

Schlussbericht

Optimierung von Lupinenmehl für die Aquakultur (OLA)

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2015 bis 31.03.2018

Berichtszeitraum: 01.04.2015 bis 31.03.2018

Projekträger: Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung, BLE
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, BMEL

Zuwendungsempfänger: Alfred-Wegener-Institut (AWI)
Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung
Am Handelshafen 12
27570 Bremerhaven
Förderkennzeichen: 2814EPS023

Projektkoordinator: Dr. Matthew James Slater

Projektpartner: Verein zur Förderung des Technologietransfers an der
Hochschule Bremerhaven e. V.
ttz Bremerhaven
Am Lunedeich 12
27572 Bremerhaven
Förderkennzeichen: 2814EPS024

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft und Forschung unter dem Förderkennzeichen 2814EPS023 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Kurzfassung

Optimierung von Lupinenmehl für die Aquakultur (OLA - FKZ 2814EPS023)

Autoren: Monika Weiss, Christina Hörterer, Sinem Zeytin, Matt Slater.

Alfred-Wegener-Institut (AWI), Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung

Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven – mslater@awi.de

Lupine aus ökologischen Anbau stellt eine nachhaltige und kostengünstige Alternative zu Fisch- und Sojamehl in Futtermitteln für die Aquakultur dar. Das Projekt "Optimierung von Lupinenmehl für die Aquakultur" (OLA) entwickelte Verfahren zur Steigerung der Verdaulichkeit von Lupinenmehl in Futtermitteln für karnivoren Wolfsbarsch, und analysierte die Vermarktungschancen von Lupine in der Fischfutterindustrie.

Ein Hindernis in der Nutzung pflanzlicher Proteinquellen stellen Substanzen dar, sogenannte antinutritive Substanzen, die die Futterraufnahme und Verdauung von Fischen negativ beeinflussen können. Der Projektpartner, das ttz Bremerhaven, entwickelte in diesem Projekt ein enzymatisches Fermentationsverfahren um diese Substanzen im Lupinenmehl zu reduzieren und Verdaulichkeit und Akzeptanz zu fördern.

Die Aquakulturforschung am AWI testete das fermentierte Lupinenmehl gegen herkömmliches Lupinenmehl in steigenden Mengen als Ersatz für Fischmehl in Akzeptanz- und Wachstumsversuchen. Diese zeigten das ein Futter mit 50% Lupine vergleichbare Wachstumsraten wie Futter aus 65% Fischmehl hervorbringt. Obwohl die Fermentation eine starke Reduktion der Phytinsäure im Lupinenmehl herbeiführte, hatte dies keine Wirkung auf die Wachstumsperformance bei Tieren über 15 g. Bei kleineren Tieren hatte die Fermentation jedoch eine positive Wirkung auf Wachstum. Enzymatische Analysen zeigten eine signifikante Beeinträchtigung der Verdauungsenzyme durch Lupine. In-vitro Analysen mit der pH-Stat Methode zeigten, dass diese durch Fermentation sowie Toasting reduziert wird. Stakeholderanalysen zeigten eine grundsätzliche positive Bewertung von Lupinen aus ökologischen Landbau als sinnvollen Futtermittelinhaltsstoff. Jedoch wurden Schwankungen beim Angebot, Qualität und Zusammensetzung sehr häufig bei größeren Abnehmern als Ausschluss Kriterium wahrgenommen. Insgesamt zeigte das Projekt, dass Lupinenbasierte Futtermittel (mit oder ohne thermische/ enzymatische Behandlung) sehr gut geeignet sind um sämtliche nutritiven Bedürfnisse der karnivorer Wolfsbarsche zu decken. Lupine wird aber sein Potential als Futtermittelinhaltsstoff nur erfüllen, wenn Engpässe in der Wertschöpfungskette durch Sicherung der Produkt-Qualität und Supply-Chain überwunden werden.

English version:

Organically farmed lupins offer a sustainable and low-cost alternative to fishmeal and soya meal in aquaculture diets. The OLA Project “Optimisation of Lupins for Aquaculture” developed methods to improve the digestibility of lupin flour in diets for carnivorous European Seabass, and analysed market opportunities for lupin in the fodder industry.

One main hindrance to the use of plant proteins in animal feeds is the presence of so-called anti-nutritive substances that negatively influence consumption and digestion of lupins by aquacultured species. The project partner ttz Bremerhaven developed an enzymatic fermentation process to reduce the presence of anti-nutritive substances in the lupin flour, and to improve digestion and acceptance.

The aquaculture research group at AWI tested the fermented lupin flour against ‘raw’ lupin flour in acceptance and growth experiments, adding increasing amounts of both as a replacement for fishmeal.

The diet tests showed that a feed with 50% lupin resulted in similar growth rates to feeds containing 65% fishmeal. Although fermentation did reduce the amount of phytic acid significantly in lupin flour, fermentation had no influence on the growth performance of fish over 15 g. Smaller animals did however exhibit a positive increase in growth when feed fermented diets. Enzymatic analyses showed a significant reduction in digestive enzyme activity as a result of lupin inclusion in diets. In vitro analysis using the pH-stat method showed that negative effects could be reduced by fermentation and toasting of lupins.

Stakeholder analyses revealed a general positive perception of lupin from organic farms as a diet ingredient. Nonetheless, fluctuations in availability, quality and proximate composition (especially protein content) were frequently considered reason enough to exclude lupins from the purchasing activities of large potential customers.

Overall the OLA project was able to show that lupin-based diet's (with or without thermic / enzymatic treatment) were very well suited to cover all nutritional requirements of carnivorous European sea bass. Lupin will however only fulfil its potential as a diet ingredient if bottlenecks in the value chain are overcome through assurance of product quality and supply.

Inhalt

1. Einführung.....	5
1.1 Gegenstand des Vorhabens.....	5
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes.....	6
1.3 Planung und Ablauf des Projektes	6
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand.....	8
3. Material und Methoden	9
3a. Methodische Zusammenarbeit mit anderen Stellen	36
4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	36
5. Diskussion der Ergebnisse.....	46
6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	47
7. Gegenüberstellung ursprünglich geplanten zu tatsächlich erreichten Zielen	48
8. Zusammenfassung.....	51
9. Literaturverzeichnis	52
10. Übersicht erfolgte und geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses	55

1. Einführung

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Die Aquakultur steigert derzeit ihre Produktion jährlich um mehr als 6 % und ist damit der am schnellsten wachsende Sektor innerhalb der Produzenten von tierischen Nahrungsmitteln (FAO 2010). Fast die Hälfte der Speisefische wird bereits heute in Fischfarmen produziert. Insbesondere die Produktion der in Europa so begehrten Lachse, Forellen, Wolfsbarsche und Doraden erfordert Futtermittel mit einem hohen Anteil an Eiweiß. Zum Beginn der sog. „Blauen Revolution“ wurde als Eiweißquelle vor allem Fischmehl eingesetzt, weil dieses günstig war und von seiner Aminosäuren-Zusammensetzung und Verdaubarkeit optimal für die Fischernährung geeignet ist. Fischmehl ist jedoch zu einer knappen Ressource geworden. Die weltweite Produktion von Fischmehl, vor allem aus Sardellen und andere kleinen pelagischen Fischen, liegt seit Jahrzehnten im Bereich von 4 bis 7 Millionen Tonnen (Jackson 2012). Eine Steigerung ist nicht in Aussicht, vielmehr werden kleine pelagische Fische zunehmend direkt für die menschliche Ernährung genutzt. Nachdem Peru im Herbst 2012 die Fangquote für Sardellen überraschend um 68 % reduzierte, stieg im Dezember 2012 der Preis für eine Tonne Fischmehl erstmals über 2.000 USD. Für eine Fortsetzung des Wachstums der Aquakulturindustrie muss daher der Fischmehlanteil im Fischfutter immer stärker durch alternative Proteinquellen ersetzt werden.

Leguminosen sind aufgrund ihres hohen Proteingehalts geeignet, einen Teil des Fischmehls zu ersetzen. Bisher wird vor allem Soja, vor allem als Proteinkonzentrat, erfolgreich im Fischfutter eingesetzt. Die Verwendung von Soja ist jedoch in die öffentliche Kritik geraten, da überwiegend transgenes Saatgut verwendet wird (81 % der Anbaufläche in 2012) und für den Anbau von Soja in Brasilien und Argentinien großflächig Regenwälder gerodet werden (Forum Bio- und Gentechnologie e.V. 2014). Im Gegensatz dazu sind Lupinen für den Anbau unter den klimatischen Verhältnisse in Deutschland hervorragend geeignet und haben einen ähnlich hohen Eiweißgehalt wie Soja.

Der große Erfolg von Soja als Fischmehlersatz ist nicht nur in den ernährungsphysiologischen Vorteilen begründet, sondern beruht auch auf einer ausgezeichneten Vermarktungsstrategie durch die US-amerikanische Sojabohnenindustrie, die das Potential von pflanzlichen Alternativen zu Fischmehl für die Aquakultur frühzeitig erkannt hat. Bereits 2002 hat das United Soybean Board (USB) mit der Soy-in-Aquaculture-Initiative (SIA) ein Programm initiiert, um die Vermarktung von Soja im Aquakultursektor zu fördern und nach Möglichkeiten zu forschen, die Verdaulichkeit von Soja für Lachse und Forellen zu verbessern (Gatlin III et al. 2007).

Um die Verwendung von Lupinen als Eiweißlieferant in der Fischfutterindustrie zu steigern und damit Wettbewerbsnachteile heimischer Leguminosen auszugleichen und weniger von den stark schwankenden internationalen Marktpreisen für Fischmehl und Sojabohnenmehl abhängig zu sein, muss ein koordiniertes Marketing betrieben werden, der Anbau geeigneter Lupinensorten gesteigert und die Entwicklung von Verfahren zur Verbesserung der Verdaulichkeit von Lupinenmehl gefördert werden. Die Fischfutterindustrie könnte sich künftig zu einem wichtigen Abnehmer für Lupinenmehl entwickeln und dazu beitragen, das Potential von Lupinen für die Tierernährung zu optimieren und den Anbau von Lupinen in Europa zu fördern. Eine Fischfutterindustrie mit Lupinenmehl als Eiweißbasis würde die Agro-Biodiversität auf europäischen Feldern erhöhen, die Nutzung südamerikanischer Regenwaldgebiete für den Sojaanbau unattraktiver machen, Transportwege verkürzen (dadurch die regionale Beschaffung von Rohstoffen fördern) und eine ökologisch vorteilhafte Alternative zur Verwendung von transgenem Soja und Fischmehl bieten.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

Um die Verwendung von Lupinen als Eiweißlieferant in der Fischfutterindustrie zu steigern und damit Wettbewerbsnachteile heimischer Leguminosen auszugleichen und weniger von den stark schwankenden internationalen Marktpreisen für Fischmehl und Sojabohnenmehl abhängig zu sein, muss ein koordiniertes Marketing betrieben werden, der Anbau geeigneter Lupinensorten gesteigert und die Entwicklung von Verfahren zur Verbesserung der Verdaulichkeit von Lupinenmehl gefördert werden. Die Fischfutterindustrie könnte sich künftig zu einem wichtigen Abnehmer für Lupinenmehl entwickeln und so im Sinne der **Eiweißpflanzenstrategie des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL)** dazu beitragen, das Potential von Lupinen für die Tierernährung zu optimieren und den Anbau von Lupinen in Europa zu fördern. Eine Fischfutterindustrie mit Lupinenmehl als Eiweißbasis würde die Agro-Biodiversität auf europäischen Feldern erhöhen, die Nutzung südamerikanischer Regenwaldgebiete für den Sojaanbau unattraktiver machen, Transportwege verkürzen (dadurch die regionale Beschaffung von Rohstoffen fördern) und eine ökologisch vorteilhafte Alternative zur Verwendung von transgenem Soja und Fischmehl bieten.

In dem Projekt sollen folgende Forschungsfragen zur Nutzung von Lupinen in Fischfuttermitteln untersucht werden:

Aus den ursprünglichen Antrag in Zusammenarbeit mit dem ttz Bremerhaven:

1. Welche Futtermittelzusammensetzung erfüllt den Nährstoffbedarf der Zielfischart?
2. Wie kann der Abbau der antinutritiven Substanzen in den kommerziellen Fertigungsprozess von extrudiertem Fischfutter optimal eingebunden werden?
3. Kann die Verdaulichkeit von Lupinenmehl für karnivore Fische gesteigert werden, indem man durch Enzymbehandlung die unverdaulichen Bestandteile in verdauliche überführt?
4. Besteht aus sozioökonomischer Sicht eine Akzeptanz für eine verstärkte Nutzung von Lupinenmehl in Fischfutter bei den relevanten Stakeholdern? Welche Lösungsansätze sind denkbar, um diesen vorteilhaften Rohstoff weiter zu fördern?

Aus der Erweiterung und dem Verlängerungsantrag:

5. Führt die Fütterung von pflanzlichen Proteinquellen zu chronischem Stress bei juvenilen Wolfsbarschen?
6. Kann Lupine den Bedarf an essentiellen Fettsäuren (Linolsäuren) für den Wolfsbarsch decken?
7. Wie können thermische Behandlung und Fermentation von Lupinenmehl anti-nutritive Substanzen abbauen und Nährstoffe für Fische verfügbar machen?
8. Kann die in-vitro Verdaulichkeit Aufschluss über die Eignung von Lupinen und Futtermittelrezepturen geben?

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Das hier vorliegende Projekt „Optimierung von Lupinenmehl in der Aquakultur“ (**OLA**) war ursprünglich in vier Arbeitspakete (AP) untergliedert und wurde im Zuge von einer Erweiterung und einer Verlängerung der ursprünglichen Projektlaufzeit um neun Monate bis zum 31.12.2017 um weitere 4 AP erweitert. Die Übersicht des ursprünglich geplanten Arbeits- und Zeitplans befindet sich im Anhang.

