



ZEEVIVO Zeewier in visvoer

Visproductie: selectie en karakterisatie van op zeewier gebaseerde eiwitconcentraten voor visvoerders

Jeroen Kals, Edward Schram, Fedor den Elzen, Luca Hertfelder en Alwin Hylkema

RAPPORT 1223



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

RAAK-PRO

ZEEVIVO Zeewier in visvoer

Rapport Werkpakket C, Visproductie



**Jeroen Kals, Edward Schram, Fedor den Elzen, Luca Hertfelder
en Alwin Hylkema**

Penvoerder: Hogeschool Van Hall Larenstein

Consortium:

Hogeschool Van Hall Larenstein
Koninklijk Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee
Wageningen Livestock Research
Wageningen Marine Research
Hortimare BV
Danvos BV



ZEEVIVO Zeewier in visvoer

Visproductie: selectie en karakterisatie van op zeewier gebaseerde eiwitconcentraten voor visvoerders

Jeroen Kals¹, Edward Schram², Fedor den Elzen^{1,3}, Luca Hertfelder^{1,3} en Alwin Hylkema³

¹ Wageningen Livestock Research

² Wageningen Marine Research

³ University of Applied Sciences Van Hall Larenstein



Dit onderzoek is medegefinancierd door Regieorgaan SIA, onderdeel van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO)

Wageningen Livestock Research
Wageningen, februari 2020

Rapport 1223

Jeroen Kals, Edward Schram, Fedor den Elzen, Luca Hertfelder en Alwin Hylkema, 2020. ZEEVIVO Zeewier in visvoer. Visproductie: selectie en karakterisatie van op zeewier gebaseerde eiwitconcentraten voor visvoeders. Wageningen Livestock Research, rapport 1223.

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/512093> of op www.wur.nl/livestock-research (onder Wageningen Livestock Research publicaties).

© 2020 Wageningen Livestock Research
Postbus 338, 6700 AH Wageningen, T 0317 48 39 53, E info.livestockresearch@wur.nl,
www.wur.nl/livestock-research. Wageningen Livestock Research is onderdeel van Wageningen University & Research.

Wageningen Livestock Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van de uitgever of auteur.

Wageningen Livestock Research is NEN-EN-ISO 9001:2015 gecertificeerd.
Op al onze onderzoeksopdrachten zijn de Algemene Voorwaarden van de Animal Sciences Group van toepassing. Deze zijn gedeponeerd bij de Arrondissementsrechtbank Zwolle.

Wageningen Livestock Research Rapport 1223

Inhoud

	Samenvatting ZEEVIVO project	7
	Samenvatting deelproject visproductie	9
1	Inleiding	11
2	De kaders voor zeewier-ingrediënten in visvoer	12
	2.1 Inleiding	12
	2.2 Wettelijke kaders	13
	2.3 Maatschappelijke kaders	14
	2.3.1 Aquaculture Stewardship Council (ASC)	14
	2.3.2 Wereld Natuurfonds (WNF)	15
	2.3.3 Greenpeace	15
	2.3.4 Stichting de Noordzee	16
	2.3.5 Stichting Milieukeur	16
	2.3.6 Samenvattend	16
	2.4 Nutritionele, economische en bedrijfsmatige kaders	16
	2.4.1 Inleiding	16
	2.4.2 Zeewier als eiwitbron	16
	2.4.3 Productie van visvoer	17
3	Analytische screening van de zeewiereiwitconcentraten	18
	3.1 Inleiding	18
	3.2 Resultaten	18
4	Technologische screening van zeewiergrondstoffen	21
	4.1 Doelstelling	21
	4.2 Resultaten	21
5	Biologische screening van zeewiereiwitconcentraten	23
	5.1 Inleiding	23
	5.2 Opzet van het experiment	23
	5.3 Berekening van de performance parameters	25
	5.3.1 Voeropname	25
	5.3.2 Groei	25
	5.3.3 Statistische analyse	25
	5.4 Resultaten en discussie	25
6	Vaststellen verteerbaarheden	27
	6.1 Opzet van het experiment	27
	6.2 Monsternamen en berekeningen	29
	6.2.1 Voeropname	29
	6.2.2 Groei	29
	6.2.3 Vis, bloed en lever	29
	6.2.4 Statistische analyse	31
	6.3 Resultaten en discussie	31
	6.3.1 Diëten	31
	6.3.2 Groei, voeropname en voederconversie	31
	6.3.3 Bloed parameters	31

	6.3.4 De schijnbare verteerbaarheden	32
	6.3.5 De schijnbare absorptie coëfficiënten, retentie en gehalten van mineralen	34
7	Vaststellen maximale inclusie niveau van zeewiereiwitconcentraat	39
8	Conclusies	40
9	Dankwoord	41
	Literatuur	42

Samenvatting ZEEVIVO project

De wereldwijd snel groeiende aquacultuur sector is afhankelijk van vismeel en soja, de belangrijkste eiwitcomponenten van visvoer. Vismeel wordt geproduceerd uit wild gevangen vis en soja concurreert om ruimte en water met andere voedselgewassen en met natuur. De afhankelijkheid van vismeel en soja beperkt een duurzame groei van de aquacultuursector. De visvoeding-industrie is op zoek naar alternatieve eiwitbronnen en eiwit uit zeewier kan in potentie een duurzaam alternatief zijn. Het is in dat geval belangrijk dat het eiwitpercentage van het zeewier gelijk of hoger is dan het product dat het moet vervangen, dat is tenminste 40% voor soja en 60% voor vismeel. Zeewier heeft, afhankelijk van bijvoorbeeld de soort en het seizoen, een eiwitconcentratie van maximaal 25%. In het ZEEVIVO (Zeewier in Visvoer) project werkten Hogeschool VHL, NIOZ, WLR, Danvos en Hortimare aan een zeewiereiwitconcentraat met een zo hoog mogelijke eiwitconcentratie. Het project werd medegefinancierd door regieorgaan SIA, onderdeel van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO) en was georganiseerd in drie werkpakketten:

In werkpakket A, *Zeewierteelt*, werd onderzocht wat het effect is van de nitraatconcentratie op de groei en eiwitconcentratie van de zeewiersoorten *Saccharina latissima* en *Ulva lactuca*. Bij de laatste soort werd ook gekeken naar de aminozuursamenstelling. Hogere nitraatconcentraties zorgden bij beide zeewiersoorten voor een hogere groeisnelheid en een hogere eiwitconcentratie. De totale aminozuurhoeveelheid van *U. lactuca* was hoger bij blootstelling aan een hogere nitraatconcentratie. Alle gemeten aminozuurgehalten waren hoger, behalve die van methionine, die gelijk was ten opzichte van de *Ulva lactuca* die gekweekt werd onder lage nitraatconcentraties. Het is dus mogelijk om tijdens het groeiproces, de aminozuur- en eiwitconcentratie van zeewier te verhogen. De toename in eiwitconcentratie was zelfs zo snel, dat het mogelijk is om zeewier te verrijken door het twee weken voor de oogst onder verhoogde nitraatconcentraties te laten groeien.

In werkpakket B, *Bioraffinage*, werd onderzoek gedaan naar het effect van de bewaarmethode, de pH en de temperatuur op de extractie en concentratie van eiwit uit het zeewier. Het verhogen van de temperatuur en de pH tijdens de extractie leidde tot een efficiënter proces, waarbij meer eiwit uit het zeewier geëxtraheerd kon worden. Daarnaast is het effect van bewaren (invriezen, vriesdrogen en luchtdrogen bij 40°C en 70°C) op de efficiëntie van de eiwit-extractie van de zeewieren *S. latissima*, *Ascophyllum nodosum*, *Chondrus crispus* en *U. lactuca* onderzocht. Vers zeewier leidde bij alle vier de soorten tot een goede eiwit extractie-efficiëntie, waarbij tussen de 35% en 55% van het eiwit in oplossing kwam. Gevriesdroogd *A. nodosum* had de hoogste extractie-efficiëntie, terwijl bij *U. lactuca* meer dan 80% van het eiwit achterbleef in de pellet, waarin ook de eiwitconcentratie verdubbelde. Voor zowel de industrie als onderzoekers is het dus belangrijk om goed te kijken naar welk soort met welke bewaarmethode gebruikt wordt en of er gefocust wordt op het supernatant of de pellet.

Werkpakket C, *Visproductie*, testte drie verschillende zeewiereiwitconcentraten, op geschiktheid om gebruikt te worden in visvoeding voor tilapia (*Oreochromis niloticus*). De zeewiereiwitconcentraten werden gemaakt van het groenwier *U. lactuca*, het roodwier *Solaria chordalis* en een 50:50 mix van beide. Van alle drie de zeewierconcentraten is een geëxtrudeerd voer gemaakt, waarin 25% van het sojaeiwit werd vervangen door het zeewiereiwit. In een voedingsproef werden de groeiprestaties van tilapia gevoerd met de experimentele voeders vergeleken. De voeropname en groei was vergelijkbaar tussen de voeders. De eiwitefficiëntie van het voer met zeewiereiwitconcentraat van *U. lactuca* was vergelijkbaar met dat van het referentie voer. In een verteringsproef werd de schijnbare verteerbaarheid van eiwit bepaald door 20% van het referentievoer te vervangen door een van de zeewiereiwitconcentraten. De eiwitverteerbaarheid van de zeewiereiwitconcentraten was vergelijkbaar, al is die van het zeewiereiwit uit *Ulva*, met 81 %, het hoogst. De vervanging van 20% van het referentievoer door het zeewiereiwitconcentraat van *Ulva* had geen effect op de groei en voederconversie van tilapia. Zeewiereiwit uit *Ulva* is dus geschikt om, in ieder geval gedeeltelijk, de sojacomponent in voer voor tilapia, te vervangen.

Samenvatting deelproject visproductie

Voor duurzame groei is de visvoerindustrie op zoek naar duurzame alternatieve eiwitbronnen. Eiwit uit zeewier kan in potentie een duurzaam alternatief zijn voor sojameel of vismeel. Dit project onderzoekt of eiwit uit zeewier c.q. zeewiereiwitconcentraat een geschikt alternatief is voor soja in visvoer. Als eerste zijn relevante eisen, zoals de maatschappelijke kaders, nutritionele kaders en wettelijke kaders vastgesteld waaraan een zeewiereiwitconcentraat moet voldoen om als grondstof gebruikt te kunnen worden door de visvoerindustrie. Vervolgens is van twee zeewiereiwitconcentraten, een van het groenwier *Ulva spp* en een van het roodwier *Solaria chordalis*, de nutritionele samenstelling geanalyseerd.

Voor de biologische validatie van de voedingswaarde van de zeewiereiwitconcentraten is een voedingsproef met tilapia uitgevoerd, waarbij de vissen tot schijnbare verzadiging werden gevoerd. In de voedingsproef zijn vijf diëten getest: een referentiedieet met maximaal 35% sojameel, drie diëten waarvan 25% van het sojaeiwit van het sojameel werd vervangen door ofwel zeewiereiwit afkomstig van het zeewiereiwitconcentraat van *Ulva*, *Solaria* of een combinatie van beide (1: 1) respectievelijk, en een commercieel dieet die qua macro nutritionele samenstelling vergelijkbaar is.

De voeropname en groei was vergelijkbaar tussen diëten. De voederconversie op basis van de droge stof werd beïnvloed door het dieet met de beste waarde voor het dieet met het zeewiereiwitconcentraat van *Ulva*. De voederconversie op basis van as vrij droge stof was vergelijkbaar tussen diëten. De eiwit efficiëntie van het dieet met zeewiereiwitconcentraat van *Ulva* was vergelijkbaar met dat van het referentiedieet.

Voor het vaststellen van de in vivo verteerbaarheid van het eiwit en de bruto energie van de twee zeewiereiwitconcentraten in tilapia is een verteringsproef uitgevoerd, waarbij de vissen beperkt werden gevoerd. Daarnaast werden absorptie, gehalte en retentie van een aantal mineralen bepaald en een aantal bloedparameters geanalyseerd. In de verteringsproef zijn vier diëten vergeleken: het referentiedieet, hetzelfde dieet als gebruikt in biologisch screening, en drie diëten waarvan 20% van het referentiedieet werd vervangen door ofwel 20% van het groene, respectievelijk rode of gemengde zeewiereiwitconcentraat. Yttrium werd toegevoegd als marker om de schijnbare verteerbaarheidscoëfficiënt of de schijnbare absorptiecoëfficiënt van de componenten in de diëten te kunnen berekenen.

De eiwitverteerbaarheid van het referentiedieet is hoger in vergelijking met die van de diëten met de zeewiereiwitconcentraten. De eiwitverteerbaarheid van de zeewiereiwitconcentraten was onderling vergelijkbaar al is de eiwitverteerbaarheid van het zeewiereiwitconcentraat van *Ulva*, met 81.2%, het hoogst. De bruto energie verteerbaarheid was vergelijkbaar voor alle diëten. De vervanging van 20% van het referentie dieet door het zeewiereiwitconcentraat van *Ulva* had geen effect op de groei en voederconversie in vergelijking met het referentiedieet.

Voor wat betreft de absorptie, gehalten en retentie van een aantal mineralen kan men stellen dat het gehalte van spoorelementen en zware metalen verschilt tussen diëten en dat er ook verschillen zijn in de absorptie en retentie van spoorelementen en zware metalen in vis gevoerd met de verschillende diëten. Dit leidt echter niet tot verschillen in de gehalten van de geanalyseerde spoorelementen en zware metalen in de vis gevoerd met het referentiedieet en de vissen gevoerd met de diëten met daarin de zeewiereiwitconcentraten. Het voeren van het dieet met daarin het zeewiereiwitconcentraat van het rode zeewier zorgde voor een hoger cholesterol gehalte in bloed van tilapia. De andere gemeten bloedparameters verschilden niet tussen diëten.

De resultaten van dit onderzoek pleiten voor het testen van het maximale en of optimale inclusieniveau van het zeewiereiwitconcentraat van *Ulva* in diëten voor tilapia om de mogelijkheden voor het vervangen van sojaeiwit door eiwitconcentraten uit *Ulva* verder te onderzoeken. Het zeewiereiwitconcentraat uit *Ulva* is geschikt om, in ieder geval gedeeltelijk, de sojameel in voeders voor tilapia, te vervangen.

1 Inleiding

De kweek van vis en de vraag naar visvoer groeit wereldwijd enorm. Voor een verdere duurzame groei is de visvoer industrie op zoek naar alternatieve eiwitbronnen die duurzaam zijn en zo min mogelijk concurreren met bronnen geschikt voor humane consumptie. Eiwit uit zeewier kan in potentie een duurzaam alternatief zijn voor bijvoorbeeld het momenteel veel gebruikte sojameel of vismeel en visolie. ZEEVIVO focust zich in dit deel project op de vervanging van soja en onderzoekt daarom in werkpakket C of eiwit uit zeewier een geschikt alternatief is voor de sojacomponent in visvoer. De activiteiten binnen ZEEVIVO werkpakket C hebben als doel het selecteren en karakteriseren van op zeewier gebaseerde eiwitgrondstoffen voor visvoerders. Als eerste worden alle relevante eisen vastgesteld waaraan het zeewiereiwitconcentraat moet voldoen om gebruikt te kunnen worden door de visvoerindustrie. Vervolgens wordt, door middel van een uitgebreide screening met behulp van in vivo proeven, een selectie gemaakt uit de beschikbare zeewiereiwitconcentraten.

2 De kaders voor zeewier-ingrediënten in visvoer

2.1 Inleiding

Het gebruik van op zeewier gebaseerde grondstoffen in visvoerders is gebonden aan allerlei eisen en randvoorwaarden. Tezamen vormen deze de kaders waarbinnen op zeewier gebaseerde grondstoffen voor visvoerders ontwikkeld moeten worden. In dit hoofdstuk worden daarom alle relevante kaders gedefinieerd. Hierbij worden de volgende kaders onderscheiden.

Wettelijke kaders

Op zeewier gebaseerde grondstoffen moeten, net als alle andere grondstoffen, aan wettelijke eisen voldoen, voordat deze als ingrediënten voor diervoeders gebruikt mogen worden. Een overzicht van alle relevante wetgeving is nodig.

