av næringsstoffer i fiskebein. Utvikling av nye marine ingredienser vil være interessant både for fôr- og oppdrettsindustrien dersom det kan dokumenteres produksjonsforbedringer. Dette har vi indikasjoner på, men vi jobber fortsatt med å kartlegge de spesifikke, involverte mekanismene. Forventede begrensninger i naturlige P kilder i nær framtid samt høy etterspørsel etter P i gjødselmarkedet har allerede gitt økte kostnader og behov for å intensivere arbeidet med å finne alternative P kilder som kan bidra til mindre forurensning.

7 Videre FoU behov

Restråstoff (hode- og ryggavskjær) fra hvitfisk sektoren er særlig interessant å jobbe videre med, dels basert på at dette råstoffet har økt i volum, og dels basert på at omtrent 62 % av restråstoffet ikke blir utnyttet i dag (Sintef, 2012). I pilotproduksjon er det vist at mineraler i torskebein lett lar seg hydrolysere i sterke syrer med godt resultat (over 15 % løselig P), Østby et al., 2014. Resultat fra startfôringsforsøket ga indikasjon på at FBH sild ikke var fullt optimalt i lakseyngel på de tidligste utviklingstrinnene, før fisken når 15 g. Det har vært usikkert hvilken type nøytraliseringsmiddel som er best egnet for lakseyngel og det er gjennomført *in vitro* forsøk for å kartlegge dette. Vi har observert at både nøytraliseringsmiddel og syremengde brukt ved hydrolyse kan ha betydning for biologisk produksjonsresultat. Torskebein inneholdt mindre aske på våtbasis enn kolmulebein, og syrebehovet ble dermed redusert. Lavere sulfatmengde fra syre kan ha bidratt til det positive resultatet for FBH torsk evaluert *in vitro* (Østby et al., 2014), noe det er behov for å verifisere i forsøk med laks. For å kunne lykkes med kommersialisering av nye marine P ingredienser, vil det særlig være behov for å dokumentere P utnyttelse fra FBH i ferskvann, fortrinnsvis med parr fra 20 – 30 g og fram til smoltifisering, eventuelt også i overgang til sjø. På dette stadiet er fisken i hurtig utvikling, og et slikt forsøk vil lett kunne avdekke eventuelle avvik i beinutvikling. Bedre dokumentasjon og trygghet for bruk av FBH i ferskvann vil bidra til å kunne lykkes med kommersialisering av FoU resultat.

Dokumentasjon av prosessene for å bearbeide kollagenprotein i bein kom vi ikke helt i mål med i dette prosjektet, og det er ønskelig å diskutere nye prosjekter knyttet til bedre utnyttelse av dette proteinet. Omdannelse av kollagen til gelatin ved skånsom varmebehandling kan gi grunnlag for å utvikle nye marine proteiningredienser med funksjonelle og tekniske egenskaper av betydning både for kvalitet av pellet (teknisk/fysisk) og kvalitet av fiskemuskel (biologisk).

8 Planlagte publikasjoner med referee

De norske rapportene er utarbeidet som utkast til manuskript og er gjennomarbeidet på en måte som vil lette publiseringsarbeidet betydelig. Det antas å være grunnlag for minimum 2 publikasjoner; 1) Smoltforsøk og 2) Startfôringsforsøk. Det kan være grunnlag for en ekstra publikasjon basert på resultatene fra *in vitro* forsøkene (3), evt. sammen med resultat fra andre eksperimentelle P tilnærminger i dette og i andre prosjekt. Dette vil prosjektgruppen vurdere nærmere.

- 1) Sissel Albrektsen, Erik-Jan Lock, Grete Bæverfjord, Mona Pedersen, Aleksei Krasnov, Harald Takle, Eva Veiseth-Kent, Robin Ørnstrud, Rune Waagbø og Elisabeth Ytteborg (2014). Utnyttelse av P fra sildeavskjær som alternativ P kilde i fôr til laksesmolt (*Salmo salar* L.). Nofima rapport 8/2014, 55s. Utkast til manus.
- 2) Sissel Albrektsen, Grete Bæverfjord, Erik-Jan Lock, Mona Pedersen, Harald Takle, Robin Ørnstrud, Eva Veiseth-Kent, Rune Waagbø og Elisabeth Ytteborg (2014). Nye marine ingredienser fra sildeavskjær som P ingrediens i fôr til lakseyngel (*Salmo salar* L.). Nofima rapport 9/2014, 50 s. Utkast til manus.
- 3) Tone-Kari Østbye, Bente Ruyter, Inger Øien Kristiansen, og Sissel Albrektsen (2014). Helseeffekter i lakseceller eksponert for fiskebeinhydrolysater fra torsk, sild og kolmule. Nofima rapport 10/2014, 27 s.

9 Formidlingsplan i etterkant av prosjektperioden

1. FHF faktaark 2014
2. Populærvitenskapelig artikkel Norsk Fiskeoppdrett
3. Foredrag på nasjonale og internasjonale møter/kongresser, se under.

Det er påmeldt 2 foredrag der resultat fra prosjektet skal formidles dersom de aksepteres

- 1) Elisabeth Ytteborg, Harald Takle, Mona Pedersen, Jacob Torgersen, Bente Ruyter, Grete Bæverfjord og Sissel Albrektsen (2014). Molekylære markører for opptak og utnyttelse av mineraler i fôr. Programkonferansen HAVBRUK 2014. Tromsø, 31.mars – 2. april 2014.
- 2) Sissel Albrektsen, Grete Bæverfjord, Erik-Jan Lock, Mona Pedersen, Harald Takle, Robin Ørnstrud, Eva Veiseth-Kent, Rune Waagbø and Elisabeth Ytteborg. (2014). Dietary impacts of new marine P ingredients from herring byproducts on growth, mineralization and skeletal development in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fry. ISFNF Cairns, Australia, May 2014.

10 Referanser

- Albrektsen, S., Thorsen, K. og Nygaard, H. (2010). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. First Marine Ingredients Conference, Holmenkollen Park Hotel, Oslo, 20-21 September. Poster presentation.
- Albrektsen, S., Thorsen, KH., Bæverfjord, G., Nygaard, H. (2013). Improved phosphorus utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by acid hydrolysis of bone minerals in fish meal. Interdisciplinary Approaches in Fish Skeletal Biology (IAFSB), 2013. Poster.
- Ytrestøl, T., Aas, T.S., Berge, G.M., Hatlen, B., Sørensen, M., Ruyter, B., Thomassen, M.S., Hognes, E.S., Ziegler, F., Sund, V. og Åsgård, T.E. (2011). Resource utilisation and eco-efficiency of Norwegian salmon farming in 2010.