Zu Beginn wurde anhand aktueller Literatur, durch Austausch mit dem Kompetenznetzwerk des „**Modellhaften Demonstrationsnetzwerk zur Ausweitung und Verbesserung des Anbaus und der Verwertung von Lupinen**“ (**Lupinen-Netzwerk**) und den Erfahrungen aus vergangenen Fütterungsversuchen eine dem Nährstoffbedarf der Zielart Wolfsbarsch

(*Dicentrarchus labrax*) angepasste Futterrezeptur mit Lupinenmehl als Haupteiweißquelle entwickelt (**AP 1**). Folgend wurde am ttz Bremerhaven ein geeignetes Verfahren zur Futtermittelherstellung mit Rohstoffaufbereitung durch Fermentation, Extrusion und Coating entwickelt und optimiert (**AP 2**). Unverdauliche und antinutritive Substanzen (Phytinsäure und Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP)) im Lupinenmehl wurden vom Partner ttz Bremerhaven in einem Fermentationsverfahren enzymatisch aufgeschlossen, um die Verfügbarkeit von Phosphat und bivalenten Mineralien, sowie von verdaulichen Kohlenhydraten zu steigern. Zudem wurde der Extrusionsprozess den Eigenschaften der Futterrohstoffe angepasst, verschiedene Coatings (Tintenfisch-Hydrolysat, Fischmehl-Hydrolysat, Krill-Hydrolysat, Fischöl) hergestellt und auf Versuchsfuttermittel aufgebracht. In drei verschiedenen Fütterungsversuchen mit juvenilen Wolfsbarschen wurde die Akzeptanz (a) sowie die Verdaulichkeit von unbehandeltem und fermentiertem Lupinenmehls bei steigenden Gehalten im Futter (b), sowie von Lupinen-Proteinkonzentrat (c) getestet (**AP 3**). Die Wirkung des Coatings wurde noch während der zweiten Phase durch kurze Akzeptanzversuche überprüft. Da Fischöl als Coating eine gute Akzeptanz des Futters bewirkte, wurde es für die Futtermittel des zweiten Fütterungsversuchs verwendet, in welchem über einen längeren Zeitraum die Effekte von Lupinenmehlgehalt und Vorbehandlung auf das Wachstum, die Futtermittelverwertung und die Verdauungsphysiologie getestet wurden. Aufgrund der Ergebnisse des zweiten Fütterungsversuchs wurden anstelle von individuell vorbehandeltem Lupinenmehl, unbehandeltes Lupinenmehl und ein Lupinen-Proteinkonzentrat gegen die Alternativen aus Soja getestet. In dem zweiten und dritten Futtermittelversuch wurden das Wachstum, die Futtermittelverwertung, die verdauungs-physiologischen Parameter sowie die Gesundheit der Fische aufgenommen und analysiert, um einen Aufschluss über positive und negative Auswirkungen des Lupinenmehls im Futter zu erhalten.

In der sozioökonomischen Analyse wurde mittels semi-strukturierter Interviews Schlüsselakteure (Stakeholder) identifiziert und eine Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats (SWOT)-Analyse zur Nutzung von Lupinenmehl durchgeführt (**AP 4**). Durch die frühzeitige Einbeziehung von Schlüsselakteuren können mögliche Risiken und Potentiale der Lupinennutzung untersucht werden, die über die rein technischen und biologischen Fragestellungen hinausgehen. Insbesondere konnten die Hersteller in Bezug auf die tatsächlich mögliche Wirtschaftlichkeit dieser Futtermittelalternative eingebunden werden.

In Zusammenarbeit mit dem ILVO wurde der Kortisol-Spiegel in den Schuppen der Fische aus dem zweiten und dritten Versuch des AP 3 untersucht, um Aufschluss über den Einfluss von Lupinenmehl auf die *langfristige* Stressantwort der Fische zu bekommen (**AP 5**).

Die Fettsäure-Profile wurde in den verwendeten Versuchs-Futtermitteln wie auch den Versuchsfischen aus beiden Experimenten analysiert (**AP 6**). Dabei hat das AWI eng mit der Hochschule Bremerhaven zusammengearbeitet.

Aufgrund der Ergebnisse des zweiten Fütterungsversuchs wurde untersucht wie sich Vorbehandlung (Fermentation) und Futterherstellung (Extrusion) auf den Gehalt von Phytinsäure in den Futtermitteln verhält. Zudem wurden verschiedenen Lupinenarten auf den Gehalt von Phytinsäure untersucht, um deren Potenzial für Fischernährung abschätzen zu können (**AP 7**).

Die Analysen zur in-vitro-Verdaulichkeit mittels der pH-Stat Methode (**AP 8**) gliedert sich in drei Phasen. Zunächst wurde in Phase 1 die Aktivität der proteolytischen Enzyme im Verdauungstrakt von Wolfsbarsch und Zander bestimmt, um in darauffolgender Phase 2 der in-vitro Verdaulichkeit standardisierte Enzymextrakte zur Verfügung zu haben. In der zweiten Phase soll die in-vitro Verdaulichkeit der Futtermittel und verschiedener Lupinenarten

untersucht werden. In Phase 3 wird eine Futtermittelrezeptur mit Lupinen als Eiweißquelle für Zander formuliert.

Die praxisrelevanten Ergebnisse aller Projektphasen wurden zeitnah mit dem **Lupinen-Netzwerk** kommuniziert.

2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Lupinenmehl kann ein geeigneter Eiweißlieferant für Fischfutter sein. So fanden Glencross et al. (2011) bei einem Anteil von bis zu 40 % Lupinenmehl im Futter einen leicht positiven Effekt auf das Wachstum von Regenbogenforellen im Vergleich zu einem Kontrollfutter auf reiner Fischmehlbasis oder einem vergleichbaren Futter (gleicher Energiegehalt, gleicher Proteingehalt) mit Sojabohnenmehl. Lupinenmehl ist im Gegensatz zu Sojabohnenmehl sehr arm an darmschädigenden Saponinen und Lektinen. Während Saponine im Sojabohnenmehl bei Lachsen eine Darmentzündung (Enteritis) auslösen können, wurde dieser Effekt bei der Verfütterung von Lupinenmehl nicht beobachtet (Knudsen et al. 2008). Süßlupinen, besondere Zuchtformen der Weißen Lupine (*Lupinus albus*), der Gelben Lupine (*L. luteus*) und der Blauen Lupine (*L. angustifolius*) sind arm an den für Leguminosen typischen chinolizidinen Alkaloiden, deren bitterer Geschmack die Futteraufnahme beeinträchtigen kann (Serrano et al. 2008). Nach jüngsten Untersuchungen ist für die Ernährung von karnivoren Fischen die Weiße Lupine besonders geeignet (Tabrett et al. 2012).

Dennoch bringt die Verwendung von Lupinenmehl in Aquakulturfutter in hoher Konzentration einige Probleme mit sich, die es zu lösen gilt. So ist der Anteil essentieller Aminosäuren (insbesondere Lysin, Methionin und Threonin) im Lupinenmehl für die Ernährung von piscivoren Fischen nicht ausreichend und muss durch die Zugabe geeigneter Eiweißlieferanten kompensiert oder durch freie Aminosäuren ergänzt werden (Gatlin III et al. 2007). Lupinen haben dazu einen hohen Gehalt an für Fische unverdaulichen Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) und den ebenfalls unverdaulichen Oligosacchariden Stachyose und Raffinose. Um den Anteil der NSPs zu reduzieren, können die Lupinenkerne geschält und die verbleibenden unverdaulichen Kohlenhydratbestandteile enzymatisch gespalten werden, was bei Hühnern zu einer Verbesserung der Verdaubarkeit führt (Brenes et al. 2003). Wenn auch in geringerer Konzentration als in Sojabohnen, enthalten Lupinen Phytinsäure. Dieser Hexaphosphorsäureester des Inosits dient Pflanzen als Phosphatspeicher. Fische können die Phytinsäure nicht verdauen. Dadurch kann an Inosit kovalent gebundenes Phosphat von den Fischen nicht verwertet werden und reichert sich im Wasser an. Außerdem erschwert die Phytinsäure in den Lupinen die Aufnahme von bivalenten Mineralien und Spurenelementen sowie positiv geladenen Proteinen und Aminosäuren (Afinah et al. 2010).

In Fütterungsversuchen konnte bei *Lateolabrax japonicus*, ein barschartiger Meeresfisch aus dem Pazifik, gezeigt werden, dass die Beimengung von Phytase und NSP-spaltenden Enzymen zu einem Fischfutter (37 % Pflanzenmehle aus Soja, Raps und Erdnuss) zu einer signifikant besseren Verdauung und besserem Wachstum führt (Ai et al. 2007).

In dem hier beantragten FuE-Vorhaben sollen ähnliche Experimente am Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax*) mit Fischfutter auf Basis von Lupinenmehl (mit Aminosäuren-Supplementation) durchgeführt werden. Da hohe Anteile an Lupinenmehl den Geschmack negativ beeinflussen können, muss die Akzeptanz des Futters experimentell untersucht werden (Glencross 2007, Tabrett 2012).

3. Material und Methoden

Methodik 1 Futtermittelrezeptur und Nährstoffbedarf

Nach ausführliche Literaturrecherche sowie Besprechungen mit dem Projektpartner ttz Bremerhaven wurde folgendes Rezeptur pro Versuchsfutter errechnet. Basis der Berechnung war Nährstoffgehalt des Rohstoffes (wie verfügbar) sowie Nährstoffbedarf des Tieres (nach Literatur) sowie Trieren der Futtermittel um Isonitrogene Versuchsfütter zu erzeugen (Tab.1).

Tabelle 1: Futtermittelrezeptur Versuchsreihen 1-4

Futterrezeptur	Kontrolle	Kontrolle	Lupinmehl	Lupinmehl	Lupinmehl	Lupinmehl
	Fischmehl	Sojamehl	25% sub	50 % sub	75% sub	100% sub
	0,00	0,23	0,23	0,46	0,77	1,00
Nährstoffgehalt	%	%	%	%	%	%
Rohasche	13,9	11,6	11,3	8,7	6,1	2,7
Rohprotein	43,6	44,0	42,9	43,5	40,4	37,0
Rohfett	13,7	13,2	13,5	13,4	13,1	12,6
Rohfaser	5,1	4,9	6,5	7,9	9,3	11,2
Protein (Nx6.25)	46,8				45	
Energie (MJ/kg)	20				20,1	
Inhaltsstoffe	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg	g/kg
Fischmehl	650	500	500	350	150	0
Fischöl	77	77	77	77	77	77
Lupinenmehl	0	0	150	300	500	650
Sojamehl	0	150	0	0	0	0
Weizengluten	21	66	66	126	151	170
Weizenstärke	180	150	150	105	100	96
Zellulose 10% of FM	65	50	50	35	15	0
Vitamin/Mineral-Premix	6	6	6	6	6	6
Marker	1	1	1	1	1	1
Summe	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Die Formulierung der Diäten erfolgte anhand der Informationen für Lachs und Forelle aus der genannten Literatur da die Nährstoffbedürfnisse denen der Wolfsbarsche sehr ähnlich sind (vgl. Carter & Hauler 2000; Glencross et al. 2003, 2004a, 2004b; Salini and Adams 2014; Gatesoupe 2014).

Methodik 2 Entwicklung eines Verfahren zur Vorbehandlung von Lupinen (Schälung und Fermentation), Extrusion und Coating des Futters (vom ttz Bremerhaven konzipiert und durchgeführt).

Ein Prozess für die Herstellung von Wolfsbarschfutter aus Lupinenmehl und aus fermentiertem Lupinenmehl konnte entwickelt werden. Dabei wurde sowohl die Fermentation des Lupinenmehls entwickelt (Pre-Processing, siehe Methodik 3) als auch spezifische Extrusionsprozesse, die Trocknung der verschiedenen Wolfsbarschfutter (Main-Processing), die Herstellung verschiedener Coatings zur Maskierung des Wolfsbarschfutters und der Coatingprozess (Post-Processing).