Maatschappelijke kaders

Consumenten, al dan niet vertegenwoordigd door NGO's, stellen eisen aan de herkomst en wijze van productie van voedingsmiddelen. Ten opzichte van de traditionele grondstoffen voor visvoerders, soja en vismeel, biedt het gebruik van zeewier mogelijk kansen om beter aan te sluiten op dergelijke maatschappelijke eisen. Kennis van de eisen die consumenten stellen en de trends daarin zijn daarom van belang. Daarnaast stellen consumenten eisen aan de voedingswaarde van het visproduct. Met name voor unieke bijdragen van vis aan het voedselpakket van consumenten, zoals omega-3 vetzuren, bestaat een directe relatie met de samenstelling van de visvoerders. Kennis van het effect van het gebruik van alternatieve ingrediënten op de voedingswaarde van het visproduct is daarom essentieel.

Nutritionele kaders

Visvoeding moet resulteren in goede groeiprestaties en een gezonde vis. De grondstoffen waaruit een visvoeder is samengesteld moeten daarom gezamenlijk voorzien in alle nutritionele eisen die de betreffende vissoort stelt. Kennis van deze eisen en van de voedingswaarde van de te vervangen en de nieuwe grondstoffen is essentieel voor het formuleren van nieuwe visvoerders op basis van alternatieve, op zeewier gebaseerde grondstoffen. De resultaten van de visvoedingsproeven fungeren ook als input.

Economische en bedrijfsmatige kaders

Welke grondstoffen visvoerfabrikanten inkopen en gebruiken om visvoerders te produceren is van vele factoren afhankelijk, zoals nutritionele eigenschappen, kosten, beschikbaarheid en fysieke eigenschappen. Om het uiteindelijke doel van dit project, vervanging van vismeel en of soja door op zeewier gebaseerde grondstoffen, te verwezenlijken is het essentieel om kennis te hebben van de prioriteiten, afwegingen en argumenten van visvoerfabrikanten bij de inkoop en het gebruik van grondstoffen. Viskwekers stellen eisen aan visvoerders, welke voor een belangrijk deel bepaald worden door de gebruikte ingrediënten. Kennis van deze eisen is essentieel om gebruik van op zeewier gebaseerde visvoerders te verwezenlijken.

Toetsing eigenschappen van zeewierproducten.

Na definitie van de relevante kaders, wordt getoetst in hoeverre de zeewierproducten daaraan voldoen. Opgemerkt moet worden dat alle bovengenoemde kaders onderhevig kunnen zijn aan veranderingen: wetgeving kan veranderen, consumenten kunnen andere eisen gaan stellen en de kweek van andere vissoorten zal andere nutritionele eisen met zich mee brengen. Dit hoofdstuk is daarom een momentopname. Daarnaast beperkt het vaststellen van de bovengenoemde kaders zich tot de productie van vis door de aquacultuur en daar binnen het gebruik van zeewier als grondstof voor visvoer. Kaders die mogelijk van toepassing zijn op de productie van het zeewier worden buiten beschouwing gelaten.

2.2 Wettelijke kaders

De wettelijke kaders voor het gebruik van zeewier als grondstof voor visvoer worden gevormd door de Europese wetgeving rondom diervoeders. In deze wetgeving wordt onderscheid gemaakt tussen grondstoffen voor voer, additieven voor voer, volledige voeders en medicinale voeders. In dit project wordt uitgegaan van het gebruik van zeewierproducten als grondstof voor visvoerders. Algemene eisen en verantwoordelijkheden omtrent de veiligheid en kwaliteit van voedsel en voeders worden omschreven in Verordening 178/2002. Voor meer specifieke onderwerpen zijn afzonderlijke verordeningen opgesteld. Tabel 1 geeft een overzicht van de relevante Europese wetgeving rondom diervoeders en de deelonderwerpen waarop de verschillende 'Directives' of 'Regulations' zich richten.

Tabel 1 Overzicht van de relevante Europese wetgeving rondom diervoeders.

Verordening	Doel/onderwerp	Bron
Verordening (EG) nr. 178/2002 van het Europees Parlement en de Raad van 28 januari 2002 tot vaststelling van de algemene beginselen en voorschriften van de levensmiddelenwetgeving, tot oprichting van een Europese Autoriteit voor voedselveiligheid en tot vaststelling van procedures voor voedselveiligheidsaangelegenheden	Algemene eisen en verantwoordelijkheden m.b.t. veiligheid en kwaliteit voor voer en voedsel.	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32002R0178&from=en
Verordening (EG) nr. (EG) Nr. 183/2005 van het Europees Parlement en de Raad tot vaststelling van voorschriften voor diervoederhygiëne	Garantie dat voedselveiligheid onderdeel is van de gehele productieketen van de primaire productie tot het uiteindelijke diervoeder.	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R0183-20151112
Richtlijn 2002/32/EG van het Europees Parlement en de Raad van 7 mei 2002 inzake ongewenste stoffen in diervoeding - Verklaring van de Raad	Ongewenste stoffen in diervoeders.	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32002L0032&from=EN
Lists of establishments, plants or operators approved or registered in accordance with Regulation (EC) No 183/2005 (Feed hygiene)	Een van lijst goedgekeurde bedrijven die actief zijn in de diervoederketen.	https://english.nvwa.nl/topics/approved-establishments/animal-feed-sector
Verordening (EG) nr. 767/2009 van het Europees Parlement en de Raad betreffende het in de handel brengen en het gebruik van diervoeders	Wetgeving over het verhandelen en gebruiken van diervoeders.	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:02009R0767-20180101&from=EN
Verordening (EG) nr. 2017/2279 van de commissie van 11 december 2017 tot wijziging van de bijlagen II, IV, VI, VII en VIII bij Verordening (EG) nr. 767/2009 van het Europees Parlement en de Raad betreffende het in de handel brengen en het gebruik van diervoeders	Wijziging van een aantal bijlagen van Verordening 767/2009.	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R2279&from=EN
Verordening (EG) nr. 2017/1017 van de commissie betreffende de catalogus van voedermiddelen	Lijst van voedermiddelen, glossarium van procédés.	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:02009R0767-20180101&from=EN
Aanbeveling van de commissie van 14 januari 2011 tot vaststelling van richtsnoeren voor het onderscheid tussen voedermiddelen, toevoegingsmiddelen, biociden en geneesmiddelen voor diergeneeskundig gebruik	Richtlijnen voor het onderscheid tussen o.a. voedermiddelen en additieven.	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011H0025&from=EN
Verordening (EG) nr. 1831/2003 van het Europees Parlement en de Raad van 22 september 2003 betreffende toevoegingsmiddelen voor Diervoeding	Het gebruik en op de markt brengen van additieven	https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN

Specifiek voor zeewier zijn er geen richtlijnen of verordeningen voor het gebruik als grondstof voor visvoerders. Gebruik is toegestaan wanneer wordt voldaan aan de algemene wetgeving over diervoeders. De gebruiker is hiervoor verantwoordelijk, terwijl het bevoegd gezag, in Nederland de

NVWA, de naleving controleert. Wel moeten de bedrijven in de productieketen worden goedgekeurd en opgenomen in de lijst van goedgekeurde bedrijven. In Nederland wordt deze keuring uitgevoerd door de NVWA. Als een voedermiddel dat niet in de catalogus staat (Verordening 2017/1017) voor het eerst in de handel gebracht wordt, moeten vertegenwoordigers van de Europese diervoederbranche hiervan op de hoogte gesteld worden (Verordening 767/2009 art. 24 lid 6). Volgens Van de Burg et al. (2013), daarbij refererend aan Verordening 767/2009, moet een nieuw voedermiddel dat niet in de catalogus staat aangemeld worden bij het bevoegd gezag en moet de veiligheid aangetoond worden. Zeewier staat, zonder verdere specificatie, al in de catalogus. Echter in dit project wordt gewerkt met zeewiereiwitconcentraten. Zeewiereiwitconcentraten staan niet specifiek in de catalogus genoemd. Andere type eiwitconcentraten zoals sojaeiwitconcentraten, boneneiwitconcentraten, kool- en rapzaadeiwitconcentraten staan wel specifiek genoemd met daarbij een omschrijving van de bron waaruit het product is verkregen en het proces dat is toegepast om het eiwitgehalte te verhogen of de andere oplosbare bestanddelen te verlagen. Melding aan vertegenwoordigers van de Europese diervoederbranche en het bevoegd gezag voordat zeewiereiwitconcentraten in de handel worden gebracht lijken daarom noodzakelijk. Voor gebruik als additieven geldt wel dat deze alleen na een goedkeuringsprocedure op de markt gebracht en gebruikt mogen worden. De goedkeuring is specifiek voor de diersoort en de condities voor gebruik.

Naast de wetgeving zijn er ook 'Guides to good practice', oftewel richtlijnen voor goede praktijken voor de productie van diervoeders. Deze zijn te vinden op: https://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed/feed-hygiene/guides-good-practice_en. De Europese Commissie moedigt het gebruik van dergelijke richtlijnen aan maar bedrijven zijn daartoe niet verplicht.

Opvallend is dat de Europese Commissie wel speciale aandacht heeft voor insecten als nieuwe bron voor diervoedergrondstoffen. DG Sante heeft een 'Strategic safety concept for insects as feed' (Commission regulation (EU) 2017/893) opgesteld waarin het gebruik van insecteneiwit in visvoeders wordt geautoriseerd.

2.3 Maatschappelijke kaders

Om de vraag te beantwoorden welke maatschappelijke kaders van toepassing zijn op visvoeders en in welke mate de ontwikkeling van op zeewier gebaseerd visvoer hieraan tegemoet komt, zijn de standpunten van NGO's ten aanzien van visvoer en visvoer ingrediënten als graadmeter gebruikt. De standpunten van NGO's zijn daartoe geïnventariseerd. Hiervoor is gebruik gemaakt van de informatie die de NGO's over dit onderwerp op hun eigen websites publiceren.

2.3.1 Aquaculture Stewardship Council (ASC)

Het ASC certificeringsprogramma heeft als doel het stimuleren van duurzame en sociaal verantwoordelijke aquacultuurpraktijken. Volgens ASC richten haar standaarden zich op de belangrijkste milieueffecten van aquacultuur, de rechten van arbeiders in de aquacultuur en het beschermen van gemeenschappen rondom gecertificeerde kwekerijen. ASC heeft op dit moment standaarden (farm standards) voor in totaal 12 verschillende soorten schelpdieren en vissen waaronder tilapia.

Visvoer maakt onderdeel uit van de ASC certificering. Een van de principes in de "farm standards" is namelijk: "use of feed and feeding practices that ensure that feed inputs are sustainable and minimized". Voor ASC gecertificeerde tilapia wordt aan dit principe invulling gegeven met de volgende criteria:

1. Traceerbaarheid en transparantie ten aanzien van de grondstoffen in het voer;
2. Verantwoordelijke herkomst van mariene grondstoffen†;
3. Mate van afhankelijkheid van wild-gevangen vis voor de productie van vismeel en visolie in het voer;
4. Verantwoordelijke herkomst van niet-marine grondstoffen.

Als indicator voor een verantwoordelijke herkomst van marine grondstoffen† wordt gekeken of vismeel en visolie in het visvoer afkomstig zijn uit ISEAL geaccrediteerde visserijen. Als indicator voor de mate van afhankelijkheid van wild-gevangen vis voor de productie van vismeel en visolie wordt

gekeken naar de zogenaamde "Fishmeal Forage Fish Dependency Ratio (FFDRm)" and "Fishoil Forage Fish Dependency Ratio (FFDRo)". Beiden zijn een maat voor de hoeveelheid grondstoffen in het voer afkomstig van wild-gevangen vis voor de productie van vismeel en visolie ten opzichte van de hoeveelheid vis die geproduceerd wordt. Het streven is deze verhouding zo laag mogelijk te krijgen; de visproductie zo onafhankelijk mogelijk te laten zijn van wild-gevangen vis voor de productie van vismeel en visolie.

Zeewieren of op zeewieren gebaseerde grondstoffen worden niet expliciet benoemd in ASC standaarden voor de productie van vis. Grondstoffen afkomstig van zeewieren die vismeel of visolie afkomstig van specifiek hiervoor gevangen vis en of niet marine grondstoffen met een minder verantwoordelijke herkomst, zoals bijvoorbeeld soja, kunnen vervangen lijken echter bij te kunnen dragen aan het voldoen aan ASC criteria ten aanzien van de herkomst van mariene ingrediënten voor visvoerders. Enerzijds door mariene grondstoffen met een verantwoordelijke herkomst te bieden en anderzijds door de afhankelijkheid van wild-gevangen vis te verlagen. Zeewiergrondstoffen moeten dan wel aan de ASC eisen ten aanzien van traceerbaarheid en transparantie kunnen voldoen. Daarnaast heeft ASC samen met MSC een standaard ontwikkeld voor duurzame en sociaal verantwoordelijke oogst en kweek van zeewieren. Het ligt in de lijn der verwachting dat zeewieren die gebruikt gaan worden als grondstoffen voor visvoerders geproduceerd of geoogst moeten worden in overeenkomst met deze ASC/MSC standaard ten einde de visproductie ASC te kunnen certificeren.

ASC stelt geen eisen aan het gehalte aan omega-3 vetzuren in het eindproduct van de gecertificeerde kweek. Wel wordt een maximum gesteld aan de gehalten van de omega-3 vetzuren EPA en DHA in het visvoer als indicator voor het gehalte aan ingrediënten van mariene herkomst.

† betreft vismeel en visolie van wild gevangen vis speciaal gevangen voor de productie van vismeel en olie. Uitgezonderd zijn vismeel en visolie afkomstig van reststromen.

2.3.2 Wereld Natuurfonds (WNF)

Het Wereld Natuurfonds erkent het belang van aquacultuur als belangrijke producent van voedsel voor de mens. WNF schrijft op haar website dat, op voorwaarde van verantwoordelijke productie, aquacultuur kan bestaan naast wilde vispopulaties en zonder het mariene milieu te beschadigen ten bate van bedrijvigheid en lokale bevolkingen. WNF ondersteunt de ontwikkeling van verantwoordelijke aquacultuur door bij te dragen aan de ontwikkeling van de hierboven beschreven ASC certificering. De maatschappelijke kaders voor het gebruik van zeewier als grondstof voor visvoerders volgens WNF komen daarom waarschijnlijk grotendeels overeen met de zienswijze van ASC. Het WNF heeft hier zelf geen informatie over op hun site staan.

2.3.3 Greenpeace

Greenpeace maakt zich zorgen om de negatieve effecten op mens en milieu als gevolg van de snelle groei van de aquacultuursector en dan met name de kweek van carnivore vissen. Een belangrijk onderdeel van die zorg, is het gebruik van vismeel en visolie als grondstoffen voor visvoerders. Deze grondstoffen zijn volgens Greenpeace (deels) afkomstig van niet duurzame visserijen en hebben prijsopdrijving en tekorten aan vis voor menselijke consumptie in ontwikkelingslanden tot gevolg. Door het gebruik van vis als grondstof voor visvoer is er bij de kweek van carnivore vissen geen sprake van een nettoproductie van vis, met het verlies van waardevolle eiwitbronnen tot gevolg. Volgens Greenpeace zijn duurzamere viskweekmethoden mogelijk, als in visvoer vismeel en visolie vervangen worden door plantaardige ingrediënten afkomstig uit duurzame landbouw. Greenpeace benoemt het ontbreken van omega-3 vetzuren in alternatieve plantaardige grondstoffen als mogelijk probleem voor de nutritionele behoeften van de gekweekte vis zelf en voor de menselijke consumenten van de vis. Greenpeace benoemt zeewier niet expliciet als alternatieve plantaardige grondstof. Het gebruik van zeewier als alternatieve grondstof voor soja afkomstig van niet duurzame landbouw in visvoer lijkt logischerwijs echter wel te passen in de visie van Greenpeace op duurzamere aquacultuur, op voorwaarde dat het zeewier duurzaam geproduceerd is.

2.3.4 Stichting de Noordzee

Stichting de Noordzee onderschrijft het belang van duurzame aquacultuur en draagt hier aan bij door het ASC keurmerk actief te promoten bij visconsumenten middels haar eigen VISWijzer. De maatschappelijke kaders voor het gebruik van zeewier als grondstof voor visvoerders volgens Stichting de Noordzee komen daarom waarschijnlijk grotendeels overeen met de zienswijze van ASC.