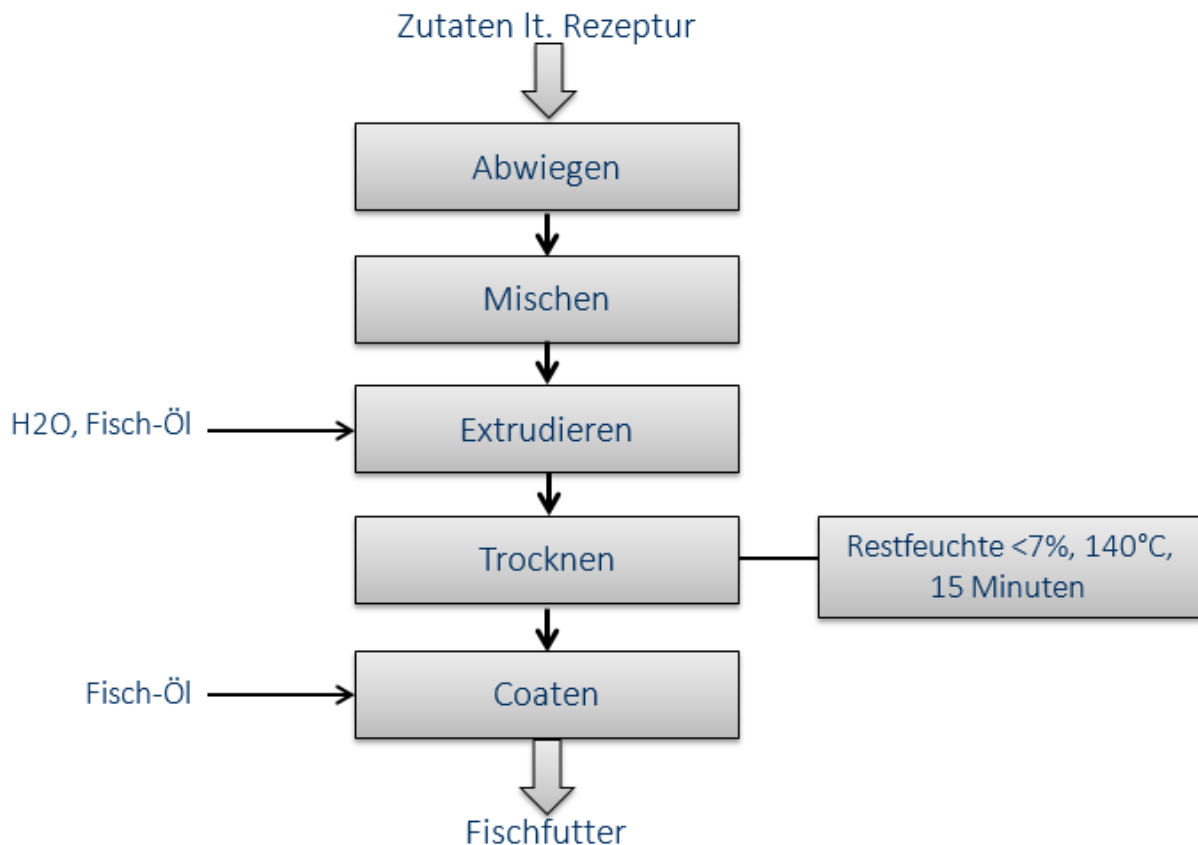


Abbildung 1: Fließschema des entwickelten Prozesses

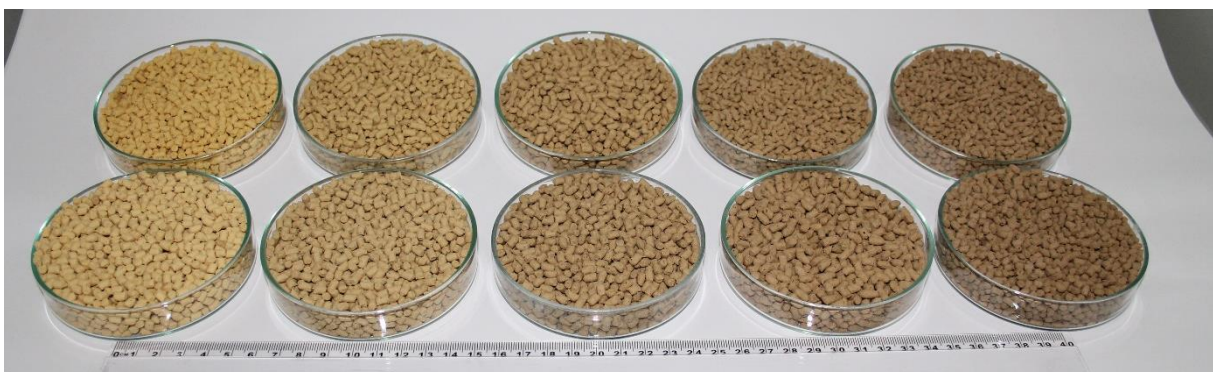


Abbildung 2: Von oben links nach rechts: 100% Lupine, 75% Lupine, 50% Lupine, 25% Lupine, Soja-Kontrollfutter Von unten links nach rechts: 100% fermentierte Lupine, 75% fermentierte Lupine, 50% fermentierte Lupine, 25% fermentierte Lupine, Standardfutter mit 100%

In Abb. 2 sind die verschiedenen Wolfsbarschfutter für die Mastversuche dargestellt. Gut zu erkennen ist der Einfluss des Lupinenmehls auf die Färbung der Pellets. Umso höher der Lupinenmehlgehalt (fermentiert und unfermentiert), desto stärker ausgeprägt ist eine Gelbfärbung.

Fermentation des Lupinen-Mehls (Pre-Processing)

Für die Fermentation des Lupinen-Mehls wurde „Natuphos 5000 Combi L“ und „Natugrain TS L“ der Firma BASF verwendet (s. Tab. 2). Für den anschließenden Extrusions- bzw. Mischungsprozess war es essentiell, dass jenes fermentierte Lupinenmehl rieselfähig bleibt und sich während der Fermentation kein Teig ausbildet. Dies konnte erreicht werden, indem das Mehl vor der eigentlichen Fermentation in einem „Lödige Pflugscharmischer“ (Abbildung 3) mit einer Lösung aus Wasser, „Natuphos 5000 Combi L“ und „Natugrain TS L“ bei ständiger Durchmischung fein benetzt wurde. Optimale Ergebnisse bzgl. Aufschluss antinutritiver Substanzen, Rieselfähigkeit des Mehls und Feuchtigkeit des Mehls konnten erzielt werden. Hierfür wurde eine 1%ige Enzymlösung im Verhältnis 100 zu 30 (Mehlmasse zu Enzymlösung) auf das Mehl aufgebracht.

Tabelle 2: Verwendete Enzympräparate und entsprechende Aktivitäten

Präparat	Zusammensetzung / Aktivität
Natuphos 5000 Combi L	Phytase (5000 FTU/g), Xylanase (5600TXU/g), Glucanase (2500 TGU/g)
Natugrain TS L	Xylanase (5600 TXU/g), Glucanase (2500TGU/g)

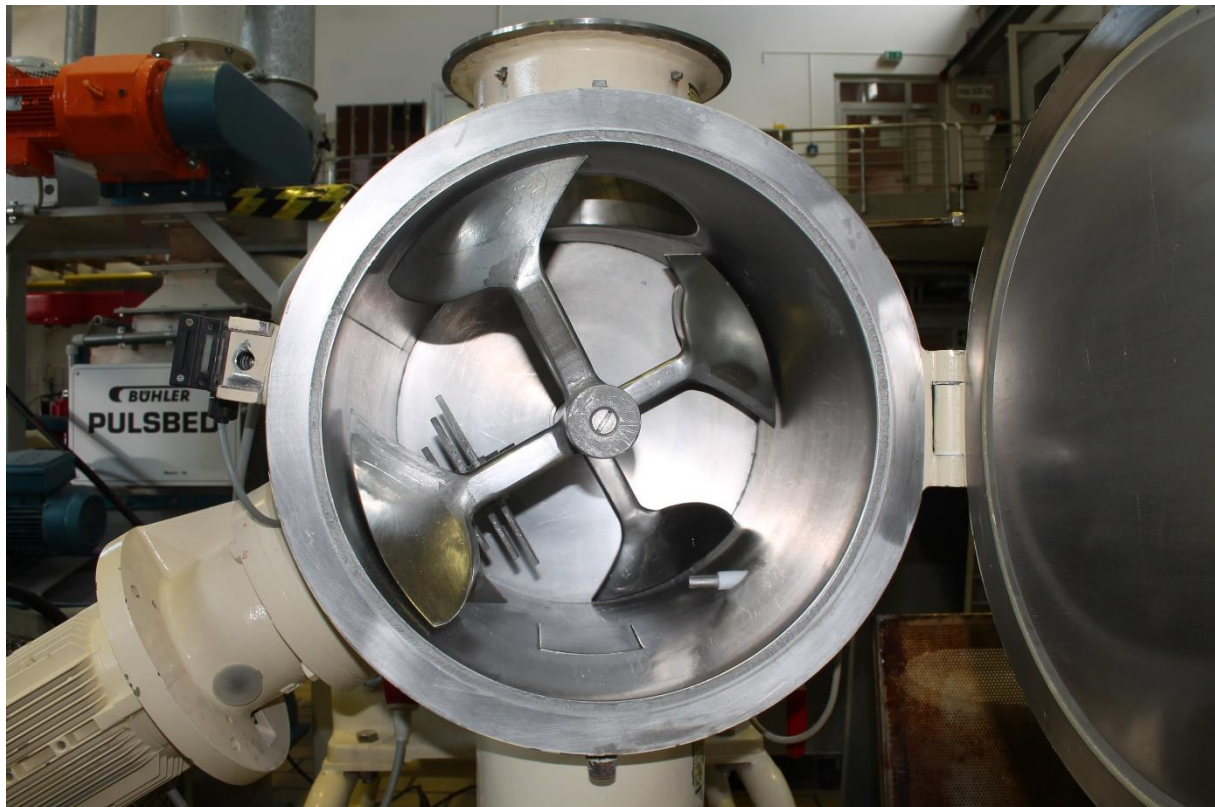


Abbildung 3: Pflugscharmischer der Firma „Lödige“ wurde für das Benetzen des Lupinenmehls verwendet.

Die eigentliche Fermentation des Lupinenmehls erfolgte im Anschluss der „Benetzung“ in Fässern welche in einem „MIWE Klimaschrank“ (s. Abbildung 4) bei 37°C für 24 Stunden gelagert wurden. Im Anschluss konnte das fermentierte Lupinenmehl mit entsprechenden Komponenten (s. Tab. 1 und 3) zu einer rieselfähigen Vormischung vermengt werden.



Abbildung 4: MIWE Klimaschrank wurde für die Fermentation des Lupinenmehls verwendet.

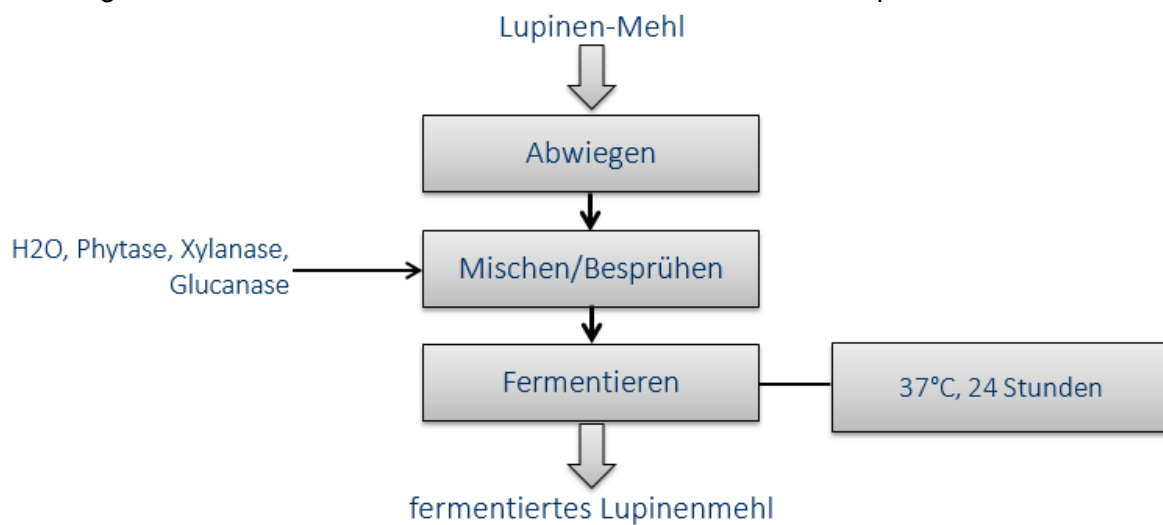


Abbildung 5: Fließschema der Lupinenmehl-Fermentation

Extrusion und Trocknung (Main-Processing)

Für die Herstellungsversuche bzw. die Herstellung von Wolfsbarschfutter wurde ein gleichläufiger Doppelwellenextruder der Firma Bühler verwendet. Nachfolgend eine genaue Typenbezeichnung:

Bühler 2 – Wellen – Extruder DNDL – 44

Antriebsteil

- Motor (im Unterbau)
- patentiertes Verzweigungsgetriebe
- patentierte Kupplung

Verfahrensteil

[Aufbau im Baukastensystem / alle Maschinenkomponenten hintereinander in einer Ebene angeordnet
⇒ ermöglicht Maschinenanpassung an verschiedene Verfahrensbedingungen]

- Gehäuse
 - Gehäuseanzahl: 5 (à 4 D = 0,176 m)
 - Gehäuse einzeln oder zusammenhängend temperierbar
 - Heizmedium: Dampf
 - Kühlmedium: Wasser
 - Verfahrenslänge: 20 D (1 D = 0,044 m)
- Schnecke
 - Doppelschnecke
 - Schneckenwellen gleichsinnig drehend
 - Vielkeilwellen auf denen Förder-, Knet- und Scherelemente aufgesteckt sind ⇒ ermöglicht Anpassung der Schnecken-konfiguration an die jeweilige Verfahrensaufgabe
 - Schneckendurchmesser: 44 mm
 - Schneckenlänge (ohne Kupplungsansatz): 0,88 m (entspr. 20 D)
 - Schneckenkonfiguration:

	Einzug		Mischen	Fördern	Druck	Temp.	Scherzone			
Anzahl / Richtung	///	/	\\	/	///	///	\	/	\	///
Steigung [Grad]	66	44	Poly	66	44	33	44	44	44	33
Länge [mm]	66	44	20	66	44	33	15	15	15	33
Versetzt [Grad]	-	-	-	-	0	0	90	90	90	90

- Schneckenantrieb erfolgt über Riemenantrieb direkt auf Verzweigungsgetriebe und weiter über Schneckenwellenkupplung auf Schneckenwellen
- Schneckendrehzahl: 60 – 450 U/min
- Schneidapparat
 - verschiebbar
 - Messerkopf mit 4 Messern
- Düsen

Düsenform	Lochdurchmesser	Angeströmte Querschnittsfläche
2 x je 1-Lochdüse	3,3 mm	17,1 mm ²

Speisung (Produktzufuhr)

- Doppelwellenspeiseapparat
 - Speisung volumetrisch (Dosiergerät mit Behälter)



Abbildung 6: Bühler 2 – Wellen – Extruder DNDL – 44



Abbildung 7: Foto der verwendeten Schneckenkonfiguration

Für die Trocknung der Futterpellets wurde ein Wirbelschicht-Trockner (Typ: OTW-25/50) der Firma Bühler verwendet. Um eine Mindesthaltbarkeit der Futterpellets zu gewährleisten, welche mindestens den angestrebten Zeitraum der Fütterungsversuche anhält, wurde auf eine Restfeuchte von <7% getrocknet. Dafür wurde 15 Minuten bei 140°C und stark fluidisiertem Trocknungsgut getrocknet.



Abbildung 8: Nahaufnahme der fluidisierten Futterpellets während der Trocknung.

Die Extrusionsversuche haben ergeben, dass eine Extrusion der jeweiligen Rezepturen, unter folgenden Verfahrensparametern zu realisieren ist. Besonders herausstechend ist hierbei, dass die Produkte mit nativem Lupinenmehl eine hohe Wasserzugabe benötigen. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf das spezifische Aminosäureprofil der Lupine.

Endschraube: flachkonisch Düse: 2x3mm

Tabelle 3: Verfahrensparameter für die Herstellung spezifischer Futterpellets

Proben Nr.	Standardfutter Fischmehl	Soja Kontrollfutter	25% Lupine	50% Lupine	75% Lupine	100% Lupine
Drehmoment [%]	17	10	10	11	13	12
Drehzahl [%]	47	47	47	47	47	47
Messergeschw. [%]	22	22	22	81	81	81
H ₂ O-Zugabe [kg/h]	4,7	7,0	7,2	7,2	7,2	7,2
Prod.-Dosierung [kg/h]	32	32	32	32	32	32
Druck [bar]	18	12	12	30	28	25
Temp. Modul 2 [°C]	100	100	100	100	100	100
Temp. Modul 3 [°C]	110	110	110	110	110	110
Temp. Modul 4 [°C]	120	120	120	120	120	120
Temp. Modul 5 [°C]	130	130	130	130	130	130

Tabelle 4: Verfahrensparameter für die Herstellung spezifischer Futterpellets

Proben Nr.	100% fermentierte Lupine	75% fermentierte Lupine	50% fermentierte Lupine	25% fermentierte Lupine
Drehmoment [%]	13	15	11	14
Drehzahl [%]	47	47	47	47
Messergeschw. [%]	81	81	81	81
H ₂ O-Zugabe [kg/h]	3,3	3,2	5,2	5,2
Prod.-Dosierung [kg/h]	32	32	32	32
Druck [bar]	22	22	21	25
Temp. Modul 2 [°C]	100	100	100	100
Temp. Modul 3 [°C]	110	110	110	110
Temp. Modul 4 [°C]	120	120	120	120
Temp. Modul 5 [°C]	130	130	130	130

Coatingversuche (Post-Processing)

Es wurden drei verschiedene Hydrolysate auf Basis von Krill, Fischmehl und Tintenfisch für die Coating-Anwendung auf Fischfutter hergestellt (s. Abbildung 9)

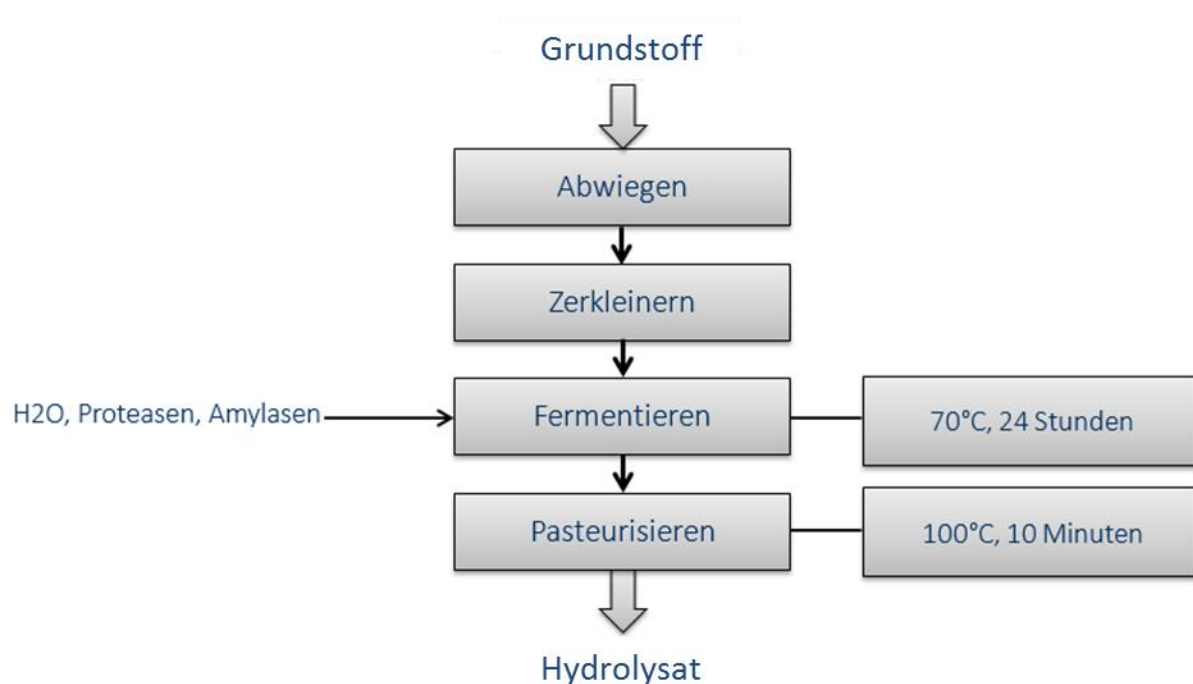


Abbildung 9: Fließschema des Hydrolysat-Herstellungsprozesses

Die Aufbringung des Coatings auf die spezifischen Futterpellets erfolgte in einem Spiralknetter der Firma Kemper „President 75“ (10) bei langsamer Durchmischung, mittels Schlauchpumpe und Düsenlanze.



Abbildung 10: Spiralknetter „President“ der Firma „Kemper“ in dem der Coatingprozess der Futterpellets durchgeführt wurde.

Die im Arbeitsplan vorgesehenen Arbeiten (Pre-, Main- und Post-Processing) konnten ohne zeitliche Abweichung durchgeführt und gelöst werden.

Methodik 3 Steigerung der Verdaulichkeit von Lupinenmehl für karnivore Fische durch enzymatischen Abbau unverdaulicher Bestandteile.

3a: Steigerung der Akzeptanz des Futters durch Aufbringen einer Ummantelung

Durch das Vorhandensein von Alkaloiden in Lupinen, ist die Schmackhaftigkeit des Futters reduzieren. Um die Schmackhaftigkeit des Futters zu erhöhen, kann der Rohstoff Lupinenmehl fermentiert werden, um störende Inhaltsstoffe zu minimieren, oder das Futterpellet kann mit einem sehr schmackhaften Stoff ummantelt werden. Hierzu wurde ein Fütterungsversuch durchgeführt um zu klären, welchen Einfluss die Ummantelung mit Ölen oder Hydrolysaten und der Prozess der Futter-Fermentation auf die Akzeptanz des Futters hat.

Versuchsaufbau:

Durchgeführt wurde der Versuch in einen rezirkulierendem Aquakultursystem. Das System bestand aus zwei gestapelte Reihen mit insgesamt 18 unabhängigen Glastanks, einem Eiweißskimmer mit Ozonzufuhr, einem Denitrifikationsfilter und einem Schaumstofffilter. Jeder Tank wies ein effektives Volumen von 81 l auf. Die Replikat wurden zufällig über die Becken verteilt. Ein Schema des Aufbaus ist in Abbildung 11 dargestellt. Der Wasserdurchfluss und die Luftzufuhr wurden für jedes Becken eingestellt.

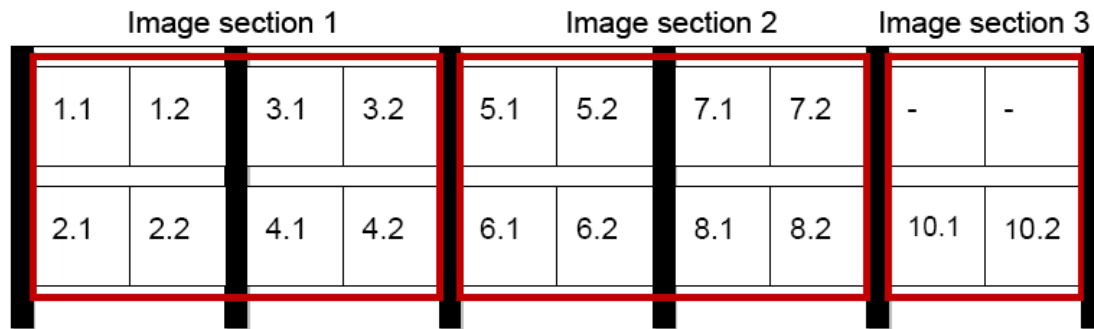


Abbildung 11. zeigt das Tankgestell mit den 20 Fischtanks. Der rote Rahmen zeigt den Bildausschnitt für die Videoanalyse

Einsatzmaterial:

Untersucht wurden vier verschiedene Coatings in Kombination mit drei verschiedenen Futtermitteln, die sich in ihren Hauptproteinanteilen unterschieden. Das erste Treatment war ein Futter in dem das Protein zu 100% aus Fischmehl gewonnen wurde; dieses diente als Kontrolle. Zusätzlich wurde ein unbehandeltes Futter verwendet, bei dem 75% Protein aus Lupinenmehl stammte und ein Futter mit 75% Proteinsubstitution durch fermentiertes Lupinenmehl. Anschließend wurden diese Futtermittel jeweils mit Krillhydrolysat, Fischöl, Fischhydrolysat und Tintenfischhydrolysat ummantelt. Die Lupinen wurden geschält und die Fermentation erfolgte mit Natugrain®TS (BASF).

Versuchsablauf:

Jedes der vier Coatings wurde in einem Zeitraum von fünf aufeinanderfolgenden Tagen unter der Verwendung von Triplikaten getestet. Da die Tankanzahl der limitierende Faktor war, wurden die verschiedenen Beschichtungen über einen Zeitraum von 2 Monaten nacheinander getestet. Für jeden Versuchslauf wurden 15 Fische in das System eingesetzt und nach der Versuchsdurchführung mit Fischen ersetzt, die keinen Kontakt mit den zu testenden Futtermitteln hatte. Nach dem Einsetzen der Tiere in das System, wurde diese für 5 Tage an das Becken gewöhnt. In dieser Eingewöhnungsphase wurden die Fische zweimal täglich mit 1,7% ihres Nassgewichts einer handelsüblichen Diät gefüttert. Während der fünftägigen Durchführungszeit wurden die Fische einmal am Tag mit 2% ihres Nassgewichts gefüttert. Hierbei wurde die Futterzugabe in fünf gleich große Portionen unterteilt, welche alle 30 Sekunden in die jeweiligen Becken gegeben wurden. Da der Bildausschnitt (vgl. Abb. 11) der verfügbaren Kamera (Canon 5D MkII, FULLHD (1080p), 24 Bilder pro Sekunde) nur 8 Tanks gleichzeitig in einer detaillierten Qualität abdecken konnte, wurde der Fütterungsvorgang für jeden Probestag zweimal in einem Zeitrahmen von insgesamt 20 Minuten wiederholt (Bildausschnitte in Abbildung 2). Das aufgezeichnete Videomaterial wurde postexperimentell ausgewertet.

Videoanalyse:

Für die Auswertung der Videos wurde jedes Replikat einzeln und unabhängig analysiert und folgende Parameter wurden als Bestimmungsvariablen verwendet.

Fütterungszeit: Zeitliche Verzögerung bis der erste Fisch eines Replikats ein Futterpartikel verzehrt hat. Darüber hinaus wurde auch das Verhalten der Versuchstiere analysiert. Fütterungsindex: Nach dieser Methode wurde die Fütterungsaktivität des Fisches bewertet.

Je höher die Fütterungsaktivität, desto höher die Punktzahl. Somit wurde jedem Futterstoff eine Fütterungsreaktionszeit und ein Fütterungsindex zugewiesen. Bei beiden Parameter wurde sichergestellt, dass das erste aufgenommene Futterpellet, auf das sich die Analyse bezieht, nicht vomitiert wurde. Der Fütterungsindex wurde von Øverli et al. (2007) modifiziert.

Die Bewertungskriterien zur Bewertung der Videodatei des Beschichtungsexperiments sind folgend. Je höher die Punktzahl, desto besser die Reaktion der Fische.

Ergebnis

5 = Kontinuierliches Aufnahme von Futter

4 = Fisch bewegt sich in Richtung Futter und kehrt in seine ursprüngliche Position zurück

3 = Kleine Bewegungen in Richtung Futter (\approx eine Körperlänge)

2 = Geringe Bewegungen in Richtung Futter ($<$ halbe Körperlänge)

1 = Fisch reagiert nicht auf Futter

*3b: Auswirkung von unbehandeltem und fermentiertem Lupinenmehl auf die Futterverdaulichkeit, sowie das Wachstum und die Verdauungsphysiologie der Fische (*Dicentrarchus labrax*)*

Futtermessung

Ein Futtermessung wurde über 53 Tage am Zentrum für Aquakulturforschung (ZAF, Alfred-Wegener-Institut) in Bremerhaven durchgeführt. Getestet wurde ein Futter basierend auf unbehandeltem Lupinenmehl, sowie ein Futter basierend auf fermentiertem Lupinenmehl. Ein Fischmehl basierendes Futter diente als Kontrolle. Die Versuche wurden in einem rezirkulierendem-Aquakultur-System (RAS) mit 12 separaten, 50-Liter-Fischbecken (50 x 25 x 40 cm (B x L x H), Kunststoff Spranger GmbH, Plauen, Deutschland) durchgeführt. Das RAS bestand aus einem mechanischen Filter, einem Eiweißabschäumer, einem Biofilter, einer Ozonversorgung (Ozon 300 (300 mg O₃ h⁻¹), AB Aqua Medic GMBH, Bissendorf, Deutschland) und einem Wasserreservoir mit ca. 360 Litern Volumen. Alle 12 Fischbecken wurden innerhalb der RAS mit demselben künstlichem Meerwasser versorgt.