2.3.5 Stichting Milieukeur

De stichting Milieukeur heeft een maatlat duurzame aquacultuur ontwikkeld. Een Maatlat Duurzame Aquacultuur (MDA) gecertificeerde viskwekerij is een kwekerij met een lagere milieubelasting, met onder meer maatregelen voor diergezondheid, dierenwelzijn en voeders en draagt daardoor bij aan de verduurzaming van de aquacultuur. De maatlat is opgebouwd uit verschillende thema's. Een van die thema's is 'Voeders' en richt zich op de herkomst van duurzame grondstoffen in het voer en op efficiënt voergebruik. Belangrijke criteria binnen het thema Voeders hebben betrekking op het gebruik van vismeel en visolie. Deze grondstoffen moeten (deels) afkomstig zijn uit reststromen of duurzame visserijen. De verhouding tussen de hoeveelheid vis die het kweekproces in gaat als grondstof voor visvoer en de hoeveelheid kweekvis die geproduceerd wordt (fish in: fish out, FIFO), weegt zwaar in de beoordeling. Daarnaast levert het aandeel plantaardige grondstoffen (van duurzame herkomst) punten op. Het gebruik van zeewier als grondstof voor visvoer wordt niet expliciet benoemd in de lijst van criteria. Echter het gebruik van op zeewier gebaseerde grondstoffen ter vervanging van sojaeiwit zou tot een gunstigere verhouding "fish in:fish out" kunnen leiden als gevolg van omega-3 vetzuren in zeewier en verhoogt het aandeel plantaardige grondstoffen. Het gebruik van zeewier in visvoerders draagt daarom bij aan het voldoen aan de eisen voor de Maatlat Duurzame Aquacultuur.

2.3.6 Samenvattend

De standpunten van de bovenstaande NGO's zijn gebruikt als graadmeter voor de maatschappelijke kaders waarbinnen de toepassing van zeewier als grondstof zich moet ontwikkelen. Op basis daarvan lijkt het vrij duidelijk dat een dergelijke ontwikkeling kan rekenen op de steun van deze NGO's. Voorwaarde is wel dat de productie van de zeewiergrondstof duurzaam plaats zal vinden. Alle bovengenoemde NGO's onderschrijven het belang van vis als onderdeel van een gezonde voeding voor de mens. Echter alleen Greenpeace benoemt de kwaliteit van het eindproduct, de vis die door consumenten gegeten wordt, in relatie tot de eisen die zij stelt aan de wijze waarop de productie plaatsvindt. Het beperken of voorkomen van achteruitgang van de voedingswaarde van kweekvis als gevolg van het gebruik van zeewieren als grondstoffen voor visvoerders lijkt daarom een veilige aanname ten aanzien van de maatschappelijke inkadering van zeewier gebruik in visvoer.

2.4 Nutritionele, economische en bedrijfsmatige kaders

2.4.1 Inleiding

Nutritionele kaders hebben betrekking op de nutritionele behoeften van vissen. Economische en bedrijfsmatige kaders hebben betrekking op de eisen die fabrikanten en gebruikers van visvoerders stellen aan het voer en de grondstoffen die daarvoor gebruikt worden. Alleen visvoerders die aansluiten op de nutritionele behoeften van de vis zullen leiden tot goede groeiprestaties. De nutritionele behoeften van de vis maken dus onderdeel uit van de economische en bedrijfsmatige kaders. Daarom komen hieronder de nutritionele, economische en bedrijfsmatige kaders gezamenlijk aan de orde. De onderstaande informatie is ingewonnen bij Arjen Roem van Skretting.

2.4.2 Zeewier als eiwitbron

Als zeewier als eiwitbron in visvoer gebruikt gaat worden, dan zal het de huidige eiwitbronnen in visvoer moeten vervangen. Momenteel worden vooral vismeel en sojameel als eiwitbronnen gebruikt. De meeste zo niet alle visvoerfabrikanten willen vismeel vervangen door een alternatieve eiwitbron. Voor een groot deel is dat al mogelijk. Zelfs voer voor de piscivore zalm kan tegenwoordig zonder

vismeel (en visolie) commercieel geproduceerd worden. Zeewierproducten gaan dus niet iets mogelijk maken dat momenteel niet mogelijk is. Om als eiwitbron voor visvoer in aanmerking te komen, moeten zeewierproducten in ieder geval een hoog gehalte aan eiwit bevatten. Om in aanmerking te komen als alternatief voor vismeel zullen visvoerfabrikanten eisen dat het zeewierproduct minimaal 60% eiwit bevat om niet teveel 'ruimte' in beslag te nemen in de voerformulering. Ter vergelijking: vismeel bevat vaak meer dan 65% eiwit en 10% vet (visolie).

Als het zeewierproduct geen 60% eiwit bevat en het aminozurenprofiel ongunstiger is dan dat van vismeel, is het realistischer om het zeewierproduct te beschouwen als een alternatief voor plantaardige eiwitbronnen in visvoeders zoals sojabonenmeel. De visvoerfabrikant stelt dan lagere eisen aan het eiwitgehalte en het aminozurenprofiel. Het eiwitgehalte in het zeewierproduct mag dan zakken tot 40-50%. Lager dan 40% is niet acceptabel meer.

De verteerbaarheid van het zeewiereiwit moet bekend zijn omdat visvoerfabrikanten verteerbaar eiwit willen kopen. Visvoerfabrikanten zullen eisen dat de verteerbaarheid van het eiwit in het zeewierproduct gelijkwaardig is aan vismeel. De prijs van het ingrediënt moet in verhouding staan tot de eiwitverteerbaarheid; een lagere verteerbaarheid is tot op zekere hoogte acceptabel als de prijs van het product navenant lager is. Deze verteerbaarheid moet minstens voor één vissoort zijn vastgesteld in een voerproef.

De aminozurensamenstelling bepaalt ook de voedingswaarde van het zeewierproduct. De aminozurensamenstelling moet nauw aansluiten op de aminozurenbehoefte van de vis waarvoor het voer bedoeld is. Lysine en methionine zijn in dit verband de belangrijkste aminozuren. De marktprijs van een zeewierproduct zal vooral bepaald worden door het verteerbare eiwitgehalte en de aminozuursamenstelling.

Ten opzichte van plantaardige ingrediënten van terrestrische oorsprong zoals sojabonenmeel kan zeewier extra voedingswaarde en daarmee economische waarde hebben als de vetten net als visolie omega-3 vetzuren bevatten in de vorm van EPA en DHA. Echter de ontwikkeling van micro-algen oliën als alternatief voor visolie gaat snel en loopt voor op zeewier.

Dat zeewier geen zetmeel bevat is geen probleem voor visvoerfabrikanten. Zeewierproducten bevatten mogelijk wel veel voor vissen onverteerbare vezels. Dergelijke vezels hebben geen voedingswaarde terwijl ze mogelijk wel als anti nutritionele factoren (ANF's) gezien worden.

2.4.3 Productie van visvoer

Visvoerfabrikanten willen weten hoe het zeewierproduct zich gedraagt tijdens het productieproces van het voer en welke invloed het zeewierproduct heeft op de fysieke eigenschappen van het eindproduct. Daarbij is vooral van belang hoe het zeewierproduct zich gedraagt onder extrusie (voor vrijwel alle visvoeders worden geëxtrudeerde pellets gemaakt) en wat de invloed is op pellet binding, structuur en kwaliteit.

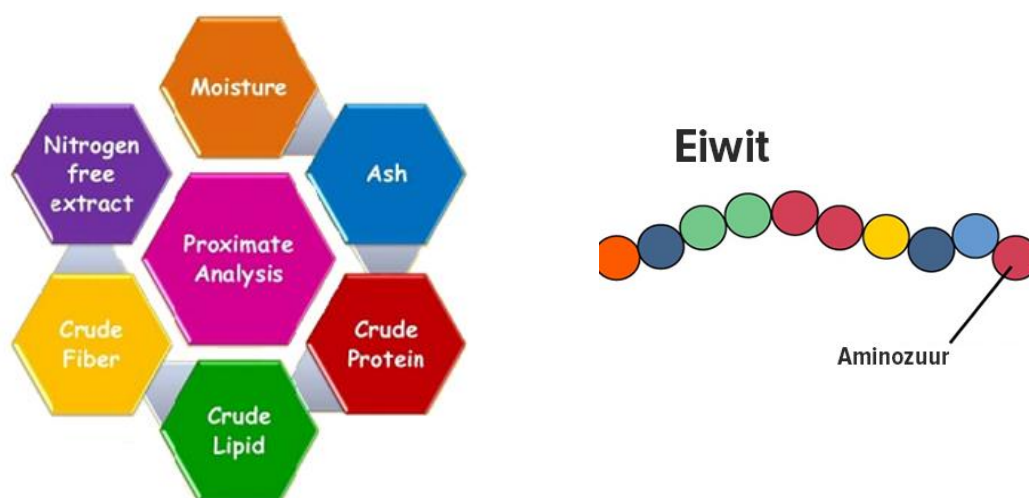
Zeewierproducten kunnen wellicht een bijdrage leveren aan de gewenste gehalten aan mineralen en spoorelementen in het visvoer. Een dergelijke bijdrage is echter economisch van weinig belang omdat de kosten voor mineralen en spoorelementen maar een klein onderdeel zijn van de kostprijs van het visvoer. De mogelijk in zeewieren aanwezige zware metalen en fluor vormen een risico voor de visvoerfabrikant, omdat ze kunnen leiden tot overschrijding van de wettelijke maxima voor deze stoffen in visvoer.

Voor visvoerfabrikanten is de beschikbaarheid van grondstoffen van groot belang. Een jaarronde beschikbaarheid heeft de voorkeur omdat dat regelmatig ingekocht kan worden. Visvoerfabrikanten produceren meestal 50.000 tot 100.000 ton voer per jaar. Bulk ingrediënten moeten in hoeveelheden van tenminste 5-10% van de totale hoeveelheid grondstoffen ingekocht kunnen worden. In de beginfase is een paar honderd ton per jaar acceptabel maar opschaling naar 1000-10.000 ton per jaar moet dan wel in de volgende fase gerealiseerd kunnen worden.

3 Analytische screening van de zeewiereiwitconcentraten

3.1 Inleiding

Voor zowel de selectie van de beschikbare zeewiereiwitconcentraten voor gebruik in visvoerders als het formuleren van een visvoer is het noodzakelijk dat de nutritionele samenstelling van de beschikbare zeewiereiwitconcentraten bekend is. Daarom is van de beschikbare zeewiergrondstoffen, een zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groenwier *Ulva spp.* (MJ124-18 Boue Verte, Amadeite – Olmix Group, Bréhan, France) en een zeewiereiwitconcentraat van het roodwier *Solaria chordalis* (MJ123-18 Boue Rouge, Amadeite – Olmix Group, Bréhan, France). Na productie zijn de zeewiereiwitconcentraten geanalyseerd op hun nutritionele samenstelling, waaronder droge stof, as, eiwit, vet en koolhydraten (figuur 1). Daarnaast is van beide zeewiereiwitconcentraten de aminozuursamenstelling bepaald. De analyses zijn uitgevoerd door Nutrilab, Giessen, Nederland.



Figuur 1 Links, een beeld van de opdeling van de nutritionele samenstelling zoals in de voederindustrie wordt gebruikt en rechts, de structuur van een eiwit dat is opgebouwd uit verschillende aminozuren, waarvan sommigen essentieel kunnen zijn. Essentiele aminozuren zijn aminozuren die via de voeding moeten worden verkregen.

3.2 Resultaten

Voor een visuele interpretatie van de geproduceerde producten zijn foto's van het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van groenwier *Ulva spp.* en van roodwier *Solaria chordalis* bijgevoegd (figuur 2). De macro nutritionele samenstelling van beide zeewiereiwitconcentraten is weergegeven in tabel 2, de aminozuursamenstelling in tabel 3. Opvallend is dat de som van de aminozuren als percentage van het ruwe eiwit (RE) in de zeewiereiwitconcentraten lager ligt dan honderd procent. Waarschijnlijk is dit het gevolg van de in het zeewierconcentraat aanwezige niet eiwit stikstof componenten of NPN's (non protein nitrogen), zoals bijvoorbeeld nitraat (NO_3^-).



Figuur 2 Het zeewiereiwitconcentraat gemaakt uit groen wier (*Ulva spp.*), links en het zeewiereiwitconcentraat gemaakt uit roodwier (*Solaria chordalis*), rechts.

Tabel 2 De nutritionele samenstelling van het zeewier eiwitconcentraat gemaakt uit groen wier (MJ124-18 Boue Verte) en roodwier (MJ123-18 Boue Rouge).

Code	Eenheid	MJ124-18 Boue Verte	MJ123-18 Boue Rouge	Mix 1:1
	g kg ⁻¹			
DS	""	916	957	937
RE	""	380	231	306
EE	""	24	8	16
RC	""	25	51	38
As	""	174	375	275
OK	""	313	292	303

DS = droge stof, CP = ruw eiwit, EE = ether extract, RC = ruwe celstof, As = as, OK = overige koolhydraten.

Tabel 3 De aminozuursamenstelling als percentage van het ruwe eiwit gehalte van het zeewiereiwitconcentraat gemaakt uit groenwier (MJ124-18 Boue Verte) en roodwier (MJ123-18 Boue Rouge) in vergelijking met het aminozuurpatroon van soja eiwit.

Aminozuur(%) RE	MJ124-18 Boue Verte	MJ123-18 Boue Rouge	Sojaeiwit
Alanine	7.3	5.2	4.4
Arginine*	5.6	5.1	7.5
Asparaginezuur	10.2	7.0	11.6
Cysteine	1.1	1.5	1.5
Glutaminezuur	9.8	7.8	17.8
Glycine	7.2	4.4	4.3
Histidine*	1.3	1.3	2.7
Isoleucine*	3.7	3.2	4.6
Leucine*	6.4	4.9	7.7
Lysine*	4.6	3.7	6.4
Methionine*	2.0	1.4	1.4
Phenylalanine*	4.9	3.3	5.2
Proline	4.9	2.9	5.1
Serine	5.0	3.3	5.1
Threonine*	4.7	3.4	3.9
Tryptofaan*	--	1.0	1.3
Tyrosine	2.9	2.4	3.7
Valine*	5.1	4.2	4.6
Totaal	86.9	65.9	98.7

*Essentiële aminozuren.

Het eiwitgehalte van de beschikbare zeewiereiwitconcentraten ligt tussen de 23 en 38 g kg⁻¹. Dit is lager dan beoogd. Het oorspronkelijke doel van Zeevivo was de productie van een zeewiereiwitconcentraat met een eiwitgehalte van tenminste 60%. Dit conform de eis van de visvoerfabrikanten om in aanmerking te komen als alternatief voor vismeel. Vervolgens zou met de beschikbare zeewiereiwitconcentraten worden getest of eiwit uit zeewier vismeel en/of sojameel kan vervangen in voeders voor forel. De productie van een zeewiereiwitconcentraat met een eiwitgehalte van tenminste 60% bleek (nog) niet mogelijk. Het maximaal haalbare op dit moment is een zeewiereiwitconcentraat gemaakt uit *Ulva* met een eiwitgehalte van 38% of 38 g kg⁻¹ (tabel 2). Daarnaast bevat dit product veel polysachariden. Het eiwitgehalte van sojameel is vergelijkbaar met dat van het beschikbare zeewiereiwitconcentraat uit *Ulva*. Daarom is besloten om het werk in dit deelproject te focussen op de vervanging van sojaeiwit door zeewiereiwit. Forel stelt hoge eisen aan het eiwitgehalte in het voer en kan minder goed om gaan met polysachariden. Deze eisen komen niet goed overeen met de eigenschappen van het beschikbare zeewiereiwitconcentraat. De eigenschappen van het beschikbare zeewiereiwitconcentraat komen beter overeen met de eisen van tilapia, net als forel een internationaal veel gekweekte en dus commercieel belangrijke vissoort. Daarom is besloten de vervanging van sojaeiwit door zeewiereiwit te testen in tilapia in plaats van forel.