Während des gesamten Fütterungsversuchs wurden die Wasserparameter Temperatur ($18,3 \pm 0,1$ ° C), Sauerstoffsättigung ($93,6 \pm 1,8\%$), pH ($7,01 \pm 0,2$), Leitfähigkeit ($49,24 \pm 0,5$ mS/cm) und Redoxpotential ($128,0 \pm 4,0$ mV) kontinuierlich von Elektroden (Senect GmbH & Co. KG, Landau, Deutschland) überwacht. Zusätzlich wurden wöchentlich manuelle Messungen durchgeführt, um die automatisierten Messungen zu überprüfen. Wasserproben wurden einmal wöchentlich mit einem QuAAtro39 AutoAnalyzer (SEAL Analytical GmbH, Norderstedt, Deutschland) auf Gesamt-Ammoniakstickstoff ($1,09 \pm 0,17$ mg/l), Nitrit ($0,58 \pm 0,07$ mg/l) und Nitrat ($149,3 \pm 27,3$ mg/l) analysiert.

Der Wasserzufluss wurde in den Becken auf ca. 50 l/h eingestellt und eine ausreichende Belüftung der Tanks wurde mit Ausströmern gewährleistet. In jedes Fischbecken wurden speziell angepasste Trichter aus Polyvinylchlorid (PVC) zur Sammlung der Fäzes eingesetzt. Die Trichter befanden sich am Boden der Fischbecken. Durch die Abwärtsneigung der Trichter sammelten sich die Fäzes in einem kleinen Zylinder innerhalb der Fischbecken, aus dem sie mit einer 10-ml-Plastikpipette vorsichtig aufgenommen werden konnten. Das RAS wurde einem 12:12-Stunden-Licht / Dunkel-Zyklus (Licht von 7:30 bis 19:30 Uhr Ortszeit) ausgesetzt. Europäische Wolfsbarsch Fingerlinge wurden von Aquastream SAS, Ploemeur, Frankreich, geliefert. Insgesamt wurden 204 Fische per Zufall auf die 12 Fischbecken verteilt. Die Fische wurden für drei Wochen an die experimentellen Bedingungen angepasst. Während dieser Zeit wurden die Fische mit kommerziellem, auf Fischmehl basierendem Futter gefüttert (1,5 mm, START (50% Protein, 20% Fett, 0,3% Rohfaser, 7,2% Asche, 1,1% Gesamtphosphor) Alltech® COPPENS, Niederlande). Zu Beginn des Futtermessungs wurde jeder Tank mit 17 Fischen und einer durchschnittlichen Gesamtbioasse von $249,9 \pm 7,7$ g ($n = 12$) besetzt. Das durchschnittliche individuelle Körpergewicht, sowie die Gesamtlänge der Fische betrug $14,9 \pm 4,0$ g, bzw. $11,3 \pm 1,0$ cm ($n = 204$).

Die zu testenden Futtermittel wurden mit einer Menge von 2% der Fischbiomasse pro Tag gefüttert. Die Fische wurden zweimal täglich, um 10:00 und 16:00 Uhr gefüttert. Nach jeder Fütterung wurde nicht gefressenes Futter wieder aufgesammelt, um die Futteraufnahme zu bestimmen und eine Kontamination der Fäzes zu vermeiden. Nach 29 Tagen wurden alle Fische erneut gewogen und die Futterrate wurde entsprechend angepasst.

Die finale Probenahme erfolgte nach 53 Tagen am Ende des Fütterungsversuchs. Die Gewichte und Gesamtlängen aller Fische wurden aufgezeichnet.

Die folgenden Parameter wurden gemessen und berechnet:

Gewichtszunahme (Weightgain):	$WG = BW_{final} - BW_{initial}$
Futter-Konversionsrate:	$FCR = FI / WG$
Proteinwirkungsgrad:	$PER = WG / \text{Rohproteinaufnahme (g)}$
Konditionsfaktor:	$CF = 100 * (BW / SL^3)$

mit:

BW = Körpergewicht (g)

SL = Standardlänge (cm)

$BW_{initial}$ = Anfängliches Körpergewicht (g)

BW_{final} = Finales Körpergewicht (g)

FI = Menge des aufgenommenen Futters (g) auf Trockenbasis (engl. Feed Intake)

Scheinbare Verdaulichkeit

Die scheinbare Verdaulichkeit verschiedener Nährstoffe wurde mithilfe von Titaniumdioxid nach der Methodik von Lied et al. 1982 bestimmt. Titaniumdioxid wurde jedem Versuchsfutter mit einer Konzentration von 5 g/kg als inerte Marker beigefügt. Die scheinbaren Verdaulichkeitskoeffizienten (engl. ADC) der untersuchten Nährstoffe (Stickstoff, Kohlenstoff, Phosphor), Trockensubstanz und Energie wurden nach Maynard, Loosli, Hintz & Warner (1979) berechnet.

Scheinbarer Verdaulichkeitskoeffizient (ADC):

$$ADC = 100 - (100 * (TiO_2\text{-Futter} / TiO_2\text{-Fäzes}) * (Nährstoff\text{-Fäzes} / Nährstoff\text{-Futter}))$$

mit:

$TiO_2\text{-Futter}$ = Titaniumdioxid Gehalt im Futter

$TiO_2\text{-Fäzes}$ = Titaniumdioxid Gehalt in den Fäzes

$Nährstoff\text{-Fäzes}$ = Nährstoff Gehalt in den Fäzes

$Nährstoff\text{-Futter}$ = Nährstoff Gehalt in dem Futter

Um eine absolute Menge der verdauten Nährstoffe innerhalb der Futter (verdaulicher Nährstoff) zu berechnen, wurde der Nährstoffgehalt der Futter mit dem jeweiligen ADC-Wert dieses Nährstoffs in Beziehung gesetzt:

$$\text{Verdaulicher Nährstoff} = \text{Nährstoff-Futter} * \text{ADC-Nährstoff} / 100$$

mit:

$ADC\text{-Nährstoff}$ = scheinbare Verdaulichkeit des zu untersuchenden Nährstoffes

Die Fäzes wurden in der letzten Woche des Fütterungsversuchs an sieben aufeinanderfolgenden Tagen gesammelt. Zweimal täglich, kurz vor jeder Fütterung, wurden die Fäzes aus dem Trichter der PVC-Trichter entnommen. Eine Kontamination der Fäzes mit nicht gefressenen Futterresten wurde verhindert, da die Tanks ca. 30 Minuten nach jedem Fütterungsvorgang kontrolliert und gereinigt wurden. Zur Aufnahme der Fäzes wurde die

Spitze der Pipette abgeschnitten, um ein Verstopfen der Pipette und ein Aufbrechen der Fäzes Partikel zu verhindern. Der Inhalt der Pipette wurde dann in konische 15 ml-Röhrchen überführt, sodass sich die Fäzes absetzen konnten. Nach 10 min wurde der resultierende Überstand verworfen und die verbleibenden Fäzes wurden für mindestens 48 Stunden bei 50 °C in Aluminiumbechern getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Fäzes mit einem Handmörser zerkleinert und bis zur weiteren Analyse in einem Exsikkator gelagert.

Um die physikalische Beschaffenheit der Fäzes Partikel zu charakterisieren, wurden frische Fäzesproben aus jedem Fischbecken entnommen. Ein konstantes Volumen (10 ml) der gesammelten Fäzesprobe wurde in eine Petrischale überführt und vorsichtig mit 10 ml destilliertem Wasser verdünnt. Die Größe von 20 zufällig ausgewählten Fäzespartikeln wurde mit einem Nikon SMZ25-Mikroskop, einer hochauflösenden Nikon DS-Ri1-Kamera und einer NIS-elements basic research 4.20.01 software (Nikon, Japan) ausgemessen. Pro Behandlung wurden neun Proben ausgewertet.

Chemische Analysen

Der Energiegehalt des Futters und der Fäzes wurde durch Verbrennung in einem Kalorimeter (Parr ® 6100, Parr Instrument Company, USA) bestimmt. Stickstoff und Kohlenstoff wurden unter Verwendung eines Euro Elemental Analyzer (Eurovector SPA, Redavalle, Italien) durch Verbrennung der Proben und Nachweis der resultierenden Gasoxide bestimmt. Der Proteingehalt wurde dann nach Dumas (1831) unter Verwendung eines Umrechnungsfaktors von 6,25 geschätzt. Phosphor wurde durch Oxidation von saurem Persulfat nach Grasshoff, Kremling & Erhardt (1999) gemessen. Titaniumdioxid wurde nach Short, Gorton, Wiseman & Boorman (1996) bestimmt. Der Nährstoff- und Aminosäuregehalt des unbehandelten und fermentierten Lupinenmehls erfolgte durch das akkreditierte Labor IBEN (Bremerhaven, Deutschland). Die Phytinsäurebestimmungen wurden in der Marine Biotechnologie Abteilung der Hochschule in Bremerhaven mit einem Pharmacia FPLC-System durchgeführt, basierend auf dem Protokoll von Schlemmer, Jany, Berk, Schulz & Rechkemmer (2001) und Schlemmer (2010).

Enzymaktivitäten

Am Ende des Futtersversuchs wurden vier Fische zufällig pro Behandlung ausgewählt und mit 3-Aminobenzoessäureethylmethansulfonat (MS-222, Sigma-Aldrich) bei einer Konzentration von 500 mg/l in einem getrennten Behälter getötet. Dann wurde der Verdauungstrakt präpariert, in 15 ml-Röhrchen überführt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 ° C gelagert. Für die weitere Verarbeitung wurden die tiefgefrorenen Verdauungsorgane bei Raumtemperatur leicht aufgetaut und zwischen jedem einzelnen Arbeitsschritt auf Eis gekühlt. Zunächst wurde mesenterisches Fett von den Verdauungsorganen entfernt. Dann wurden die pylorischen Anhängen und der Darm aus dem Verdauungstrakt seziiert. Die einzelnen Verdauungsorgane wurden mit destilliertem Wasser gespült, sorgfältig mit Papiertüchern getrocknet und gewogen. Dann wurde kaltes destilliertes Wasser in einem Verhältnis von 1: 4 (Gewicht: Volumen) zu den Organen gegeben. Die Gewebe wurden von Hand mit einem Stößel 2 ml-Mikroröhrchen (Eppendorf, Deutschland) sorgfältig homogenisiert. Nach der Homogenisierung wurden die Proben bei 4 °C für 30 min bei 16.800 g zentrifugiert (Eppendorf 5430R, Deutschland). Der Überstand jeder Probe, die den Enzymextrakt darstellt, wurde aliquotiert und bei -80 ° C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

Die Messung der Enzymaktivitäten wurden dreifach mit einer 1:10 Verdünnung der Enzymextrakte durchgeführt. Die Enzymaktivität ist definiert durch ein μmol Substrat, dass in einer Minute pro g frische Masse (U mg/FM) umgewandelt wird. Die Aktivität von Chymotrypsin wurde photometrisch nach Saborowski, Sahling, Navarette de Toro, Walter & García-Carreño (2004) mit dem Substrat N-Succinyl-ala-ala-pro-phe-Nitroanilid (SAPNA, Sigma-Aldrich S7388) bestimmt. Für die routinemäßige Anwendung wurde diese Methode auf Mikrotiterplatten angepasst und ausgeführt. Die Veränderung der Absorption wurde für 10 min. alle 30 s bei 405 nm mit einem Multiskan FC-Plattenlesegerät (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) gemessen.

Die alkalische Phosphatase Aktivität wurde mit dem fluorogenen Substrat 4-Methylumbelliferylphosphat (Sigma-Aldrich M8883) bestimmt. Die Fluoreszenz wurde alle 30 s für 10 min bei Raumtemperatur und einer Anregungswellenlänge von 355 nm, sowie einer Emissionswellenlänge von 460 nm in einem Mikrotiterplatten-Fluorometer (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fischer; Deutschland) gemessen. Eine Eichkurve wurde mit 4-Methylumbelliferol (Sigma-Aldrich M1381) erstellt.

3c: Effekt von Lupinenproteinqualität auf Wachstum, Futtermittelverwertung und Gesundheit der Fische.

Im Zentrum für Aquakulturforschung wurden juvenile Europäische Wolfsbarsche (*Dicentrarchus labrax*) über einen Zeitraum von 91 Tagen aufgezogen. Die verwendeten Fische stammten von der Firma Aquastream SAS in Ploemeur, Frankreich und wurden vor Versuchsbeginn von der Tierärztlichen Hochschule Hannover untersucht und als gesund eingestuft (Stichprobe, sechs Exemplare). Bei der Anlage handelt es sich um ein rezirkulierendes Aquakultursystem, bestehend aus neun parallel geschalteten 2,4 m³-Rundstrombecken (2 m * 2 m * 0,6 m), die jeweils in vier 0,6 m³-Kompartimente aufgeteilt wurden. Auf diese Weise ergaben sich 36 Kompartimente, wovon 6 anderweitig Verwendung fanden. In jedes der 30 verwendeten Kompartimente wurden zu Beginn des Versuchs 50 Fische mit einem Körpergewicht von 57,6 +/- 9,8 g und einer Gesamtlänge von 17,0 +/- 1,0 cm eingesetzt und mit zehn verschiedenen Futterrezepturen (3 Kompartimente/Replikate pro Rezeptur) gefuttern. Die Belegung der 30 Becken mit den zehn Futtersorten und den jeweiligen drei Replikaten (siehe Abb. 8) erfolgte über das Zufallsprinzip. Die Fütterung erfolgte zwei Mal täglich, um 9:00 und um 15:00 Uhr, per Hand ad libitum (bis zur scheinbaren Sättigung). Als scheinbar gesättigt wurden die Fische angesehen, sobald sie über einen Zeitraum von 10 – 15 Minuten nicht mehr auf das eingebrachte Futter reagierten.