4 Technologische screening van zeewiergrondstoffen

4.1 Doelstelling

Het doel van dit deel van het project was de selectie van drie zeewiergrondstoffen met goede technologische eigenschappen uit de geselecteerde zeewiergrondstoffen met de beste nutritionele samenstelling (Hoofdstuk 3). De geselecteerde zeewiergrondstoffen zouden getest worden op geschiktheid voor verwerking in geëxtrudeerde visvoerders. Echter dit deel van het onderzoek kon niet worden uitgevoerd vanwege een beperkte beschikbaarheid van zowel het aantal zeewiergrondstoffen als de aanwezig hoeveelheid van de twee beschikbare zeewiergrondstoffen. Er was net voldoende grondstof voor het uitvoeren van de biologische screening (hoofdstuk 5) en het bepalen van de verteerbaarheden (hoofdstuk 6) van eiwit en energie van de beschikbare zeewiergrondstoffen. Daarom is besloten van de beschikbare hoeveelheid van het groene en rode zeewiereiwitconcentraat direct de benodigde visvoerders te produceren.

4.2 Resultaten

Van alle voeders zijn drijvende voeders gemaakt (Figuur 3). Het gemiddeld pellet gewicht is weergegeven in tabel 4. Van beide zeewiereiwitconcentraten is het gelukt om drijvende voeders te maken. De beschikking hebben over drijvende voeders is van belang voor het goed uitvoeren van de in vivo proeven met tilapia als doelsoort.

Tabel 4 Het gemiddelde pellet gewicht van de experimentele diëten.

Diet	Gemiddeld pellet gewicht en standaard deviatie (g)
REF	$1.31 \cdot 10^{-2} \pm 0.03$
PG	$1.40 \cdot 10^{-2} \pm 0.04$
PR	$1.37 \cdot 10^{-2} \pm 0.07$
PGR	$1.31 \cdot 10^{-2} \pm 0.02$
CD	$2.06 \cdot 10^{-2} \pm 0.06$
DG	$1.53 \cdot 10^{-2} \pm 0.03$
DR	$1.34 \cdot 10^{-2} \pm 0.03$
DGR	$1.36 \cdot 10^{-2} \pm 0.03$

* REF = referentiediet, PG, PR en PGR de experimentele diëten voor de biologische screening waarbij 25% van het soja-eiwit is vervangen door ofwel zeewier eiwit van het zeewiereiwitconcentraat van groen zeewier (PG), rood zeewier (PR) of een combinatie van beide (1: 1) (PGR), respectievelijk, CD het commerciële diet en DG, DR en DGR, de diëten voor de verteringsproef waarbij 20% van het referentiediet werd vervangen door het zeewiereiwitconcentraat van gemaakt van groen zeewier (DG), rood zeewier (DR) of een combinatie van beide (1: 1) (DGR), respectievelijk.



Figuur 3 Een impressie van de geproduceerde experimentele diëten (A+F, B, C, D, G, H en I) en een commercieel dieet (E). Diëten A, B, C, D en E zijn gebruikt voor de biologische screening en Dieet F, G, H en I voor het bepalen van de verteerbaarheden. Voor gedetailleerde informatie wordt verwezen naar hoofdstuk 5 en 6 waarin de voeders experimenteel getest worden.

5 Biologische screening van zeewiereiwitconcentraten

5.1 Inleiding

Het doel van de biologische screening is de experimentele validatie van de voedingswaarde, zoals geanalyseerd in hoofdstuk 3, en de selectie van de beste twee/meest bruikbare zeewiereiwitconcentraten door middel van een voedingsproef. Tijdens de voedingsproef wordt onderzocht of het voer met daarin een hoeveelheid zeewiereiwitconcentraat invloed heeft op de groeiprestaties (performance) van de vis.

5.2 Opzet van het experiment

In de biologische screening of de performance test werden vijf experimentele diëten getest: een plantaardig referentiedieet (REF) met een maximaal inclusieniveau van 35% soja, drie diëten waarvan 25% van het soja-eiwit werd vervangen door ofwel zeewiereiwit afkomstig van het zeewiereiwitconcentraat van het groene zeewier (PG), het rode zeewier (PR) of een combinatie van beide (1: 1) (PGR) respectievelijk, en een commercieel dieet (PCC). De diëten werden bereid met behulp van extrusie in samenwerking met Research Diet Services (RDS, Wijk bij Duurstede, Nederland). De diëten zijn qua macro nutritionele samenstelling vergelijkbaar (tabel 5 en 6).

Voor de performance proef werden Nijl tilapia's (*Oreochromis niloticus*) gebruikt die zijn opgekweekt in de eigen faciliteiten (Carus-ARF). De vissen, met een gemiddeld individueel gewicht van 39.1 ± 0.8 g, werden random toegewezen aan de 15 tanks of experimentele eenheden (70 l) met een dichtheid van 35 vissen per tank. Het experiment bestond uit een acclimatisatieperiode van 7 dagen gevolgd door een experimentele periode van 42 dagen. Tijdens de acclimatisatie periode werden de vissen gevoerd met een commercieel dieet (Skretting; 3 mm, ruw eiwit $\pm 32\%$, etherextract $\pm 6\%$). Na de acclimatisatie periode werden de vissen twee maal daags tot schijnbare verzadiging (Ad. Lib.) gevoerd met de experimentele diëten ten einde een maximale voeropname te realiseren. Alle diëten werden in drielvoud getest.

Alle tanks, geïntegreerd in een recirculatie systeem, werden continue voorzien van vers gefilterd water met een flow van $7 \text{ l min}^{-1} \text{ tank}^{-1}$. De houderij omstandigheden en waterkwaliteit parameters gedurende de proef waren: fotoperiode 12L:12D, temperatuur $27,7 \pm 0,3$ °C, zuurstof $6,2 \pm 0,9$ mg l^{-1} , pH $7,5 \pm 0,3$, totale ammoniakstikstof (TAN) $0,1 \pm 0,2$ mg l^{-1} , NO_2^{-1} 0.05 ± 0.05 mg l^{-1} en NO_3^{-1} 168 ± 93 mg l^{-1} . De temperatuur en het zuurstofgehalte werden dagelijks gemeten. De verversing, pH, TAN en NO_2^{-1} , NO_3^{-1} werden wekelijks gemeten.

Tabel 5 De geanalyseerde samenstelling van de experimentele diëten die werden gebruikt in de performance trial.

Code*	Unit	Diet			
		REF	PG	PR	PGR
DM	(g kg ⁻¹)	964	941	950	954
As	(g kg ⁻¹ dm)	87	95	126	107
CP	(g kg ⁻¹ dm)	354	356	353	345
EE	(g kg ⁻¹ dm)	56	58	56	58
CF	(g kg ⁻¹ dm)	7.7	5.8	5.9	5.8
GE	(MJ kg ⁻¹)	19.4	19.2	18.7	19.0
CP/GE		18.2	18.5	18.9	18.2

* REF = referentiediet, PG, PR en PGR de experimentele diëten waarbij 25% van het soja-eiwit wordt vervangen door ofwel het zeewiereiwit afkomstig van zeewiereiwitconcentraat van groen zeewier (PG), rood zeewier (PR) of een combinatie van beide (1: 1) (PGR), respectievelijk. DM = droge stof, as = as, CP = ruw eiwit, EE = etherextract, CF = ruwe celstof, GE = bruto energie.

Tabel 6 Experimentele opzet en recepten van de performance trial.

Code*	Diet			
	REF	PG	PR	PGR
Basale ingrediënten (%)				
Maiszetmeel	24.3	26.02	21.48	24.3
Sojameel	18.4	13.78	13.78	13.78
Sojahullen	16.6	12.47	12.47	12.47
Vismeel Deens 68%	13.5	13.5	13.5	13.5
Tarwe gluten	8	8	8	8
Sonac 92P	5.5	5.5	5.5	5.5
Tarwe	3.5	3.5	3.5	3.5
Premix Tilapia [†]	2	2	2	2
Mono calcium fosfaat	2	2	2	2
Soja olie	2	2	2	2
Soja lecithine	1.5	1.5	1.5	1.5
Calcium carbonaat (CaCO ₃)	1.48	1.48	1.48	1.48
Zout (NaCl)	0.5	0.5	0.5	0.5
Vis olie	0.5	0.5	0.5	0.5
DL-methionine	0.2	0.2	0.2	0.2
Yttrium oxide	0.02	0.02	0.02	0.02
Test ingrediënten				
ZWEC groen	0	7.03	0	0
ZWEC rood	0	0	11.57	0
ZWEC mix	0	0	0	8.75
Som	100	100	100	100

* REF = referentiediet, PG, PR en PGR de experimentele diëten waarbij 25% van het soja-eiwit wordt vervangen door ofwel zeewiereiwit van het zeewiereiwitconcentraat (ZWEC) van groen zeewier (PG), rood zeewier (PR) of een combinatie van beide (1: 1) (PGR), respectievelijk.

[†]Vitamines (mg or IU kg⁻¹ dieet): A; 6000 IU; D₃, 2000 IU; K₃, 10 mg; B₁₂, 0.025 mg; B₁, 15 mg; B₂, 15 mg; B₆, 15 mg; foliumzuur, 3 mg; Biotine, 0.2 mg; Inositol, 400 mg; niacine, 60 mg; Pantotheenzuur acid, 50 mg, choline chloride, 2000 mg; C, 100 mg; E, 100 mg. Mineralen (g or mg kg⁻¹ dieet): Mn (mangaan sulfaat), 20 mg; I (kalium jodide), 2 mg; Cu (kopersulfaat), 10 mg; Co (kobalt sulfaat), 0.1 mg; Cr (chromium sulfaat), 1 mg; Mg (magnesium sulfaat), 500mg; Se (natrium seleniet) 0.4 mg; Fe (ijzersulfaat), 50 mg; zink (zinksulfaat) 100 mg; BHT (E300-321); 100 mg; Calcium propionaat; 1000 mg.

5.3 Berekening van de performance parameters

5.3.1 Voeropname

De vissen werden twee keer per dag (9:00 en 16:00) met de hand gevoerd tot schijnbare verzadiging. De niet opgegeten pellets werden uit de tanks verwijderd en geteld om met behulp van het gemiddelde pellet gewicht de voeropname te bepalen. De voeropname in g d^{-1} is dan de som van het voer gegeven in de ochtend en middag, minus het aantal teruggewonnen pellets maal het gemiddelde pellet gewicht per dieet. De bepaalde voeropname werd gecorrigeerd voor lichaamsgewicht en uitgedrukt in $\text{g kg}^{0.8} \text{d}^{-1}$. De voederconversie (FCR; dimensie loos) werd berekend door de voeropname te delen door de visgroei: $\text{FCR} = (\text{voeropname} / \text{visgroei})$.

5.3.2 Groei

De vissen werden gewogen aan het begin en aan het einde van de groeiperiode van 42 dagen. De dag voorafgaand aan het wegen werden de vissen niet gevoerd. Met gebruik van het gemiddelde visgewicht aan het begin (BW_0) en aan het einde (BW_t) van het experiment werd per tank de groei berekend. De groei uitgedrukt in g d^{-1} , $\% \text{ BW d}^{-1}$ en $\text{g kg}^{0.8} \text{d}^{-1}$ werd berekend met behulp van de formules: $(\text{BW}_t - \text{BW}_0)/t$, $(\text{LN}(\text{BW}_t) - \text{LN}(\text{BW}_0))/t * 100$ en $((\text{BW}_t - \text{BW}_0) / ((\text{BW}_t * \text{BW}_0)^{0.5} / 1000^{0.8}))/t$, respectievelijk waarbij t de duur van de groeiperiode weergeeft en LN de natuurlijke logaritme.

5.3.3 Statistische analyse

De data werd geanalyseerd op dieeteffecten met behulp van een One-Way ANOVA. De homogeniteit van variantie werd getest met behulp van de Levene's test. Tank werd gebruikt als de experimentele eenheid. Voor alle testen werd $p < 0.05$ als significant beschouwd. Wanneer er een significant effect werd gevonden, werden gemiddelden onderling vergeleken met behulp van de Fishers LSD post-hoc test. Wanneer noodzakelijk werd getest op dieeteffecten met behulp van de non parameterische Kruskal-Wallis-test.

5.4 Resultaten en discussie

Alle diëten werden goed gegeten door de vissen en de mortaliteit was laag 0.19% ($n = 1$ vis). De waterkwaliteit parameters bleven binnen de gestelde grenzen tot halverwege week 5. In week 5 werd in een aantal tanks het zuurstofgehalte kritisch ($< 5 \text{ mg l}^{-1}$) en werd besloten het experiment vroegtijdig te stoppen om een eventueel effect van lage zuurstofniveaus op de performance parameters te voorkomen.

De groei van de vissen gevoerd met het commerciële dieet was, zoals verwacht, goed en vergelijkbaar met de experimentele diëten ($p > 0.05$). Dit geeft aan dat experimentele omstandigheden geen invloed hebben gehad op de potentiële groeiprestaties van de experimentele diëten. Het commerciële dieet (PCC) werd uitgesloten voor verdere analyses.

Alle diëten waren gelijkwaardig qua nutritionele samenstelling (tabel 5). Het visgewicht bij aanvang (BW_0) was vergelijkbaar tussen behandelingen ($p > 0.05$; tabel 7). De voeropname tijdens het experiment, was gemiddeld 84.6, 85.7, 83.9, 90.5 g droge stof voor het referentiedieet (REF), dieet PG, PR en PGR respectievelijk en vergelijkbaar tussen behandelingen ($p > 0.05$; tabel 7). Aan het einde van het experiment werd noch de groei uitgedrukt in g d^{-1} , $\% \text{ BW d}^{-1}$ of $\text{g kg}^{0.8} \text{d}^{-1}$ beïnvloed door het dieet ($p > 0.05$; tabel 7). De voederconversie op basis van de droge stof (FCR_{dm}) werd wel beïnvloed door het dieet ($p < 0.05$; tabel 7), waarbij de FCR_{dm} van het dieet met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van groenwier (PG) 7,3% lager lag dan dat van het dieet met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van roodwier (PR). Na correctie van het as gehalte in de diëten was de voederconversie op basis van as vrij droge stof (FCR_{afdm}) vergelijkbaar tussen diëten ($p > 0.05$; tabel 7). Met andere woorden de verschillen in de FCR_{dm} worden veroorzaakt door het as gehalte aanwezig in de zeewiereiwitconcentraten en dan met name het as gehalte in het

zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het rode zeewier. De eiwit efficiëntie of "protein efficiency ratio" (PER) werd beïnvloed door het dieet ($p < 0.05$). De PER was het laagste was voor de tilapia gevoerd met het zeewiereiwitconcentraat geproduceerd uit rood zeewier en vergelijkbaar voor de andere experimentele diëten (tabel 7). De lagere PER van het voer met het zeewiereiwitconcentraat is waarschijnlijk veroorzaakt door het hogere gehalte aan niet eiwit stikstof componenten zoals beschreven in paragraaf 3.2.

Tabel 7 De resultaten van de tilapia gevoerd met de experimentele diëten waarbij 25% van het soja-eiwit is vervangen door zeewiereiwit van het zeewiereiwitconcentraat van groen zeewier (PG), rood zeewier (PR) of een combinatie van beide (1: 1).

Diet							
Codes*	Unit	REF	PG	PR	PGR	Commercial	p†
BW _{start}	g	46.7±1.2	46.3±0.7	46.8±0.4	46.6±0.7	46.2±0.9	0.84
BW _{end}	g	123.7±6.9	124.8±2.3	118.5±3.8	127.5±6.3	126.5±8.6	0.29
FI	g ds	84.6±4.6	85.7±2.7	83.9±2.8	90.5±5.4	87.0±8.8	0.26
WG	g.d ⁻¹	2.20±0.17	2.24±0.05	2.05±0.12	2.31±0.20	2.29±0.0.27	0.24
SGR	% BW.d ⁻¹	2.78±0.1	2.83±0.02	2.65±0.11	2.88±0.18	2.87±0.25	0.19
GMBW	g kg ^{0.8} d ⁻¹	17.3±0.8	17.6±0.2	16.4±0.8	18.0±1.3	17.8±2.0	0.20
FCR _{dm}	--	1.10±0.03 ^a	1.09±0.01 ^a	1.17±0.03 ^b	1.12±0.03 ^{ab}	1.10±0.11	0.03
FCR _{afds}	--	1.00±0.03	0.99±0.01	1.02±0.02	1.00±0.03	1.06±0.11	0.40
PER	--	2.57±0.07 ^a	2.57±0.02 ^a	2.42±0.06 ^b	2.59±0.07 ^a	2.31±0.25	0.02

* REF = referentiedieet, PG, PR en PGR de experimentele diëten waarbij 25% van het sojaeiwit werd vervangen door zeewiereiwit van ofwel zeewiereiwitconcentraat van groen zeewier (PG), rood zeewier (PR) of een combinatie van beide (1: 1) (PGR), respectievelijk. P = p waarde, BW = visgewicht, FI = voeropname, WG = gewichtstoename, SGR = specifieke groeisnelheid, GMBW = groei in metabolisch lichaamsgewicht, FCR_{dm} = voederconversie op basis van droge stof, FCR_{afds} = voederconversie op basis van as vrij droge stof en PER = eiwit efficiëntie. ^{abc} Gemiddelden binnen rijen met een gemeenschappelijk superscript verschillen niet significant van elkaar o.b.v. de Fisher LSD post-hoc test ($P < 0.05$).

*Vetgedrukte p-waarden zijn significant. †de p waarden zijn de uitkomsten bij toetsten onder het commerciële dieet.

6 Vaststellen verteerbaarheden

Het doel van “vaststellen verteerbaarheden” is het vaststellen van de verteerbaarheid van het eiwit en de energie van de beschikbare zeewiereiwitconcentraten en selectie van de best verteerbare en of het meest bruikbare zeewiereiwitconcentraat door middel van een in vivo verteringsproef.

6.1 Opzet van het experiment

In de in vivo verteerbaarheidsproef werden vier experimentele diëten vergeleken: het plantaardige referentiedieet (REF), hetzelfde dieet als gebruikt in het performance experiment, en drie diëten waarvan 20% van het referentiedieet werd vervangen door ofwel 20% van de groene (DG), respectievelijk rode (DR) of gemengde (DGR) zeewiereiwitconcentraat. Yttrium werd aan de experimentele diëten toegevoegd als een inerte marker om de schijnbare verteerbaarheidscoëfficiënt (ADC) of de schijnbare absorptiecoëfficiënt (ACC) van de voedingscomponenten in de diëten te kunnen berekenen. De diëten werden bereid met behulp van extrusie in samenwerking met Research Diet Services (RDS, Wijk bij Duurstede, Nederland) (tabel 8 en 9).

Voor de verteringsproef werden Nijl tilapia's (*Oreochromis niloticus*) gebruikt die zijn opgekweekt in de eigen faciliteiten (Carus-ARF). De vissen met een gemiddeld individueel gewicht van 39.1 ± 0.8 g, werden random toegewezen aan de 12 tanks of experimentele eenheden (70 l) met een dichtheid van 37 vissen per tank. Het experiment bestond uit een acclimatisatieperiode van 7 dagen gevolgd door een experimentele periode van 42 dagen. Tijdens de acclimatisatie periode werden de vissen gevoerd met een commercieel dieet (Skretting; 3 mm, ruw eiwit $\pm 32\%$, etherextract $\pm 6\%$). Na de acclimatisatie periode werden de vissen twee keer per dag met de hand gevoerd (8:30 en 16:30). Voor de start van het experiment werd het droge stof gehalte van de diëten bepaald om voor alle diëten een gelijk voerniveau op droge stof basis te kunnen toepassen. Het voerniveau op basis van de droge stof werd beperkt tot $\pm 85\%$ van het maximale voerniveau, toenemend evenredig met het lichaamsgewicht en werd voor alle tanks gelijk gehouden. Ter controle of al het voer gegeten was werden tanks en cyclonen 1 uur na het voeren gecontroleerd op niet gegeten pellets. Indien aanwezig, werden deze geteld om de werkelijke voeropname te kunnen bepalen. Alle diëten werden in drievoud getest.

Alle tanks, geïntegreerd in een recirculatie systeem, werden continue voorzien van vers gefilterd water ($7 \text{ l min}^{-1} \text{ tank}^{-1}$). De houderij omstandigheden en waterkwaliteit parameters gedurende de proef waren: fotoperiode 12L:12D, temperatuur $27,7 \pm 0,3$ °C, zuurstof $6,2 \pm 0,9$ mg l⁻¹, pH $7,5 \pm 0,3$, totale ammoniakstikstof (TAN) $0,1 \pm 0,2$ mg l⁻¹, NO₂⁻¹ 0.05 ± 0.05 mg l⁻¹ en NO₃⁻¹ 168 ± 93 mg l⁻¹. Alle genoemde parameters zijn gedurende het experiment binnen de vooraf ingestelde grenswaarden gebleven. De temperatuur en het zuurstofgehalte werden dagelijks gemeten. De verversing, pH, TAN en NO₂⁻¹, NO₃⁻¹ werden wekelijks gemeten.

Tabel 8 De geanalyseerde samenstelling van de experimentele diëten.

Code	Unit	Ref	DG	DR	DGR
DM	(g kg ⁻¹)	964	885	943	934
Ash	(g kg ⁻¹ dm)	87	109	148	129
CP	(g kg ⁻¹ dm)	354	372	332	352
EE	(g kg ⁻¹ dm)	56	59	55	58
CF	(g kg ⁻¹ dm)	7.7	5.6	6.4	6.2
GE	(MJ kg ⁻¹)	19.4	18.9	18.0	18.5
CP/GE		18.2	19.7	18.4	19.0

* REF = referentiedieet, DG, DR en DGR, de diëten waarbij 20% van het referentiedieet werd vervangen door het zeewiereiwitconcentraat van gemaakt van groen zeewier (DG), rood zeewier (DR) of een combinatie van beide (1: 1) (DGR), respectievelijk. DM = droge stof, as = as, CP = ruw eiwit, EE = etherextract, CF = ruwe celstof, GE = bruto energie.

Tabel 9 Formulering van de experimentele voeders gebruikt in de verteringsproef.

Code*	Ref	DG	DR	DGR
Ingrediënten (%)				
Maiszetmeel	24.3	19.44	19.44	19.44
Sojameel	18.4	14.72	14.72	14.72
Sojahullen	16.6	13.28	13.28	13.28
Vismeele Deens 68%	13.5	10.8	10.8	10.8
Tarwe gluten	8	6.4	6.4	6.4
Sonac 92P	5.5	4.4	4.4	4.4
Tarwe	3.5	2.8	2.8	2.8
Premix Tilapia [†]	2	1.6	1.6	1.6
Mono calcium fosfaat	2	1.6	1.6	1.6
Soja olie	2	1.6	1.6	1.6
Soja lecithine	1.5	1.2	1.2	1.2
Calcium carbonaat (CaCO ₃)	1.48	1.18	1.18	1.18
Zout (NaCl)	0.5	0.4	0.4	0.4
Vis olie	0.5	0.4	0.4	0.4
DL-methionine	0.2	0.16	0.16	0.16
Yttrium oxide	0.02	0.02	0.02	0.02
Test ingrediënten				
ZWEC groen	0	20	0	0
ZWEC rood	0	0	20	0
ZWEC mix	0	0	0	20
Som	100	100	100	100

* REF = referentiedieet, DG, DR en DGR, de diëten waarbij 20% van het referentiedieet werd vervangen door het zeewiereiwitconcentraat (ZWEC) van gemaakt van groen zeewier (DG), rood zeewier (DR) of een combinatie van beide (1: 1) (DGR), respectievelijk. [†]Vitaminen (mg or IU kg⁻¹ dieet): A; 6000 IU; D3, 2000 IU; K3, 10 mg; B12, 0.025 mg; B1, 15 mg; B2, 15 mg; B6, 15 mg; foliumzuur, 3 mg; Biotine, 0.2 mg; Inositol, 400 mg; niacine, 60 mg; Pantotheenzuur acid, 50 mg; choline chloride, 2000 mg; C, 100 mg; E, 100 mg. Mineralen (g or mg kg⁻¹ dieet): Mn (mangaan sulfaat), 20 mg; I (kalium jodide), 2 mg; Cu (kopersulfaat), 10 mg; Co (kobalt sulfaat), 0.1 mg; Cr (chromium sulfaat), 1 mg; Mg (magnesium sulfaat), 500mg; Se (natrium seleniet) 0.4 mg; Fe (ijzersulfaat), 50 mg. Zink (zinksulfaat 100 mg); BHT (E300-321); 100 mg; Calcium propionaat; 1000 mg.

6.2 Monsternamen en berekeningen

6.2.1 Voeropname

De vissen werden twee keer per dag (9:00 en 16:00) met de hand beperkt gevoerd. De niet opgegeten pellets werden geteld om met behulp van het gemiddelde pellet gewicht de voeropname te bepalen. De voeropname in g d^{-1} is dan de som van het voer gegeven in de ochtend en middag, minus het aantal teruggewonnen pellets maal het gemiddelde pellet gewicht per dieet. De bepaalde voeropname werd gecorrigeerd voor lichaamsgewicht en uitgedrukt in $\text{g kg}^{0.8} \text{d}^{-1}$. De voederconversie (FCR; dimensie loos) werd berekend door de voeropname te delen door de visgroei: $\text{FCR} = (\text{voeropname} / \text{visgroei})$.

6.2.2 Groei

De vissen werden gewogen aan het begin en aan het einde van de experimentele periode van 42 dagen. De dag voorafgaand aan het wegen werden de vissen niet gevoerd. Met het gebruik van het gemiddelde visgewicht aan het begin (BW_0) en aan het einde (BW_t) van het experiment werd per tank de groei berekend. De groei uitgedrukt in g d^{-1} , $\% \text{ BW d}^{-1}$ en $\text{g kg}^{0.8} \text{d}^{-1}$ werd berekend met behulp van de formules: $(\text{BW}_t - \text{BW}_0)/t$, $(\text{LN}(\text{BW}_t) - \text{LN}(\text{BW}_0))/t * 100$ en $((\text{BW}_t - \text{BW}_0) / ((\text{BW}_t * \text{BW}_0)^{0.5} / 1000^{0.8}))/t$, respectievelijk waarbij t de duur van de groeiperiode weergeeft en LN de natuurlijke logaritme.

6.2.3 Vis, bloed en lever

Alle vissen die nodig waren voor het verkrijgen van monstermateriaal werden vóór de bemonstering opgeofferd met een overdosis phenoxyethanol (1:1000). Zowel aan het begin (2 per tank; 24 in totaal) als het einde van het experiment (35 vissen tank⁻¹) werden vissen bemonsterd voor bloed ($n=5$) en lever ($n=10$) en werden hele vissen opgeslagen voor het bepalen van de macro nutritionele samenstelling ($n=5$) en analyse van mineralen ($n=5$). De monsters voor de analyse van de macro nutritionele samenstelling en analyse van mineralen werden opgeslagen bij -20°C .

Bloed werd bemonsterd door een caudale veneuze punctie, met behulp van een gehepariniseerde spuit (0,6 mm / 30 mm naald) bij de start (2 vissen tank⁻¹; 24 in totaal) en aan het einde van het experiment (5 vissen tank⁻¹). Na het verzamelen werd het bloed overgebracht naar Eppendorf tubes (1.5 ml), opgeslagen op ijs en binnen 15 minuten verwerkt. De hematocriet waarde (Hct) werd in tweevoud bepaald met behulp van capillairen ($\varnothing$ 1,5 mm, L 75 mm) en een hematocriet centrifuge (Haematokrit 210, Hettich, Duitsland). Voor de hematocriet bepaling werd het bloed gedurende 5 minuten gecentrifugeerd bij 11.000 toeren of 5.000 g. Het resterende deel van het bloedmonster werd gecentrifugeerd (8.000 rpm, 4°C , 10 minuten) voor het verkrijgen van bloedplasma. Een gelijke hoeveelheid gehomogeniseerd plasma (250 μl) van elke vis werd gepoold per tank, direct ingevroren in vloeibare stikstof en bewaard bij -80°C . De plasmamonsters werden geanalyseerd op osmolaliteit, ijzer, ijzerbindend vermogen, ijzerverzadiging, alanine aminotransferase (ALAT), aspartaat aminotransferase (ASAT), cholesterol en foliumzuur. De analyses zijn uitgevoerd door de Universiteit Veterinair Diagnostisch Lab (UVDL, Utrecht, Nederland).

Faeces voor het bepalen van de eiwit- en energieverteerbaarheid en de absorptie van mineralen werd verzameld gedurende de laatste twee weken van het experiment met behulp van cyclonen. De faeces werd verzameld in een afneembare fles van 250 ml die op de bodem van elke cycloon was geplaatst. Tijdens het verzamelen van de faeces werden de flessen op ijs bewaard om de bacteriële afbraak te minimaliseren. Na het verzamelen werd de faeces opgeslagen bij -20°C , gevriesdroogd, gepoold per tank en bewaard tot aan de uitvoering van de analyses.

De schijnbare verteerbaarheidscoëfficiënt of de apparent digestibility coëfficiënt (ADC's) van het ruw eiwit (RE) en de bruto energie (GE) werd berekend met behulp van formule 1. De ADC's van RE en GE van de zeewiereiwitconcentraten werden berekend met behulp van formule 2. De schijnbare absorptiecoëfficiënten of de apparent absorption coefficients (AAC's) van de mineralen werden berekend met dezelfde formule.

$$1) ADC \text{ or } AACstof_{(x)} = 100 - \left(100 * \left(\frac{\% Yttrium_{dieet}}{\% Yttrium_{faeces}} \right) * \left(\frac{\% stof_{x_{faeces}}}{\% stof_{x_{dieet}}} \right) \right)$$

Met:

ADC/ACCstof _(x)	= de schijnbare verteerbaarheid of absorptie coëfficiënt
% Yttrium dieet	= Yttrium concentratie in het dieet
% Yttrium faeces	= Yttrium concentratie in de faeces
% stof (x) faeces	= concentratie stof x in faeces
% stof (x) dieet	= concentratie stof x in dieet

$$2) ADC_{test \text{ ingr.}} = ADC_{test \text{ dieet}} + ((ADC_{test \text{ dieet}} - ADC_{ref \text{ dieet}}) * ((0.8 * Nutrient \ x_{ref \text{ dieet}}) / (0.2 * Nutrient \ x_{test \text{ ingr.}})))$$

Met:

ADC _{test ingr.}	= ADC test ingrediënt,
ADC _{test diet}	= ADC experimentele voeder,
ADC _{ref diet}	= ADC van het referentie dieet.

Het yttrium en gehalte aan mineralen van zowel faeces als de voeders zijn geanalyseerd in samenwerking met de afdeling Aquacultuur en Visserij (AFI, Wageningen Nederland) en het CBLB (Chemisch Biologisch Laboratorium; Wageningen, Nederland), met behulp van ICP-EAS (Varian Vista pro radial, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA USA) volgens de richtlijnen NPR-6425 en NEN-6966 en wanneer nodig met behulp van ICP-MS (e.g. Co en Mo) (Element2, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA USA) volgens de richtlijnen NEN-EN-ISO 17294-1 en 17294-2). De macronutriële samenstelling van de monsters zijn geanalyseerd door Nutrilab BV. Giessen, Nederland.