Es erfolgte ein kontinuierlicher Volumenfluss von 3000 l / (h * B), wobei Sauerstoffgehalt (74,15 +/- 6,10 %), pH-Wert (7,78 +/- 0,07), Temperatur (18,1 +/- 0,2 °C) und elektrische Leitfähigkeit (46,78 +/- 1,41 mS / cm) kontinuierlich mit einem Controllersystem (Hach Lange, sc1000 + Hach Lange, LDO sc + Hach Lange, Polymetron 8350.5 + Hach Lange, Serie 3700 sc) und das Redoxpotential (158,34 +/- 4,91 mV) mit einem zweiten Controllersystem (Burkert, Typ 8206 + JUMO, tecLine Rd) gemessen wurden. Der Ammoniumgehalt (0,38 +/- 0,37 mg / l), der Nitritgehalt (0,27 +/- 0,14 mg / l) und der Nitratgehalt (189,58 +/- 41,73 mg / l) wurden zwei Mal wöchentlich mit einem AutoAnalyzer (SEAL Analytical, QuAAtro39) kontrolliert. In den Kreislauf integriert waren ein Trommelfilter (Sander Aquatec, HDF 801), ein Proteinabschäumer (Sander Aquatec, Helgoland 600x2500), ein Sammelbehälter (Sander Aquatec, Sammelbehälter 1000), ein Nitrifikationsbiofilter (Sander Aquatec, Submers 1750x3000), ein Denitrifikationsbiofilter (Kunststoff Spranger, Prototyp SID-Reaktor), ein

Rieselfilter (Sander Aquatec, Rieselentgaser 600x1700), ein Ozonerzeuger (Sander Aquatec, 15 Multizon 310.80V) und drei Belüfterkompressoren (Nitto Kohki, LA-120A). Beleuchtet wurde von 7:00 - 19:00 Uhr.

3.2 Zusammensetzung der Futtermittel

Die Versuchsdiäten wurden formuliert, um den Bedarf der juvenilen Wolfsbarsche, wie von der FAO angegeben, zu decken. Es wurden zehn verschiedene isoproteinogene und isokalorische Futterrezepturen gefüttert, welche unterschiedliche Proteinquellen zu unterschiedlichen Gehalten aufwiesen. Es wurde herkömmliches Futter auf Fischmehlbasis (FMK, 65 % Fischmehl) mit Futter verglichen, bei dem circa 25, 50, 75 und 100 % des Fischmehls durch unbehandeltes (LM25, LM50, LM75, LM100) bzw. fermentiertes Lupinenkernmehl (FLM25, FLM50, FLM75, FLM100) ersetzt wurden, wobei es ein zusätzliches Futter auf Sojamehlbasis (SMK25, 15 % Sojamehl + 50 % Fischmehl) gab.

3.3.1 Futteraufnahme

Täglich wurde die in die Becken eingebrachte und nach der Fütterung wieder entnommene Futtermenge notiert. Hierzu wurde jeden Abend das Gewicht der Futterdosen mit einer Präzisionswaage (Kern, PCB 1000-2) auf 100 mg genau ermittelt. Des Weiteren ist das nicht gefressene Futter, welches bei jeder Fütterung mit einem Aquarienkescher aus dem System entnommen, von eventuellen Anhaftungen wie z. B. Faeces befreit, in Wageschale verfrachtet und über Nacht bei 60 °C in einem Trockenschrank (Thermo Scientific, Heraeus Series 6000 T/UT 6120) getrocknet wurde, mit einer Präzisionswaage (Sartorius, TE412) auf 10 mg genau gewogen worden. Da die Futterpellets im Wasser durch Leaching Gewicht verlieren, wurde ein Korrektur-Faktor bestimmt, um diesen Verlust auszugleichen und so einen korrekten Wert für den Recatch zu erhalten. Zur Ermittlung dieses Leaching-Faktors wurden 5 g (3 Replikate) jedes Futters mit einer Präzisionswaage (Sartorius, TE412) auf 10 mg genau gewogen, in einen Behälter mit 50 ml Wasser aus dem Kreislauf gegeben und für 20 Minuten einweichen gelassen. Nach der Einweichzeit wurde das Wasser durch einen Aquarienkescher abgossen, das verbliebene Futter in ein Wageschale gefüllt, für 24 Stunden bei 60 °C im Trockenschrank (Thermo Scientific, Heraeus Series 6000 T/UT 6120) getrocknet und mit einer Präzisionswaage (Sartorius, TE412) auf 10 mg genau gewogen.

3.3.2 Längen- und Gewichtsmessung

Zu Versuchsstart sowie zu Versuchsende und in einem Abstand von jeweils vier Wochen wurden die Fische einzeln, nach einer Ausnüchterungsphase von mindestens 42 Stunden, vermessen und gewogen. Zur Längenmessung fand ein Messbrett mit einer Gesamtlänge von 75 cm und einer Skalierung von 1 cm Verwendung, wobei die Länge auf 5 mm genau notiert wurde. Das Gewicht wurde mit einer Plattformwaage (Kern, DE15K0.2D) ermittelt und notiert.

3.3.3 Laboranalysen

3.3.3.1 Probennahme und –vorbereitung

(1) Futter

Gegen Ende des Versuchs wurden von jedem Futter Proben entnommen. Die Futterpellets wurden mit einer Messermühle (Retsch, Grindomix GM 200) zu einem feinen, homogenen Pulver zerkleinert und bis zur Analyse bei – 25 °C gelagert.

(2) Fisch

Nach Ende des Versuchs wurde ein Fisch pro Becken, sprich drei Fische pro Futtermittel, über das Zufallsprinzip entnommen, mit einem Schlag auf den Kopf sediert, mit Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (Sigma-Aldrich, Artikelnummer: E10521) getötet und bis zur weiteren Bearbeitung bei – 80 °C gelagert. Die gefrorenen Fischproben (ganzer Fisch) wurden gefriergetrocknet (Christ, Alpha 1-4 LSC), in einer Messermühle (Retsch, Grindomix GM 200) pulverisiert und bis zur Analyse bei – 25 °C gelagert.

(3) Faeces

Nach Ende des Versuchs wurden Proben der Faeces entnommen. Hierzu wurden alle Fische, wie bei der Langen- und Gewichtsmessung, tankweise entnommen und in ein separates Becken verfrachtet. Von hier aus wurden sie einzeln per Hand abgestriffen. Die abgestriffene Faeces wurde in Wageschalen aufgefangen, in Falcon-Tubes gesammelt und futterweise zusammengeführt. Die zehn Tubes wurden aufrecht in eine Halterung gestellt, sodass eine Sedimentation stattfinden und so ein großer Teil des Wassers in den Proben entnommen werden konnte. Der verbliebene Rest wurde für 24 Stunden bei 60 °C in einem Trockenschrank (Thermo Scientific, Heraeus Series 6000 T/UT 6120) getrocknet und anschließend bei – 80 °C gelagert. Die so gekühlten Proben wurden gefriergetrocknet (Christ, Alpha 1-4 LSC) und bis zur Analyse bei – 25 °C aufbewahrt.

3.3.3.2 Umfang der Analysen

(1) Bombenkalorimetrie – Brennwert/Bruttoenergiegehalt

Die Energiegehaltsanalyse wurde mit allen Futtermitteln in Doppelbestimmung sowie mit zwei Fischproben pro Futtermittel (Ausnahme LM100, nur eine Fischprobe) in Doppelbestimmung durchgeführt.

(2) Proximate Analysis - Nährstoffgehalte

Für die Analysen der Nährstoffgehalte wurden alle Futtersorten in Doppelbestimmung sowie alle vorhandenen Fischproben, sprich drei Fische pro Futtermittel, in Doppelbestimmung analysiert.

(3) C/N-Analyse – Gesamtkohlenstoff- und Gesamtstickstoffgehalt

Die Gesamtkohlenstoff- und Gesamtstickstoffanalyse wurde mit allen Futtermitteln in Dreifachbestimmung, mit allen Faecesproben in Dreifachbestimmung und aufgrund mangelnden Probenmaterials mit ein bis drei Fischproben pro Futtermittel in Dreifachbestimmung durchgeführt.

3.3.3.3 Bombenkalorimetrie - Brennwert/Bruttoenergiegehalt

Um den Energiegehalt der Proben mit dem Kompensations-Mantelkalorimeter (Parr, A1329DD) zu ermitteln wurden die zu analysierenden Proben mit einer Presse zu Tabletten gepresst und mit einer Laborwaage (Sartorius, Quintix 224-1S) gewogen. Hierbei musste die Masse der Tabletten gerätebedingt zwischen 0,6 und 1,2 g wiegen und sie durften nicht mehr als 8000 cal Energie freisetzen. Die Tablette wurde in das Verbrennungsschalen der Bombe eingelegt und mit einem Zündfaden (Parr, Artikelnummer: 845DD2) versehen, welcher an den Zünddraht geknotet worden ist und mit dem anderen Ende unter der Tablette lag. Im Anschluss wurde der Bombenkopf aufgelegt und mit der Schraubkappe fest mit dem Zylinder verbunden. Das Einlassventil wurde per Hand aufgeschraubt und die Bombe mit Sauerstoff befüllt. Hierzu wurde das integrierte Sauerstofffüllsystem des Kalorimeters verwendet. Der Wasserbehälter wurde mit exakt 2000 ml Wasser, abgemessen mit einer Laborwaage (Sartorius, Secura 102-1S), befüllt und in das Kalorimeter gestellt, woraufhin die gefüllte Bombe in den Wasserbehälter eingelegt wurde. Die beiden Zündkabel wurden an die dazugehörigen

Anschlüsse gesteckt und die Bombe vollständig versenkt, woraufhin kontrolliert werden konnte, ob die Bombe vollständig abdichtete. Das Kalorimeter wurde verschlossen und das Programm gestartet. Hierzu wurde im Menu „Betriebsmodus: Analyse oder Standardisierung“, „Bomben/EE: 1 oder 2“, „Start: Akzeptiere autom. Proben-ID (Ja – Nein)“, „Bomben-ID eingeben: 1 oder 2“ und „Enter Probengewicht (Enter)“ gewählt. Nach Ablauf des Programms konnte das Kalorimeter geöffnet, die Bombe entnommen und das Ventil langsam, über einen Zeitraum von 2 – 3 Minuten, geöffnet werden. Nach vollständiger Entweichung des Drucks konnte die Bombe geöffnet und kontrolliert werden. Sollten im Inneren der Bombe Rusablagerungen gewesen sein, wurde die Messung wiederholt, da dies ein Zeichen für eine unvollständige Verbrennung ist. Abschließend wurde die Bombe mit Leitungswasser gereinigt und der Rus und Verbrennungsrückstände aus dem Zundschildchen entfernt. Das Ventil der Sauerstoffflasche wurde verschlossen und der verbleibende Druck erst in die Bombe und daraufhin in die Umgebung abgelassen. Nun konnte das Gerät abgeschaltet werden.

3.3.3.4 Proximate Analysis - Nährstoffgehalte

(1) Trockensubstanz-/Rohwassergehalt

Um den Rohwassergehalt bzw. die Trockenmasse der Probe zu bestimmen, wurden 2 g der Probe mit einer Präzisionswaage (Kern & Sohn, EW 420-3NM) auf 1 mg genau gewogen und in eine vorher bei 103 +/- 2 °C im Trockenschrank (Mettler, NL30) getrocknete und ebenfalls mit der Präzisionswaage zuvor auf 1 mg genau gewogene Aluminiumschale, gefüllt mit chemisch gereinigtem Seesand (Carl Roth, Artikelnummer: 8441), überführt und mit einem Glasstab sorgfältig, bis zur Homogenität, vermischt. Anschließend wurde die Schale inkl. Probe, Sand und Glasstab in einen auf 103 +/- 2 °C vorgeheizten Trockenschrank (Mettler, NL30) verfrachtet und dort für vier Stunden getrocknet. Zur Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Probe in einem Exsikkator gelagert. Im Anschluss konnte die so getrocknete Probe erneut mit der Präzisionswaage auf 1 mg genau gewogen werden.

(2) Gesamtproteingehalt

Um den Anteil des Rohproteins zu bestimmen, wurden 0,5 g der Probe in einem Wageschiffchen (Macherey-Nagel, Artikelnummer: 486000) mit einer Präzisionswaage (Kern & Sohn, EW 420-3NM) auf 1 mg genau abgewogen und in einem Aufschlusskolben mit einer Siederperle (Sigma-Aldrich, Artikelnummer: 18406), einer Kjeldahl-Tablette (PanReac AppliChem, Bestellnummer: 173348.1214) und 20 ml 96-prozentiger Schwefelsäure (Carl Roth, Artikelnummer: 4623.2), abgefüllt mit einer 25 ml-Dispensette (Brand, Dispensette S Trace Analysis), zusammengeführt. Die Aufschlusskolben wurden in die Halterung eingesteckt und die Halterung in die Blockaufschlusseinheit (Gerhardt, Kjeldahltherm) eingelegt. Um den Aufschluss zu beginnen, wurde die Anfangstemperatur von 150 °C am Gerät eingestellt.