Voor de berekening van de retentie van mineralen in de vis zijn tien vissen per tank gepoold en verwerkt tot een homogeen monster. Van de gehomogeniseerde monsters zijn vervolgens de macro nutritionele samenstelling (droge stof, ruw eiwit, etherextract, en as) en de gehalten van de mineralen bepaald. De macro nutritionele samenstelling is geanalyseerd door Nutrilab BV. Giessen, Nederland en de mineralen gehalten door AFI en het CBLB te Wageningen. Met behulp van de samenstelling van de vis in combinatie met de groei, de voeropname en samenstelling van de voeders is met onderstaande formules (3, 4 en 5) de retentie van de geanalyseerde mineralen berekend.

$$3) RE_{\text{mineraal}_X} = \text{groei}_{\text{mineraal}_X} / \text{inname}_{\text{mineraal}_X}$$

$$4) \text{Groei}_{\text{mineraal}_X} = (BW_{\text{eind}} * \text{Mineraal}_X_{\text{Vis}_{\text{eind}}}) / (((100 - BW_{\text{start}} * \text{Mineraal}_X_{\text{Vis}_{\text{start}}}) / 100) / (BW_{\text{start}}^{0.5} / 1000)^{0.8} / t)$$

$$5) \text{Inname}_{\text{mineraal}_X} = FI * (\text{Mineraal}_X_{\text{Voer}} / 100)$$

RE _{mineraal_X}	=retentie efficiëntie mineraal X (%)
Groei _{mineraal_X}	=groei mineraal X in g kg ^{0.8} dag ⁻¹
BW _{start}	=startgewicht vis in g
BW _{eind}	=eindgewicht vis in g
t	=duur van het experiment in dagen
Mineraal_X_Vis _{start}	=gehalte mineraal X in vis start experiment
Mineraal_X_Vis _{eind}	=gehalte mineraal X in vis einde experiment
Inname _{mineraal_X}	=inname mineraal X in g kg ^{0.8} dag ⁻¹
FI	=voeropname in g kg ^{0.8} dag ⁻¹
Mineraal_X_voer	=gehalte mineraal X voer (%)

6.2.4 Statistische analyse

De data werd geanalyseerd op dieeteffecten met behulp van een One-Way ANOVA. De homogeniteit van variantie werd getest met behulp van de Levene's test. Tank werd gebruikt als de experimentele eenheid. Voor alle testen werd $p < 0.05$ als significant beschouwd. Wanneer er een significant effect werd gevonden, werden gemiddelden onderling vergeleken met behulp van de Fishers LSD post-hoc test. Wanneer noodzakelijk, werd getest op dieeteffecten met behulp van de non parameterische Kruskal-Wallis-test.

6.3 Resultaten en discussie

6.3.1 Diëten

De diëten met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier (DG), rode zeewier (DR) of een combinatie van beide (DGR) bevatte respectievelijk 37.2%, 33.2% en 35.2% eiwit ten opzichte van 35.4% eiwit in het referentie dieet. Het dieet met daarin het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier had daarmee het hoogste eiwit gehalte. Het vetgehalte of ether extract (EE) van de diëten met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier (DG), rode zeewier (DR) of een combinatie van beide (DGR) was respectievelijk 5.9%, 5.5% en 5.8% ten opzichte van een vetgehalte van 5.6% in het referentie dieet. Het as gehalte van de diëten met zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier (DG), rode zeewier (DR) of een combinatie van beide (DGR) was 10.9%, 14.8% en 12.9% en lag gemiddeld $\pm 48\%$ hoger dan het as gehalte van 8.7% in het referentie dieet met als uitschieter dieet DR, waarvan het as gehalte 70% hoger lag. De bruto energie gehalten van de diëten met de zeewiereiwitconcentraten waren allen lager dan die van het referentie dieet (tabel 8).

6.3.2 Groei, voeropname en voederconversie

Tijdens de experimentele periode bleven de waterkwaliteit parameters binnen de gestelde grenzen en was de mortaliteit met 0.75% laag ($n = 3$). Het visgewicht bij aanvang van het experiment (BW_{start}) was vergelijkbaar tussen behandelingen ($p > 0.05$; tabel 10). Alle experimentele diëten werden goed gegeten door de vissen. De voeropname tijdens de proef was gemiddeld 89.0, 88.8, 88.0 en 88.4 g droge stof gedurende de gehele proef voor de vissen gevoerd met het referentiedieet, dieet DG, DR en DGR respectievelijk en vergelijkbaar tussen behandelingen ($p > 0.05$; tabel 10). Het visgewicht (g) en de groei uitgedrukt in $g\ d^{-1}$, $\% BW\ d^{-1}$ of $g\ kg^{0.8}\ d^{-1}$ werden beïnvloed door dieet ($p < 0.05$; tabel 10). De groei van de vissen gevoerd met daarin het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene wier was $\pm 16\%$ hoger dan de groei van de vissen gevoerd met het dieet met daarin het zeewiereiwitconcentraat van het rode zeewier ($p < 0.05$). In vergelijkbare mate werd de voederconversie op basis van de droge stof (FCR_{dm}) beïnvloed door dieet ($p < 0.05$; tabel 10), waarbij de FCR_{dm} van het dieet met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het rode zeewier (DR) $\pm 15\%$ hoger lag dan dat van het dieet met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier (DG). Na correctie voor het as gehalte in de diëten bleef het verschil tussen de diëten significant: de voederconversie op basis van as vrij droge stof (FCR_{afdm}) was het hoogst voor DR en het laagst voor DG ($p < 0.05$; tabel 10). Het hogere as gehalte in het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het rode zeewier lijkt hiervoor de meest logische verklaring. De eiwit efficiëntie of de proteïne efficiency ratio (PER) werd niet beïnvloed door het dieet ($p > 0.05$), al is er een trend zichtbaar dat de PER het hoogste is voor het referentie dieet. De hepatosomatische index (HSI) werd niet beïnvloed door de verschillende diëten ($p > 0.05$; tabel 10).

6.3.3 Bloed parameters

*Het cholesterolgehalte in het bloed van de vissen die werden gevoerd met het dieet met daarin het zeewiereiwitconcentraat geproduceerd uit het rode zeewier lag meer dan 20% hoger dan het cholesterolgehalte van de vissen gevoerd met de andere diëten ($p < 0.05$; tabel 11). Dit is te verklaren doordat het zeewiereiwitconcentraat van het rode zeewier is gemaakt van de soort *Solaria chordalis*, die behoort tot de Phylum van de Rhodophyta. In de meeste roodwieren ($\pm 85\%$), behorend tot de*

Phylum van de Rhodophyta, is cholesterol het meest voorkomende type sterol, terwijl in Ulva iso-fucosterol het meest voorkomende type sterol is (Patterson, 1971; Patterson, 1973). Geen van de andere gemeten bloedparameters (osmolariteit, ijzer, ijzerbindend vermogen, ijzerverzadiging, foliumzuur, ALAT, ASAT en Hct) lieten een verschil zien tussen behandelingen.

Tabel 10 De resultaten van de tilapia gevoerd met de experimentele diëten waarbij 20% van het referentiedieet werd vervangen door een van de zeewiereiwitconcentraten.

Dieet						
Codes*	Eenheid	REF	DG	DR	DRG (1:1)	p
BW _{start}	g	46.4 ± 1.0	47.9 ± 0.6	47.5 ± 1.2	47.9 ± 1.4	0.34
BW _{end}	g	124.5 ± 1.6 ^a	125.3 ± 1.7 ^a	114.4 ± 1.8 ^c	119.1 ± 1.6 ^b	0.00
FI	g dm	89.0 ± 0.8	88.8 ± 0.0	88.0 ± 1.0	88.4 ± 0.0	0.29
WG	g d ⁻¹	1.86 ± 0.06 ^a	1.84 ± 0.03 ^a	1.59 ± 0.06 ^c	1.69 ± 0.05 ^b	0.00
SGR	% BW d ⁻¹	2.30 ± 0.07 ^a	2.29 ± 0.01 ^a	2.09 ± 0.08 ^b	2.17 ± 0.07 ^b	0.01
GMBW	g kg ^{0.8} d ⁻¹	14.6 ± 0.5 ^a	14.3 ± 0.1 ^a	12.8 ± 0.5 ^b	13.4 ± 0.5 ^b	0.00
FCR _{dm}	--	1.16 ± 0.05 ^a	1.15 ± 0.02 ^a	1.32 ± 0.03 ^c	1.24 ± 0.03 ^b	0.00
FCR _{afds}	--	1.06 ± 0.04 ^{ab}	1.02 ± 0.02 ^a	1.12 ± 0.03 ^b	1.08 ± 0.03 ^{ab}	0.03
PER	--	2.43 ± 0.10	2.34 ± 0.04	2.29 ± 0.06	2.29 ± 0.06	0.10
HSI	%	2.17 ± 0.11	2.04 ± 0.17	2.21 ± 0.13	2.12 ± 0.17	0.55

* REF = referentiedieet en de diëten, DG, DR en DGR waarbij 20% van het referentiedieet werd vervangen door het zeewiereiwitconcentraat van gemaakt van groen zeewier (DG), rood zeewier (DR) of een combinatie van beide (1: 1) (DGR), respectievelijk. P = p waarde, BW = visgewicht, FI = voeropname, WG = gewichtstoename, SGR = specifieke groeisnelheid, GMBW = groei in metabolisch lichaamsgewicht, FCR_{dm} = voederconversie op basis van droge stof, FCR_{afds} = voederconversie op basis van as vrij droge stof en PER = eiwittefficiëntie. ^{abc} Gemiddelden binnen rijen met een gemeenschappelijk superscript verschillen niet significant van elkaar o.b.v. de Fisher LSD post-hoc test (P < 0.05).

*Vetgedrukte P-waarden zijn significant.

Tabel 11 De bloed parameters van de tilapia gevoerd met de verschillende diëten.

Dieet						
Parameter	Eenheid	REF	DG	DR	DGR	p waarde
Osmolaliteit	mOsmol kg ⁻¹	323 ± 2	327 ± 2	327 ± 1	328 ± 2	0.07
Ijzer	µmol l ⁻¹	14.7 ± 0.4	14.2 ± 1.3	14.2 ± 1.3	15.0 ± 2.0	0.85
Ijzerbindingscapaciteit	µmol l ⁻¹	51.4 ± 4.8	50.5 ± 2.3	55.4 ± 1.0	53 ± 2.5	0.27
Ijzerverzadiging	µmol l ⁻¹	28.9 ± 3.7	28.1 ± 1.3	25.6 ± 2.4	28.4 ± 5.0	0.55
Cholesterol	mmol l ⁻¹	3.4 ^a ± 0.4	3.3 ^a ± 0.0	4.2 ^b ± 0.2	3.5 ^a ± 0.3	0.01
Foliumzuur	nmol l ⁻¹	153 ± 42	165 ± 5	247 ± 55	175 ± 19	0.05
Alat	U l ⁻¹	11.7 ± 1.5	12.0 ± 1.0	18.0 ± 7.0	11.6 ± 2.9	0.21
Asat	U l ⁻¹	51 ± 19	63 ± 12	75 ± 41	66 ± 36	0.80
Hct	%	35.9 ± 1.1	34.1 ± 1.0	34.6 ± 0.6	34.7 ± 4.3	0.80

Hct = haematocrit, ALAT = alanine aminotransferase, ASAT = aspartateaminotransferase. ^{abc} Gemiddelden binnen rijen met een gemeenschappelijk superscript verschillen niet significant van elkaar o.b.v. de Fisher LSD post-hoc test (P < 0.05).

6.3.4 De schijnbare verteerbaarheden

De schijnbare verteerbaarheidscoëfficiënt (ADC) van het ruw eiwit van de diëten was hoger voor het referentiedieet (REF) in vergelijking met die van de experimentele diëten (DG, DR en DGR) (p < 0.05; tabel 12). De ruwe eiwitverteerbaarheid van de zeewiereiwitconcentraten was vergelijkbaar al is er een trend dat het eiwit uit het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van Ulva, het groene zeewier, de hoogste eiwitverteerbaarheid vertoonde (tabel 12). De bruto energie verteerbaarheid was vergelijkbaar voor alle diëten (p > 0.05; tabel 12). Hetzelfde geldt voor de bruto energie verteerbaarheid van de drie verschillende zeewiereiwitconcentraten (p > 0.05).

Tabel 12 De schijnbare verteerbaarheidscoëfficiënten (ADC's) van eiwit en energie van de diëten en de zeewiereiwitconcentraten.

Codes*	Unit	Diet				p
		REF	DG	DR	DRG (1:1)	
ADC _{RE} dieet	%	91.6±0.3 ^a	89.3±0.3 ^b	89.0±0.7 ^b	88.5±0.6 ^b	0.00
ADC _{RE} ingrediënt	%	NA	81.2±1.3	73.4±5.0	75.1±3.3	0.08
ADC _{GE} dieet	%	79.3±0.4	77.8±0.1	78.4±1.1	77.6±0.5	0.07
ADC _{GE} ingrediënt	%	NA	70.4 ±0.9	72.9±8.5	68.0±3.1	0.56

* REF = referentiedieet en de diëten, DG, DR en DGR waarbij 20% van het referentiedieet werd vervangen door het zeewiereiwitconcentraat van gemaakt van groen zeewier (DG), rood zeewier (DR) of een combinatie van beide (1: 1) (DGR), respectievelijk. Met p = p waarde, ADC = schijnbare verteerbaarheid coëfficiënt of apparent digestibility coëfficiënt, RE = ruw eiwit en GE = bruto energie. ^{abc} Gemiddelden binnen rijen met een gemeenschappelijk superscript verschillen niet significant van elkaar o.b.v. de Fisher LSD post-hoc test (P < 0.05). *Vetgedrukte P-waarden zijn significant.

De ADC waarden voor ruw eiwit en bruto energie van het zeewiereiwitconcentraat gemaakt uit het groene zeewier (*Ulva spp.*) waren met respectievelijk 81.2% en 70.4% (tabel 12) 18% en 13% hoger dan de waarden van 63.4% en 57.1% voor (*Ulva*) gevonden door Pereira et al. (2012). Dit verschil is waarschijnlijk het gevolg van het feit dat Pereira et al. (2012) gedroogd en gemalen *Ulva* (<800 µm) gebruikte als ingrediënt in plaats van een zeewiereiwitconcentraat van *Ulva*. Het ruwe eiwit en de energie aanwezig in het zeewiereiwitconcentraat zijn waarschijnlijk (deels) beter ontsloten. Daarnaast zijn de diëten gebruikt in het onderzoek van Pereira et al (2012) geproduceerd met behulp van een pelleteer machine in plaats een extruder en de wijze van productie kan effect hebben op de ADC waarden (Cheng en Hardy 2003). Verder is het mogelijk dat de deeltjesgrootte verdeling van het zeewiereiwitconcentraat kleiner was dan 800 µm (figuur 1), al is deze niet bepaald. Hoe kleiner de deeltjes hoe beter beschikbaar; zowel Eya & Lovell (1997) als Vielma et al. (1999) rapporteerde dat fijngemalen materiaal meer beschikbaar is dan grof gemalen materiaal. Dit is ook logisch, omdat onder identieke omstandigheden kleinere deeltjes gemakkelijker oplossen door het grotere oppervlak van de deeltjes.

In Pereira et al. (2012) werd het Choubert systeem gebruikt voor het verzamelen van faeces. In dit onderzoek is de faeces verzameld door middel van bezinking (cyclonen). De kans bestaat dat tijdens het verzamelen van de faeces met behulp van bezinking de faeces langer in het water verblijft in vergelijking met het Choubert systeem. Hierdoor kunnen verteerbaarheden worden overschat aangezien de water oplosbare nutriënten mogelijk langer de tijd hebben gehad om deels op te lossen in het water. Een methode die de kans op overschatting van verteerbaarheden uitsluit en door Davies & Serwata (2005) als meest favoriet wordt gezien is het zogenaamde strippen. Strippen is een methode waarbij de faeces uit het rectum van de vis worden geduwd door lichte druk uit te oefenen op het achterste gedeelte van de buik. Het strippen van tilapia is niet mogelijk en was dus geen optie voor dit onderzoek.

De resultaten voor de schijnbare verteerbaarheid coëfficiënten (ADC's) van het ruwe eiwit in de experimentele diëten wijken beperkt af van dat van het referentie dieet, zeker gezien het feit dat in dieet DG, DR en DGR, 20% van het referentie dieet werd vervangen door één van de zeewiereiwitconcentraten. De ADC van het ruwe eiwit in het referentie dieet ligt dan wel hoger dan de ADC's van het ruwe eiwit in de diëten met de zeewier eiwitconcentraten, maar het verschil is, met gemiddeld 2.7%, gering. Bovendien werd door de vervanging van 20% van het referentie dieet door het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van *Ulva* de prestatie indicatoren, zoals de groei en voederconversie, van dit dieet niet aangetast (tabel 10).

Alhoewel de eiwitverteerbaarheid van de verschillende zeewiereiwitconcentraten vergelijkbaar is, is de eiwitverteerbaarheid van het eiwit uit het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van *Ulva* numeriek het hoogst. De schijnbare eiwitverteerbaarheid van 81,2% is lager dan de eiwitverteerbaarheid gevonden voor sojameel (91%), maar relatief hoog in vergelijking tot andere ingrediënten getest in tilapia, zoals bijvoorbeeld maïs, gebroken rijst, sorghum, gammarid meel en poultry by product meel (tabel 13). De waarden voor de energie verteerbaarheid van de zeewiereiwitconcentraten zijn, met uitzondering van poultry by product, raapzaadmeel, rijstzemelen en wheat middlings, in het algemeen lager dan de

energieverteerbaarheid van ingrediënten getest in tilapia (tabel 13).

Tabel 13 De schijnbare verteerbaarheidscoëfficiënten van ruw eiwit en energie van een aantal ingrediënten getest in tilapia.

Ingredient	ADC CP (%)	ADC Energie (%)
Broken rice	63 ^a	95 ^a
Corn grain	75 ^b	61 ^b
Ground corn	83.3	76
Gammarid meal	76 ^e	76 ^e
Fishmeal	79 ^c	80 ^c
Meat and bone meal	78 ^b	-
Poultry by product meal	74 ^a	59 ^b
Rapeseed meal	85 ^b	57 ^b
Rice-bran	67 ^a	58 ^a
Sorghum	57 ^a	69 ^b
Soybean meal	91 ^c	83 ^c
Wheat middling	75 ^b	58 ^b

^aGuimarães et al. (2008), ^bNRC, (2011), ^cPezatto et al. (2002) ^dHanley, (1987), ^eKoprucu and Ozdemir (2004).

De resultaten van dit onderzoek pleiten voor het testen van het maximale en of optimale inclusieniveau van het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van Ulva in diëten voor tilapia om de mogelijkheden voor het vervangen van sojaeiwit door eiwitconcentraten uit Ulva verder te onderzoeken. Dit onderzoek geeft in ieder geval weer dat een inclusie niveau van 20% van het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van Ulva geen negatief effect heeft op de groei en de voederconversie en daardoor een mogelijk alternatief is voor sojameel in voeders voor tilapia.

6.3.5 De schijnbare absorptie coëfficiënten, retentie en gehalten van mineralen

6.3.5.1 Gehalten aan mineralen

Het gehalte van een aantal mineralen in de experimentele diëten werd duidelijk beïnvloed door de uitwisseling van 20% van het referentie dieet met de zeewiereiwitconcentraten. Het gehalte van kobalt (Co), ijzer (Fe), nikkel (Ni), antimoon (Sb), tin (Sn) en vanadium (V) is ongeveer anderhalf tot twee maal hoger in de diëten met de zeewiereiwitconcentraten in vergelijking tot het referentie dieet. De hoogste mineraal gehalten werden veelal gevonden bij het dieet waarbij 20% van het referentie dieet werd uitgewisseld met het zeewiereiwitconcentraat geproduceerd van het rode zeewier (tabel 14). Dit is te verklaren door het hoge as gehalte van het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het rode zeewier (tabel 2). Het gehalte van arseen (As) en lood (Pb) ligt gemiddeld 6 maal en 4 maal hoger in de diëten waarbij 20% van het referentie dieet is uitgewisseld met de zeewiereiwitconcentraten. Voor lood ligt de waarde het hoogst in het dieet met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt uit het rode zeewier, voor arseen is er nagenoeg geen verschil tussen de diëten met daarin de zeewiereiwitconcentraten (tabel 14). Voor de overige geanalyseerde mineralen fosfaat (P), calcium (Ca), koper (Cu), zink (Zn), cadmium (Cd) en chroom (Cr) zijn de gehalten tussen het referentie dieet en de diëten met daarin zeewiereiwitconcentraat vergelijkbaar of gemiddeld iets hoger in het referentie dieet (tabel 14).

De hoge gehalten van veel spoorelementen en zware metalen in zeewier en zeewierproducten wordt veroorzaakt door het grote adsorptieve vermogen van zeewieren. Dit adsorptieve vermogen is onder andere het gevolg van het gehalte en type polysachariden aanwezig in de celwand van zeewieren, zoals agar en carrageen in roodwieren en de zogenaamde ulvanen in groenwieren. Deze polysachariden zijn rijk aan negatief geladen groepen die positieve geladen deeltjes, zoals metaal ionen aantrekken. Hierdoor kunnen de in water opgeloste mineralen zich gemakkelijk ophopen, waardoor het gehalte aan mineralen in zeewieren tot wel 100 maal hoger kan zijn in vergelijking met de gehalten van veel spoor elementen in landplanten. Het gehalte aan zware metalen, zoals

bijvoorbeeld arseen, cadmium en lood kan zelfs 200 tot 500 maal hoger zijn dan de waarden gevonden in landplanten (Circuncisão et al. 2018).

Van de zware metalen zorgt het gehalte aan arseen in zeewier meestal voor de grootste zorgen, al is de toxiciteit van arseen sterk afhankelijk van de vorm. De anorganisch vorm is veel giftiger dan de organische vorm (WHO, 2017). Zeewier bevat voornamelijk organische vormen van arseen, waarvan het grootste gedeelte bestaat uit arsenosuikers en een kleiner deel uit methylderivaten van arseen, zoals arsenobetaine (Devang en Khambholja 2015; Circuncisão et al. 2018). De anorganische vormen van arseen in zeewier worden hoofdzakelijk vertegenwoordigd door arsenaat (As^{5+}) en arseniet (As^{3+}) (Circuncisão et al. 2018). De EFSA (2009) rapporteerde dat arsenosuikers, die als niet toxisch worden beschouwd (Lima-Venture, 2011), bij mensen voornamelijk worden gemetaboliseerd tot dimethylarsinaat (DMA^{3+} en DMA^{5+}). DMA wordt als matig toxisch beschouwd (Lima-Venture, 2011). Recent komt er echter, onder andere met de identificatie van thio-dimethylarsinezuur als een metaboliet van arsenosuikers en de bevinding dat thio-dimethylarsinezuur een groter cytotoxiciteit heeft als anorganisch arseen³⁺, dat als zeer toxisch wordt beschouwd, steeds meer informatie beschikbaar dat de metabolisatie van arsenosuikers tot DMA toch gezondheidsrisico's met zich mee kunnen brengen. In muizen is inmiddels aangetoond dat langdurige inname van arsenosuikers DNA-schade, oxidatieve stress, neurologische gedragsstoornissen en hyperkinesie veroorzaken (Yamauchi en Sun, 2019). Deze resultaten vragen om meer onderzoek naar het effect zowel directe als indirecte consumptie van zeewierproducten. Arsenobetaine wordt als niet-toxisch beschouwd (Berntssen et al. 2012) omdat het in de mens niet wordt gemetaboliseerd en onveranderd wordt uitgescheiden (EFSA 2009).

Tabel 14 De geanalyseerde gehalten van mineralen in g of mg kg^{-1} droge stof in het referentie dieet, de experimentele diëten met daarin de verschillende zeewiereiwitconcentraten en de vis op t(0).

Diet					
(g kg^{-1} ds)	Ref	DG	DR	DGR	Vis t(0)
N	5.46	5.27	5.00	5.25	102.7
P	10.62	9.03	9.3	9.15	29.8
Ca	15.68	14.87	14.54	14.77	51.6
Cu	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01
Fe	0.43	0.71	1.04	0.87	0.11
Mn	0.04	0.04	0.06	0.06	0.01
Zn	0.15	0.12	0.12	0.12	0.09
(mg kg^{-1} ds)					
As	0.34	1.92	2.12	2.20	0.10
Cd	0.27	0.28	0.25	0.29	0.09
Co	0.21	0.33	0.59	0.49	0.17
Cr	6.56	7.13	7.84	7.53	1.47
Ni	2.51	4.56	5.76	5.02	1.69
Pb	0.41	1.39	2.07	1.90	1.36
Sb	0.06	0.10	0.10	0.10	0.02
Sn	0.06	0.10	0.10	0.10	0.99
V	4.44	8.24	6.27	7.35	0.12

* REF = referentiedieet en de diëten, DG, DR en DGR waarbij 20% van het referentiedieet werd vervangen door het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van groen zeewier (DG), rood zeewier (DR) of een combinatie van beide (1: 1) (DGR), respectievelijk.

6.3.5.2 De schijnbare absorptie coëfficiënten en retentie

De schijnbare absorptie coëfficiënt van ijzer (Fe) ligt het laagst in de vissen gevoerd met het referentie dieet en het hoogst in de vissen gevoerd met het dieet met daarin het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het rode zeewier en het gemengde product (groen en rood zeewier). Het positieve effect op de absorptie van ijzer wordt veroorzaakt door het zeewiereiwitconcentraat geproduceerd van het

rode zeewier ($p < 0.05$; tabel 15). Het patroon voor de retentie van ijzer is het spiegelbeeld van dit patroon ($p < 0.05$; tabel 16). Het gehalte van ijzer in de vis is vergelijkbaar tussen de vis gevoerd met de verschillende diëten ($p > 0.05$; tabel 16). De schijnbare absorptie coëfficiënt van zink ligt lager en is zelfs negatief in de vis gevoerd met de diëten met de zeewiereiwitconcentraten ($p < 0.05$; tabel 15). De absorptie van zink is onafhankelijk van het type zeewiereiwitconcentraat (groen vs. rood of mengsel daarvan). Wellicht dat zink makkelijk adsorbeert aan de polysachariden afkomstig van het zeewier. De retentie van zink verschilt tussen diëten en wordt positief beïnvloed door het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van groen zeewier ($p < 0.05$; tabel 16). Het gehalte van zink in de vis is vergelijkbaar tussen de vis gevoerd met de verschillende diëten ($p > 0.05$; tabel 16). De schijnbare absorptie coëfficiënt van arseen ligt gemiddeld acht maal hoger in de vis gevoerd met de diëten met de zeewiereiwitconcentraten ($p < 0.05$; tabel 15). De absorptie van arseen is het hoogst in de diëten met het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van rood zeewier. De retentie laat het tegenovergestelde patroon zien en is gemiddeld zestien maal lager in de vis gevoerd met de diëten met de zeewiereiwitconcentraten ($p < 0.05$; tabel 16). Het gehalte van arseen in vis is vergelijkbaar tussen de vis gevoerd met de verschillende diëten ($p > 0.05$; tabel 16). Kobalt en antimoon vertonen nagenoeg hetzelfde patroon als arseen. De schijnbare absorptie coëfficiënt van cadmium (Cd) is het hoogst in de vis gevoerd met het dieet met het gemengde product (rood + groen) ($p < 0.05$; tabel 15). De retentie en ook het gehalte van cadmium (Cd) in de vis verschilt niet tussen diëten ($p > 0.05$; tabel 16). De absorptie en retentie waarden van tin zijn voor alle diëten negatief. De schijnbare absorptie coëfficiënten en de retentie van calcium (Ca), koper (Cu) en lood (Pb) zijn vergelijkbaar tussen de verschillende diëten ($p > 0.05$; tabel 15 en 16).

De absorptie van mineralen kan sterk beïnvloed worden door de interactie met de in de voeders aanwezig vezels en of niet zetmeel polysachariden (NSP's), zoals de polysachariden uit zeewier. Net zoals de reden dat mineralen zich gemakkelijk kunnen ophopen in zeewieren, zouden de negatief geladen groepen in de polysachariden ook kunnen voorkomen dat de positieve geladen spoorelementen en zware metalen in het maagdarm kanaal worden opgenomen. Ze blijven als het ware aan de polysachariden hangen, waardoor de biologische beschikbaarheid en daarmee de absorptie afneemt. Voor chroom en zink zien we dit patroon. Voor arseen, kobalt, ijzer, mangaan en tin zien lijkt deze redenatie niet op te gaan. Dit kan worden verklaard door de gedeeltelijke vertering en of fermentatie door bacteriën in de darm, die de absorptie en dus de biologische beschikbaarheid van de spoorelementen en zware metalen kunnen vergroten (Circuncisão et al. 2018). Volgens Haidar et al. (2016) ligt de NSP verteerbaarheid in tilapia rond de 56%. Het verschil tussen chroom en zink en de andere mineralen zou kunnen worden verklaard doordat chroom en zink wellicht in het voorste en of middelste deel van de darm worden opgenomen en de andere mineralen in het achterste deel van de darm.

De concentratie van de geanalyseerde spoorelementen en zware metalen in de vis gevoerd met de diëten met de zeewiereiwitconcentraten is nagenoeg gelijk aan die in de vis gevoerd met het referentie dieet. Dit komt niet overeen met de stelling dat de mineraal gehalten in vis verhoogd kunnen worden met het voeren van zeewier (Circuncisão et al. 2018), die wel is aangetoond voor jodium in forel (Valente et al; Schmid et al. 2003). In dit onderzoek is jodium niet meegenomen, maar de stelling is wel van belang voor gehalten van spoorelementen in vis, gezien het feit dat de marine ingrediënten tegenwoordig veelal vervangen zijn door ingrediënten afkomstig van landplanten, waardoor de vis in relatie tot de spoorelementen afkomstig van het marine milieu minder voedzaam zou zijn. Echter in een ander onderzoek gericht op arseen kwam naar voren dat het eten van dierlijke producten geproduceerd met zeewier verrijkte diervoeders beperkt bijdrage aan de inname van arseen bij mensen. Dit komt waarschijnlijk doordat, net zoals de resultaten van deze studie aangeven, het door de dieren opgenomen arseen door metabolisatie en de daaropvolgende uitscheiding voorkomt dat arseen wordt opgeslagen in het dier (Circuncisão et al. 2018). Het is aannemelijk dat deze processen sterk afhankelijk zijn van het type mineraal, spoorelement en of zwaar metaal, de diersoort, de achtergrondconcentraties en de wijze waarop de mineralen worden aangeboden. In normale situaties zal over het algemeen gelden dat spoorelementen en zware metalen die door het dier worden opgenomen en niet nodig zijn voor weefselopbouw (hoeveelheden boven de behoefte van het dier) via de urine worden uitgescheiden. Hoe het ook zij, meer onderzoek naar het effect van het voeren van met zeewier verrijkte diervoeders op de opname en de gehalten van arseen en de andere zware metalen afkomstig uit zeewier in dierlijke producten is noodzakelijk om meer inzicht te krijgen in de

risico's voor zowel het dier als de mens die deze producten consumeert.

Samenvattend kan men stellen dat het gehalte van spoorelementen en zware metalen verschilt tussen diëten en dat er ook verschillen zijn in de absorptie en retentie van spoorelementen en zware metalen in vis gevoerd met de verschillende diëten. Dit leidt echter niet tot verschillen in de gehalten van alle geanalyseerde spoorelementen en zware metalen in de vis gevoerd met het referentie dieet en de vissen gevoerd met de diëten met daarin de zeewier eiwit concentraten.

Tabel 15 De schijnbare absorptie coëfficiënten (AAC's) in procenten van de mineralen in de vis gevoerd met experimentele diëten.

AAC (%)	Ref	DG	DR	DGR	p waarde
Ca	24.4±18.2	38.7±3.4	20.0±13.6	30.9±3.9	0.30
Cu	-0.4±8.4	2.7±3.3	-12.8±6.8	-1.0±8.6	0.11
Fe	-20.3±6.1 ^a	-1.9±0.7 ^b	5.2±1.9 ^c	6.9±2.2 ^c	0.03
Mn	-11.3±1.2 ^b	-20.5±0.7 ^a	-6.2±6.2 ^b	5.8±2.8 ^c	0.01
Zn	-4.8±3.0 ^b	-33.4±2.7 ^a	-32.8±7.4 ^a	-25.2±9.9 ^a	0.03
As	7.2±2.3 ^a	50.3±1.1 ^b	64.4±1.6 ^c	61.2±1.1 ^c	0.00
Cd	21.1±1.3 ^a	17.2±1.3 ^a	20.9±1.8 ^a	27.8±3.9 ^b	0.01
Co	-8.7±-3.6 ^a	7.3±8.6 ^b	34.0±30.7 ^c	32.3±29.9 ^c	0.00
Cr	-0.7±4.0 ^a	-12.7±0.5 ^c	-19.6±1.8 ^b	-8.0±3.9 ^c	0.00
Ni	29.3±27.2	31.2±29.1	35.9±34.1	35.9±35.8	0.16
Pb	13.6±13.1	32.8±13.0	35.5±8.1	39.8±14.7	0.12
Sb	14.1±6.9 ^a	41.8±3.0 ^b	16.4±9.6 ^a	42.5±0.5 ^b	0.00
Sn	-46.2±12.5 ^a	-10.4±1.4 ^b	-13.8±9.2 ^b	-5.2±4.1 ^b	0.00
V	37.0±0.9 ^b	45.0±1.6 ^c	28.3±0.1 ^a	3.3±3.3 ^b	0.00

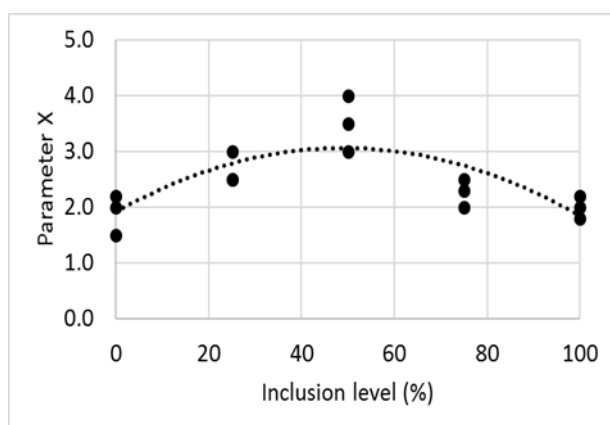
* REF = referentiedieet en de diëten, DG, DR en DGR waarbij 20% van het referentiedieet werd vervangen door het zeewiereiwitconcentraat van gemaakt van groen zeewier (DG), rood zeewier (DR) of een combinatie van beide (1: 1) (DGR), respectievelijk

Tabel 16 De mineraal gehalten geanalyseerd in vis en de retentie in procenten van de mineralen in de vis gevoerd met de verschillende diëten.