Nachdem sich diese Temperatur eingestellt hatte, wurde die Temperatur alle 15 Minuten manuell um 50 °C, bis zu einer Endtemperatur von 410 °C, erhöht. Der Aufschluss gilt 30 Minuten nach einer Grünfärbung der Probe als beendet und das Gerät wird abgeschaltet. Bei einer starken Rauchentwicklung während des Aufschlusses wird zusätzlich ein Prozessabsaugsystem (Omnilab, Bestellnummer: 4700012) mit zwei Flaschen 20-prozentiger NaOH-Lösung, die selbst aus deionisiertem Wasser und NaOH (Carl Roth, Artikelnummer: 9356.5) angemischt wurde, hinzugeschaltet. Nach Abschluss des Aufschlusses wurden die Kolben abkühlen gelassen und anschließend zur Kjeldahldestillation in eine Destilliereinheit (Gerhardt, Vapodest 30s) eingespannt. Zusätzlich wurde ein Erlenmeyer-Kolben, gefüllt mit 25 ml 5-prozentiger Borsäure (hergestellt aus kristalliner Borsäure (Carl Roth, Artikelnummer: 6943.2) und abgemessen in einem 50 ml-Messzylinder) und 3 Tropfen Tashiro-Indikator (Carl

Roth, Artikelnummer: 2624.1), eingelegt. Des Weiteren wurden die Vorratsbehälter für das deionisierte Wasser und die Natronlauge gefüllt. Die hierzu verwendete Natronlauge wurde selbst mit Hilfe von deionisiertem Wasser und NaOH (Carl Roth, Artikelnummer: 9356.5) mit einer Konzentration von 33 g / 100 ml angemischt. Das Eiweißprogramm wurde editiert (Zugabe H₂O: 72 ml, Zugabe NaOH: 131 ml, Reaktion: 00 s, Destillation: 540 s, Dampfleistung: 90 %, Absaugung Probe: 27 s) und gestartet. Nach Ablauf der Destillation wurde der Erlenmeyerkolben entnommen, Flüssigkeitsreste am Schlauch wurden mit deionisiertem Wasser in den Erlenmeyerkolben gespült und die Lösung mit 0,1-molarer Salzsäure mit einem Titer von 0,9740 titriert. Die hierzu verwendete Säure wurde selbst angemischt (Carl Roth, Artikelnummer: 4625.2) und zur Titration wurde eine elektrische Burette (Jencons, Digitrate) benutzt.

(3) Gesamtfettgehalt

10 g der Futterprobe oder 2 g der Fischprobe wurden mit einer Präzisionswaage (Kern & Sohn, EW 420-3NM) auf 1 mg genau abgewogen und zusammen mit 150 ml 4-molarer Salzsäure (Carl Roth, Artikelnummer: N076), abgefüllt mit einem 250 ml-Messzylinder, und vier Siedesteinchen (Fluka, Artikelnummer: 101753445) in ein 500 ml-Becherglas überführt, mit einem Glasstab vermischt und mit einem Uhrglas aus PTFE abgedeckt. Das Gemisch wurde auf einer Heizplatte (Heidolph, MR 3002 S8) aufgekocht und eine Stunde möglichst schwach sieden gelassen. Anschließend wurde der Aufschluss durch zwei ineinandergelegte, vorher mit deionisiertem Wasser durchnässte, Filterpapiere (Macherey-Nagel, Artikelnummer: 531 024) abgegossen, das leere Becherglas mit kochendem deionisiertem Wasser gespült und erneut durch die Filter abgegossen. Das Filterpapier wurde nun mit kochendem, deionisiertem Wasser gespült, bis das ablaufende Wasser, sowie das Filterpapier selbst, einen pH-Wert von 6 - 7 aufwiesen und somit neutral waren, geprüft mit pH-Messstreifen (Macherey-Nagel, Artikelnummer: 902 04). Die so bearbeiteten Filterpapiere wurden daraufhin über Nacht unter dem Abzug stehen gelassen und am nächsten Tag, falls notwendig, zusätzlich im Trockenschrank (Memmert, UFE 400) bei 103 +/- 2 °C getrocknet, bis keine fühlbare Feuchtigkeit mehr vorhanden war. Das Becherglas, das Uhrglas und der Glasstab wurden mit Petroleumbenzin (Carl Roth, Artikelnummer: T173.3) und entfettetem Zellstoff (Behr, Bestellnummer: 9.413 152) zwei Mal ausgewischt, woraufhin eine Extraktionshülse (Behr, Artikelnummer: 9843808) mit ebendiesen befüllt wurde. Die gefüllte Extraktionshülse wurde in einen Twisselmann-Extraktor eingelegt und in einen Extraktionsapparat (Behr, R106T-SK oder Gerhardt, SR 2) eingespannt. Ein Rundkolben mit 4 Siedesteinchen (Fluka, Artikelnummer: 101753445) wurde eine Stunde bei 103 +/- 2 °C im Trockenschrank (Memmert, NL30) getrocknet, in einem Exsikkator abkühlen gelassen, mit der Präzisionswaage auf 1 mg genau gewogen und mit 80 ml Petroleumbenzin (Carl Roth, Artikelnummer: T173.3), abgefüllt in einem 100 ml-Messzylinder, befüllt. Dieser wurde ebenfalls in das Extraktionssystem eingespannt und die Extraktion wurde bei 60 % Heizleistung bzw. auf Stufe I gestartet. Nach einer Extraktionsdauer (Start der Zeit bei > 4 Tropfen / Sekunde) von einer Stunde wurde die Heizung abgeschaltet, ein Korkring zwischen Rundkolben und Heizplatte gelegt und die Extraktion so gestoppt. Sobald keine Tropfen mehr von der Extraktionshülse in den Rundkolben tropften (20 - 30 Minuten), konnte der Rundkolben entnommen und in einen Rotationsverdampfer (Buchi, KRvrTD 65/45) eingespannt werden. Bei einer Wasserbadtemperatur von 70 °C und einer Drehzahl von 70 U / s wurde solange abrotiert, bis kein Destillat mehr in den Auffangkolben floss. Anschließend wurde der Rundkolben erneut für eine Stunde waagrecht bei 103 +/- 2 °C im Trockenschrank (Memmert, NL30) getrocknet, in einem Exsikkator abkühlen gelassen und mit der Präzisionswaage auf 1 mg genau gewogen.

(4) Rohaschegehalt

Es wurden 2,5 g der Probe mit Hilfe einer Präzisionswaage (Kern & Sohn, EW 420-3NM) auf 1 mg genau eingewogen und in einen vorher bei 103 +/- 2 °C im Trockenschrank (Memmert, NL30) getrockneten und ebenfalls mit der Präzisionswaage auf 1 mg genau gewogenen Quarztiegel überführt. Dieser Tiegel wurde über einem Propan-Bunsenbrenner (Omnilab, 1160DP) solange erhitzt und die Probe so verascht, bis kein Rauch mehr aufstieg, wobei darauf geachtet wurde, dass die Probe nicht entflammte. Die so präparierten Proben wurden in einen Muffelofen (Naber, N7) mit einer Steuereinheit (Naber, TP1) gestellt und für 4 Stunden bei 550 °C verascht. Anschließend konnten die Tiegel in einem Exsikkator abkühlen und erneut mit der Präzisionswaage auf 1 mg genau gewogen werden.

(5) Kohlenhydratgehalt

Der Kohlenhydratgehalt wurde, wie bei der Proximate Analysis üblich, rein rechnerisch ermittelt. Er wird als Rest neben Rohwasser, Rohasche, Gesamtfett und Gesamtprotein gesehen.

3.3.3.5 C/N-Analysis - Gesamtkohlenstoff- und Gesamtstickstoffgehalt

Die vorbereiteten Proben wurden mit einer Mikrowaage (Mettler Toledo, XP6U) in Zinnhülsen (IVA Analysetechnik, Artikelnummer: 6981102) zu jeweils 0,8 - 1,2 mg eingewogen, wobei darauf geachtet wurde, dass die drei zusammengehörenden Replikate möglichst die gleiche Substanzmenge beinhalten. Die auf diese Weise befüllten Zinnhülsen wurden verschlossen, indem sie mit Hilfe von zwei Pinzetten zusammengedrückt, aufgerollt und zu einer Kugel geformt wurden. Das Besteck wurde zwischen den verschiedenen Proben mit 80-prozentigem Aceton gereinigt und die vorbereiteten Hülsen bis zur weiteren Bearbeitung in einer sterilen Mikrotiterplatte (TH. Geyer, Artikelnummer: 4000329) in einem Exsikkator aufbewahrt. Im Anschluss erfolgte die Analyse im Euro Elementaranalysator (HEKAtech, 6 AP D0/2 762.1).

3.4 Berechnungen

Ausgehend von den Messungen der Länge und des Gewichts wurden Durchschnitte der einzelnen Tanks bzw. Kompartimente errechnet, mit denen weitere Kennzahlen, wie die Gewichtszunahme (WG), die Spezifische Wachstumsrate (SGR) und der Konditionskoeffizient (CF) errechnet worden sind. Die Berechnung dieser Kennzahlen erfolgte mit den folgenden Gleichungen:

[1] Gewichtszunahme (weight gain):

$$WG [g] = BW_{final} - BW_{initial}$$

BW_{final}: Finales Körpergewicht (final body weight) in g

BW_{initial}: Anfängliches Körpergewicht (initial body weight) in g

[2] Spezifische Wachstumsrate (specific growth rate):

$$SGR [\% * Tag^{-1}] = \frac{\ln(BW_{final}) - \ln(BW_{initial})}{dur * 100}$$

dur: Dauer (duration) in Tagen

[3] Konditionskoeffizient (condition factor):

$$CF [\%] = \frac{BW_{final}}{BL_{final}^3} * 100$$

Mit den erhobenen Daten, dem eingebrachten Futter, dem wieder entnommenen Futter sowie einem ermittelten Korrekturfaktor für jedes Futter konnte die reale Futteraufnahme (FI) mit den folgenden Gleichungen berechnet werden:

[4] Leaching-Faktor (leaching factor):

$$f_{leaching} [\%] = 100 + \frac{(W_{bl} - W_{al})}{W_{bl}} * 100$$

W_{bl}: Gewicht des Futters vor Leaching (weight before leaching) in g

W_{al}: Gewicht des Futters nach Leaching (weight after leaching) in g

[5] Futteraufnahme (feed intake):

$$FI [g] = Foffered - (Funeaten * fleaching)$$

Foffered: Angebotene Futtermenge (feed offered) in g

Funeaten: Ungefressenes Futter (feed uneaten) in g

fleaching: Leaching-Faktor (factor leaching)

Die Futterumsatzrate (FCR) und die Tägliche Futteraufnahme (DFI) wurden mit den nachfolgenden Gleichungen berechnet:

[6] Futterumsatzrate (feed conversion ratio):

$$FCR = \frac{FI}{WG}$$

FI: Futteraufnahme (feed intake) in g

WG: Gewichtszunahme (weight gain) in g

[7] Tagliche Futteraufnahme (daily feed intake):

$$DFI \left[\frac{\%}{Tag} \right] = \frac{100 * FI * 2}{dur * (BW_{final} + BW_{initial})}$$

FI: Futteraufnahme (feed intake) in g

Mit den Daten aus dem Labor wurde der Trockensubstanzgehalt (DMC), der Rohaschegehalt (CAC), der Gesamtproteingehalt (TPC), der Gesamtfettgehalt (TFC) und der Kohlenhydratgehalt (CHC) ermittelt. Dies geschah mit den folgenden Gleichungen:

[8] Trockensubstanzgehalt (dry matter content):

$$\text{DMC [\%]} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} * 100$$

Rohwassergehalt (crude water content):

$$\text{CWC [\%]} = 100 - \text{DMC}$$

m1: Leermasse von Wageschälchen (mit getrocknetem Seesand und Glasstab) in g

m2: Masse von Wageschälchen (mit getrocknetem Seesand und Glasstab) und Probe vor der Trocknung in g

m3: Masse von Wageschälchen (mit getrocknetem Seesand und Glasstab) und Probe nach der Trocknung in g

[9] Rohaschegehalt (crude ash content):

$$\text{CAC [\%]} = \frac{m_2 - m_1}{E} * 100$$

m1: Masse der leeren Schale in g

m2: Masse der Schale und Probe nach der Veraschung in g

E: Probeneinwaage in g

[10] Gesamtproteingehalt (total protein content):

$$\text{TPC [\%]} = K * \text{TNC}$$

Gesamtstickstoffgehalt (total nitrogen content):

$$\text{TNC [\%]} = \frac{V_1 * T * 0,014 * 100}{m}$$

K: Stickstoff-Protein-Faktor (6,25)

V1: Salzsäureverbrauch in ml

T: Konzentration der Salzsäure in (mol / l) * t

m: Probeneinwaage in g

t: Titer

[11] Gesamtfettgehalt (total fat content):

$$\text{TFC [\%]} = \frac{m_2 - m_1}{E} * 100$$

m1: Masse des leeren, getrockneten Rundkolbens (mit Siedesteinchen) in g

m2: Masse des Rundkolbens (mit Siedesteinchen) mit Fett nach der Trocknung in g

E: Probeneinwaage

[12] Kohlenhydratgehalt (carbohydrate content):

$$\text{CHC [\%]} = 100 \% - \text{TPC} - \text{TFC} - \text{CAC} - (100 \% - \text{DMC})$$

TPC (total protein content): Gesamtproteingehalt in %

TFC (total fat content): Gesamtfettgehalt in %

CAC (crude ash content): Rohaschegehalt in %

DMC (dry matter content): Trockensubstanzgehalt in %

Mit den erhobenen Daten und den folgenden Gleichungen wurde der Brennwert/Bruttoenergiegehalt (GEC) ermittelt:

[13] Brennwert/Bruttoenergiegehalt (gross energy content):

$$\text{GEC [MJ / kg]} = \frac{EC}{m}$$

m: Probeneinwaage in mg

EC: Freigesetzte Energie (energy content) in J

Der Gesamtstickstoff- (TCC) und der Gesamtkohlenstoffgehalt (TNC) wurden mit den folgenden Gleichungen und den Ergebnissen aus dem Labor berechnet:

[14] Gesamtstickstoffgehalt (total nitrogen content):

$$\text{TNC [\%]} = \frac{ANC}{m \cdot 1000}$$

m: Probeneinwaage in mg

ANC: Absoluter Stickstoffgehalt der Probe (absolute nitrogen content) in μg

[15] Gesamtkohlenstoffgehalt (total carbon content):

$$\text{TCC [\%]} = \frac{ACC}{m \cdot 1000}$$

m: Probeneinwaage in mg

ACC: Absoluter Kohlenstoffgehalt der Probe (absolute carbon content) in μg

Methodik 4 Marktpotential von Lupinen in der Fischfuttermittel-Industrie.