Fisheind (g kg ⁻¹ ds)	Ref	DG	DR	DGR	p waarde
N	93.2±2.3	97.0±4.1	119.5±40.9	97.9±3.0	0.45
P	24.3±1.6	24.1±1.1	25.6±0.5	24.3±0.9	0.31
Ca	39.57±3.48	39.54±0.27	41.36±2.78	40.13±0.40	0.74
Fisheind (mg kg⁻¹ ds)					
Cu	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00	0.22
Fe	0.09±0.01	0.09±0.01	0.09±0.02	0.08±0.01	0.51
Zn	0.07±0.00	0.06±0.00	0.07±0.00	0.06±0.00	0.85
As	0.67±0.28	0.19±0.04	0.42±0.41	0.22±0.13	0.16
Cd	0.09±0.02	0.11±0.00	0.11±0.02	0.08±0.01	0.12
Co	0.07±0.01	0.08±0.01	0.09±0.02	0.06±0.01	0.09
Cr	3.23±1.88	1.14±1.88	2.26±2.42	1.03±0.16	0.32
Ni	1.48±0.13	1.51±0.27	1.36±0.29	1.31±0.09	0.63
Pb	1.05±0.40	1.97±0.62	1.44±0.65	1.01±0.58	0.22
Sb	0.05±0.03	0.10±0.08	0.01±0.01	0.04±0.04	0.31
Sn	0.20±0.05	0.19±0.03	0.17±0.07	0.13±0.01	0.28
V	0.32±0.05	0.42±0.09	0.26±0.07	0.26±0.07	0.08
RE(%)					
N	39.7±0.7	45.3±2.5	55.8±29.6	41.7±1.4	0.58
P	51.4±7.5 ^a	66.6±4.2 ^b	56.0±0.7 ^a	56.5±2.6 ^a	0.02
Ca	54.3±10.0	63.3±3.8	56.7±2.3	53.6±1.6	0.20
Cu	7.4±0.9	8.9±2.1	6.8±1.0	7.4±3.6	0.64
Fe	5.0±0.5 ^c	3.1±0.5 ^b	1.7±0.7 ^a	1.8±0.5 ^a	0.01
Zn	8.8±0.1 ^a	11.7±0.3 ^c	8.7±0.4 ^a	9.5±0.2 ^b	0.00
As	73.6±32.0 ^b	3.7±1.0 ^a	6.0±7.2 ^a	3.8±2.4 ^a	0.00
Cd	8.6±2.1	12.4±0.7	11.1±3.8	6.8±2.5	0.09
Co	2.6±0.8 ^a	1.7±0.9 ^{ab}	1.2±1.0 ^{ab}	-0.1±0.9 ^b	0.04
Cr	16.0±11.1	3.8±0.7	7.7±11.2	2.7±0.5	0.23
Pb	55.8±37.6	47.6±19.9	16.1±11.8	11.1±13.0	0.10
Sb	27.9±18.7	41.9±40.4	5.1±4.2	11.4±16.6	0.30
Sn	-49.0±20.4	-32.1±6.9	-36.0±9.3	-41.2±2.0	0.39
V	2.4±0.4	2.1±0.5	1.1±0.5	1.3±0.1	0.01

7 Vaststellen maximale inclusie niveau van zeewiereiwitconcentraat

Het doel van dit deel van het project was het vaststellen van de optimale inclusie van het beste zeewiereiwitconcentraat in visvoer door middel van de uitvoering van een dosis response proef met een dieet dat 35% soja bevat, waarbij resp. 25%, 50%, 75% en 100% van het soja-eiwit wordt vervangen door het zeewier-eiwit van het beste zeewiereiwitconcentraat. Naast deze vijf experimentele diëten zou nog een commercieel standaard voer als referentie meegenomen worden. De zes voeders zouden gedurende zes weken in drievoud worden getest met gebruik van een ad lib. voerniveau voor het bepalen van o.a. de groei, voeropname en voederconversie. Het optimale inclusieniveau was gedefinieerd als het maximale inclusie niveau van het zeewiereiwitconcentraat zonder verlies van productieprestaties of mogelijk zelfs betere productieprestaties ten opzichte van het referentievoer. Een voorbeeld van een mogelijk uitkomst is weergegeven in figuur 4. Helaas kon dit deel van het onderzoek niet worden uitgevoerd. Het bleek na meerdere pogingen niet mogelijk om de benodigde hoeveelheid van het zeewiereiwitconcentraat geproduceerd van het groene zeewier met een eiwitpercentage van $\pm 40\%$ te produceren zoals getest in de biologische screening en gebruikt bij het vaststellen van de verteerbaarheden.



Figuur 4 Een voorbeeld van een mogelijke uitkomst van de geplande dose response proef.

8 Conclusies

De conclusies van het werk uitgevoerd in werkpakket C: Selectie en karakterisatie van op zeewier gebaseerde eiwitconcentraten voor visvoerders als onderdeel van het project Zeevivo kunnen als volgt worden samengevat:

- Het gebruik van zeewier in visvoer of als grondstof voor visvoer ingrediënten past in de huidige sociaal-maatschappelijke kaders.
- Tilapia presteert vergelijkbaar op een dieet waarbij 20% van het soja-eiwit vervangen is door een zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier (*Ulva spp.*) en een referentie dieet waarin geen soja is vervangen.
- De schijnbare verteerbaarheid van het eiwit in het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier (*Ulva spp.*) is $\pm 81\%$. Dit is lager dan dat van sojaeiwit maar relatief hoog in vergelijking tot andere alternatieve ingrediënten getest in tilapia
- De schijnbare verteerbaarheid van de energie in het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het groene zeewier (*Ulva spp.*) is $\pm 70\%$ en in het algemeen lager in vergelijking tot andere alternatieve ingrediënten getest in tilapia
- Het gehalte aan arseen in de diëten met daarin zeewiereiwitconcentraat ligt hoger dan in het referentie dieet, maar dit heeft geen effect op het gehalte arseen in de tilapia die deze voeding kregen.
- De gehalten van alle geanalyseerde mineralen in de vis verschillen niet tussen de tilapia gevoerd met het referentie dieet en de tilapia gevoerd met de diëten met daarin de zeewier eiwit concentraten.
- Het voeren van het dieet met daarin het zeewiereiwitconcentraat gemaakt van het rode zeewier *Solaria chordalis* zorgt voor een hoger cholesterol in bloed van tilapia.
- Het zeewiereiwitconcentraat geproduceerd van het groene zeewier (*Ulva spp.*) lijkt een veelbelovend product om sojaeiwit te vervangen onder de voorwaarde dat de beschikbaarheid en prijs acceptabel zijn voor de visvoer producenten.
- Het testen van het maximale en of optimale inclusieniveau van het zeewiereiwitconcentraat geproduceerd uit *Ulva spp.* om de mogelijkheden voor het vervangen van sojaeiwit door zeewiereiwit in diëten voor tilapia verder te onderzoeken is gewenst.

9 Dankwoord

De auteurs willen Olmix bedanken voor het beschikbaar stellen van de zeewiereiwitconcentraten en de mensen van Carus-ARF bedanken voor hun hulp en zorg voor de proefdieren en de praktische begeleiding van de studenten tijdens de uitvoering van de experimenten. Daarnaast willen wij Ronald Booms en Tino Leffering bedanken voor het begeleiden van de studenten tijdens de uitvoering van de benodigde lab analyses. Ook willen wij Arjen Roem bedanken voor zijn adviezen gedurende de uitvoering van dit werkpakket binnen Zeevivo.

Dit onderzoek is medegefinancierd door Regieorgaan SIA onderdeel van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO).

Literatuur

- Berntssen, M.H.G., Maage, A. and Lundebye, A.K., 2012. Contamination of finfish with persistent organic pollutants and metals in Chemical Contaminants and Residues in Food Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition 2012, Pages 498-534 <https://doi.org/10.1533/9780857095794.3.498>
- Circuncisão, A.R., Catarino, M.D., Cardoso, S.M. en Silva, A.M.S. Minerals from Macro algae Origin: Health Benefits and Risks for Consumers. *Marine. Drugs* 2018, 16, 400; doi:10.3390/md16110400
- Cheng, Z.J. and Hardy R.W. Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture Nutrition* 9 (2003) 77-83
- Davies, S.J. & Serwata, R.D. (2005) Meeting the phosphorus requirement in salmonids a question of bioavailability? *International Aquafeed* 8(2): 8-11
- Devang, K.K. en Khambholja B. Arsenic Contents and Its Biotransformation in the Marine Environment in *Handbook of Arsenic Toxicology* 2015, Pages 675-700 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418688-0.00028-9>
- EFSA, 2009. Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal* 2009; 7(10):1351
- EU, Richtlijn 2002/32/EG van het Europees Parlement en de Raad van 7 mei 2002 inzake ongewenste stoffen in diervoeding - Verklaring van de Raad <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32002L0032&from=EN>
- EU, Verordening (EG) nr. 178/2002 van het Europees Parlement en de Raad van 28 januari 2002 tot vaststelling van de algemene beginselen en voorschriften van de levensmiddelen wetgeving, tot oprichting van een Europese Autoriteit voor voedselveiligheid en tot vaststelling van procedures voor voedselveiligheidsaangelegenheden <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32002R0178&from=en>
- EU, Verordening (EG) Nr. 1831/2003 van het Europees parlement en de raad van 22 september 2003 betreffende toevoegingsmiddelen voor Diervoeding <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN>
- EU, Verordening (EG) Nr. 183/2005 van het Europees parlement en de raad tot vaststelling van voorschriften voor diervoederhygiëne. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R0183-20151112>
- Lists of establishments, plants or operators approved or registered in accordance with Regulation (EC) No 183/2005 (Feed hygiene) <https://english.nvwa.nl/topics/approved-establishments/animal-feed-sector>
- EU, Verordening (EG) Nr. 767/2009 van het Europees parlement en de raad betreffende het in de handel brengen en het gebruik van diervoeders. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:02009R0767-20180101&from=EN>
- EU, Aanbeveling van de commissie van 14 januari 2011 tot vaststelling van richtsnoeren voor het onderscheid tussen voedermiddelen, toevoegingsmiddelen, biociden en geneesmiddelen voor diergeneeskundig gebruik <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011H0025&from=EN>
- EU, Verordening (EU) 2017/2279 van de commissie van 11 december 2017 tot wijziging van de bijlagen II, IV, VI, VII en VIII bij Verordening (EG) nr. 767/2009 van het Europees Parlement en de Raad betreffende het in de handel brengen en het gebruik van diervoeders. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:32017R2279&from=EN>
- EU, Verordening (EU) 2017/2279 van de commissie betreffende de catalogus van voedermiddelen <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/HTML/?uri=CELEX:02009R0767-20180101&from=EN>
- Eya, J.C. & Lovell, R.T. (1997). Net absorption of dietary phosphorus from various inorganic sources and effect of fungal phytase on net absorption of plant phosphorus by channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. World Aquacult. Soc.*, 28:386-391

- Guimarães, I.G. Pezzato, L.E. Barros, M.M and Tachibana, L. Nutrient digestibility of cereal grain products and by-products in extruded diets for Nile tilapia, *Journal of the World Aquaculture Society* 39 (6) (2008) 781–789
- Hanley, F. 1987. The digestibility of foodstuffs and the effects of feeding selectivity on digestibility determinations in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 66:163–179
- Haidar, H.N., Petie, M., Heinsbroek, L.T.N, Verreth, J.A.J en Schrama, J.W. The effect of type of carbohydrate (starch vs. nonstarch polysaccharides) on nutrients digestibility, energy retention and maintenance requirements in Nile tilapia <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.036>
- Köprücü, K. and Özdemir, Y. Apparent digestibility of selected feed ingredients for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture* 25 (2005) 308–316. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00214.x>
- Patterson, G.W. The distribution of sterols in algae. *Lipids* (1971) 6: 120. <https://doi.org/10.1007/BF02531327>
- Patterson, G.W. Sterols of some green algae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* (1973) 47: 453. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(74\)90075-3](https://doi.org/10.1016/0305-0491(74)90075-3) Volume 47, Issue 2, 15 February 1974, Pages 453-457
- Patterson, G.W. (1991). Sterols of algae. In: Pattersen, G.W., Nes, W.D. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Sterols*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, pp. 118–157
- Pereira, R., Valente, L.M.P., Sousa-Pinto, I and Rema, P. Apparent nutrient digestibility of seaweeds by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *Algal Research* 1 (2012) 77–82
- Pezzato, L.E., Miranda, E.C., Barros, M.M., Pinto, L.G.Q., Furuya, W.M. and Pezzato, A.C. Apparent digestibility of feedstuffs by nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Revista Brasileira De Zootecnia* 31 (4) (2002) 1595–1604
- Schmid, S.; Ranz, D.; He, M.L.; Lukowicz, M.V.; Reiter, R.; Arnold, R.; Le Deit, H.; David, M.; Rambeck, W.A. Marine algae as natural source of iodine in the feeding of freshwater fish: A new possibility to improve iodine supply of man. *Revue de Médecine Vétérinaire (France)* 2003, 154, 645–648
- Valente, L.M.P.; Rema, P.; Ferraro, V.; Pintado, M.; Sousa-Pinto, I.; Cunha, L.M.; Oliveira, M.B.; Araújo, M. Iodine enrichment of rainbow trout flesh by dietary supplementation with the red seaweed *Gracilaria vermiculophylla*. *Aquaculture* 2015, 446, 132–139
- Ventura-Lima, J. Reis, M. and Monserrat, J.M. Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach / *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (2011) 211–218 [doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.11.002)
- Vielma, J. & Lall, S.P. (1997). Dietary formic acid enhances apparent digestibility of minerals in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*. 3:265-268.
- World Health Organisation WHO | Arsenic. Available online: [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/#.WV5hIWgAVaM.mendeley.-Yamauchi, H. and Sun G., \(2019\) Arsenic Contamination in Asia Biological Effects and Preventive Measures. Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2565-6>](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/#.WV5hIWgAVaM.mendeley.-Yamauchi, H. and Sun G., (2019) Arsenic Contamination in Asia Biological Effects and Preventive Measures. Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2565-6)

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life



Wageningen Livestock Research Postbus 338
6700 AH Wageningen
T 0317 48 39 53
E info.livestockresearch@wur.nl [www.wur.nl/
livestock-research](http://www.wur.nl/livestock-research)

Wageningen Livestock Research ontwikkelt kennis voor een zorgvuldige en renderende veehouderij, vertaalt deze naar praktijkgerichte oplossingen en innovaties, en zorgt voor doorstroming van deze kennis. Onze wetenschappelijke kennis op het gebied van veehouderijsystemen en van voeding, genetica, welzijn en milieu-impact van landbouwhuisdieren integreren we, samen met onze klanten, tot veehouderijconcepten voor de 21e eeuw.

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.500 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