Für die Studie über die sozio-ökonomischen Aspekte der Anwendung von Lupinen in der Aquakultur wurden mehrere, aufeinander aufbauende Analyseschritte durchgeführt, die verschiedene qualitative und quantitative sozialwissenschaftliche Methoden beinhalteten.

Zunächst wurden aus Gesprächen mit Projektpartnern und bestehenden Projektdokumentationen wesentliche Akteursgruppen, welche für das Forschungsvorhaben

des AWIs unmittelbar von besonderer Relevanz wären, identifiziert. In groben Zügen waren diese Stakeholder bereits bekannt, konkrete Ansprechpartner, die für die jeweilige Gruppe repräsentativ Auskunft erteilen konnten, mussten jedoch noch identifiziert werden. Somit bildet der Ausgangspunkt der vorliegenden Studie eine Ist-Analyse der verschiedenen Stakeholdergruppen (siehe Annex 1). Im Zuge dieser Datenerhebung sind grundlegende Verhältnisse und Rahmenbedingungen der Lupinenmehlproduktion sowie der Vertrieb im Allgemeinen und im Kontext der Futtermittelherstellung für die Aquakulturproduktion im Speziellen erfasst worden. Hierzu gehören u.a. neben der Ermittlung der Stakeholder der direkten Futtermittelhersteller auch Interessensverbände und verschiedene Vertriebskanäle, sowie Akteure aus dem Bereich der Forschung und Fischverarbeitung.

Nach der eher statischen Momentaufnahme der Ist-Analyse erfolgte in weiteren Schritten eine Clusteranalyse, um die Akteursgruppen zu ermitteln, welche besonders bedeutsam im Sinne eines Netzwerks für die mögliche Implementierung von Lupinenerzeugnisse in der Fischfutterentwicklung sind. Diese wurden dann entsprechend ihrer räumlichen Wirkungskategorien eingeordnet. Nachfolgend wurde in enger Absprache mit dem Auftraggeber der Studie ein spezifisch angepasster Online-Survey entwickelt und durchgeführt. Die Fragen sind in Deutsch sowie in englischer Sprache entwickelt worden und sind im Annex 2 und Annex 3 aufgeführt.

Zur Verifizierung der Ergebnisse dieser Erhebung wurden anschließend mit einigen Schlüsselrepräsentanten längere, vertiefende, semi-strukturierte Interviews geführt. Ein exemplarischer Fragenleitfaden ist im Annex 4 (deutsch) und Annex 5 (englisch) wiedergegeben. Als wesentlicher Kern der Studie erfolgte dann eine Einschätzung der Stärken und Schwächen sowie der Chancen und Risiken (SWOT-Analyse), die sich aus den gegebenen Bedingungen für den Einsatz von Lupinen in der Aquakultur ableiten lassen. Die Gesprächsprotokolle mit den Schlüsselakteuren ist in Stichpunkten im Annex 6 dargestellt. Diese wurden mit den Ergebnissen aus dem Online-Survey abgestimmt und hieraus Strategien und Handlungsfelder im Rahmen einer SWOT-Analyse abgeleitet. Bezugseinheit der SWOT-Analyse ist der deutsche Wirtschaftsraum mit den dort angesiedelten Unternehmen und Einrichtungen, die im Lupinen-Kontext tätig sind. Da Stärken und Schwächen sind immer relativ, nämlich im Vergleich zu anderen Produktformen (hier besonders Soja) zu sehen, erfolgt im Rahmen der graphischen Zusammenfassung der SWOT-Analyse (Annex 7) auch ein Bezug zu anderen Produkten. Obgleich die jeweiligen Analysen zu den bestimmenden Trends, den Stärken und Schwächen sowie den Bedarfen separat dargestellt werden, lassen sie sich nicht vollkommen losgelöst von einander betrachten, weshalb gelegentlich Querverweise eingefügt wurden.

Die SWOT-Analyse und die hieraus abgeleiteten Handlungsstrategien sollen den Auftraggeber die Möglichkeit bieten, abzuschätzen, wie die ermittelten Ergebnisse aus den Fütterungsversuchen in weiteren Schritten zur alternativen Eiweißproteinversorgung durch Lupinen in der Aquakultur in Deutschland herangeführt werden könnten. Der Ablauf der Studie ist schematisch in Abbildung 12 wiedergegeben.

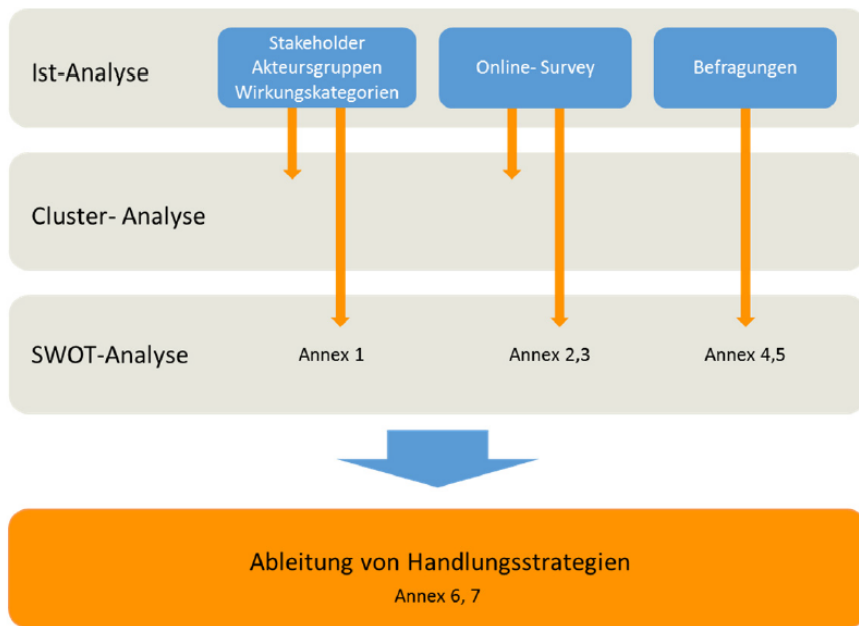


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Studienablaufs

Methodik 5: Bestimmung von durch pflanzliche Proteinquellen ausgelösten Dauerstress in Schuppen

Probenahme und Vorbereitung der Proben

Markierten Fischen jeden Tanks wurden zu Beginn des Experiments (D0) und am Ende des Experiments (D84) Schuppen zur weiteren Untersuchung entnommen. Die Fische wurden vor der Probenahme anästhesiert. Bei jeder Probenahme wurden Fischgewicht (g) und Gesamtlänge (cm) aufgezeichnet und zur Berechnung des Konditionsfaktors ($CF = W / L$) verwendet. Insgesamt wurden 40 ontogenetische Schuppen (OG) dorsal bis zur lateralen Linie von der linken Flanke jedes markierten Fisches an D0 bzw. D84 genommen. An D84 wurden 40 regenerierte Schuppen (RG) pro Fisch aus dem Körperbereich entnommen, der für die OG-Probenahme bei D0 verwendet wurde. Nach Aerts et al. (2015) wurde der Schleim entfernt und die Schuppen wurden mit Weichgewebe getrocknet, bevor sie bei 4 ° C gelagert wurden. Um eine mögliche Verunreinigung des Wassers und der Proben mit exogenen Glukokortikoiden (z. B. von der Hand) zu verhindern, wurden sowohl die Probenahmen als auch das Handling der Tiere mit Handschuhen durchgeführt.

Analyse der Glukokortikoide

Die Messung des Cortisol-Gehalts (pmol / Schuppe) von Fischen, die mit den verschiedenen experimentellen Futtermitteln gefüttert wurden (Fischmehlkontrolle (FM), Futtermittel, mit 15% Sojabohnenmehl (SM15), Futtermittel mit 15%, 30%, 50% und 65% unbehandeltem Lupinenmehl (LM) oder fermentiertem Lupinenmehl (FLM)), wurden im Labor der Arbeitsgruppe „Stress Physiology Research“ der Universität Gent, Belgien durchgeführt.

Die Schuppen wurden kleingeschnitten und mit Hilfe von PowerBead-Röhrchen (Keramik 2,8 mm, Qiagen) und eines Perlenbrechers (PowerLyzer 24, Qiagen) homogenisiert. Methanol mit HPLC-Reinheitsgrad wurde als Extraktionslösungsmittel verwendet. Die Reinigung wurde unter Verwendung von GracePure TM SPE C18-Max 500 mg / 6 ml Festphasen-Extraktionssäulen (SPE) durchgeführt. Nach der Resuspension wurde eine mit der Tandem-Massenspektrometrie (UPLC-MS / MS) gekoppelte Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie verwendet, um den Kortisol- und Wasserglukokortikoid-Maßstab zu quantifizieren. Das Profil wurde gemäß oder modifiziert von Aerts et al. (2015) verwendet.

Methodik 6: Bestimmung des Fett- und Aminosäureprofils unterschiedlicher Lupinenarten und -sorten bzw. Verarbeitungsstufen, der Futtermittel und der Fische

Probenahme und Vorbereitung der Proben

a) Futter

Am Ende des Versuchs wurden Proben von jedem Futtermittel entnommen. Die Futterpellets wurden mit einer Messermühle (Retsch, Grindomix GM 200) homogenisiert. Das zerkleinerte Pulver lagerte bis zur Analyse bei -25°C .

b) Fisch

Am Ende des Versuchs wurden drei Fische pro Futter / Behandlung zufällig entnommen, anästhesiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die gefrorenen Fischproben (ganzer Fisch) wurden gefriergetrocknet (Christ, Alpha 1-4 LSC), mit Hilfe einer Messermühle (Retsch, Grindomix GM 200) homogenisiert und bis zur Analyse bei -25°C gelagert.

Fettsäureextraktion und GC-Messungen

Die Fettsäureextraktion wurde in Duplikaten gepoolter Proben (gefriergetrockneter, homogenisierter Fisch- und Futterproben) der gleichen Behandlung durchgeführt (aus allen Replikaten pro Behandlung pro Phase wurde ein Pool hergestellt). Flüssige und feste Phasen wurden unabhängig voneinander analysiert. Die Lipidextraktion wurde nach Folch, Lees und Stanley (1957) in der von Koch (2012) und Wildförster (2014) modifizierten Form durchgeführt. Hierbei wurden 0,1 g der Probe in einem 12-ml-Kulturröhrchen mit Schraubverschluss eingewogen und 5 mg ml^{-1} oder $0,1\text{ mg ml}^{-1}$ des internen Standards FAME 23:0 (Methyltricosanoat, Sigma Aldrich, USA). wurden zu den festen bzw. flüssigen Phasen der Proben gegeben.

Dann wurden 2 ml Methanol (MeOH, Carl-Roth GmbH & Co. KG) -Dichlormethan (DCM, Carl-Roth GmbH & Co. KG)-Mischung (2: 1) (MeOH/DCM) hinzugefügt und die Probe wurde zugegeben, homogenisiert und zentrifugiert (2 min bei 2000 rpm). Im nächsten Schritt wurde die flüssige Phase der Probe mit einer Pasteurpipette in ein Trennkulturrohr überführt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die restliche feste Probe des ersten Röhrchens wurde entsorgt. Zu der erhaltenen flüssigen Phase wurden 2 ml 0,88%-ige KCl-Lösung gegeben. Die Probe wurde 30 Sekunden lang geschüttelt, mehrmals belüftet und zentrifugiert (5 Minuten bei 2000 U/min), um die untere Lipidphase mit einer Pasteur-Pipette in ein drittes Kulturrohr zu extrahieren, das zuvor gewogen und auf Dichtigkeit des Schraubverschlusses getestet wurde. Dieser Extraktionsschritt wurde zweimal wiederholt, wobei jeweils 2 ml DCM zugegeben wurden. Das Lösungsmittel wurde dann durch Verdampfen mit N_2 -Gas entfernt. Die restlichen Lipide wurden durch Zusatz von 500 ml n-Hexan und 2 ml Derivatisierungsreagenz (50 ml MeOH und 1,5 ml 96%-ige Schwefelsäure (Carl-Roth GmbH & Co. KG)) zur Derivatisierung vorbereitet.

Die Proben wurden über Nacht in einen Heizblock gestellt, 4 Stunden bei einer Temperatur von 80 ° C gehalten und dann auf Raumtemperatur (21 ° C) abgekühlt. Dann wurden 4 ml Milli-Q-gefiltertes Wasser zugegeben, mit 2 ml n-Hexan homogenisiert und zentrifugiert (2 min bei 2000 U/min), um die obere Phase der Probe in ein neues Kulturröhrchen zu trennen. Dieser Vorgang wurde zweimal mit 2 ml n-Hexan wiederholt. Wieder wurde das Lösungsmittel durch Verdampfen mit N₂ entfernt, bis zum Verbleib von 1 ml Volumen, dieser wurde dann in ein vorgewogenes Gaschromatographengefäß (GC) überführt. Die Lipide wurden in 1 ml n-Hexan gelöst und mit der GC gemessen. Die Fettsäureprofile beider Phasen wurden unter Verwendung eines GC-Agilent-Gaschromatographen 6890 N bestimmt, der mit einem Combi-PAL-Autosampler (CTC Analytics), einer SPB-1-Kapillarsäule 30 mx 0,25 mm x 0,1 & mgr; m (Agilent) und mit einem Split/Splitless-Injektor (75: 1 für feste Proben und splitless für flüssige Proben), unter Verwendung eines FAME-MIX-Standards (Supelco 37 Component FAME, Supelco) zur Peakidentifikation durch Vergleich der Retentionszeiten. Der Prozentsatz der einzelnen Fettsäuren wurde im Verhältnis zur Gesamtfläche des Chromatogramms und der gewichteten Probe berechnet.

Methodik 7: Bestimmung anti-nutritiver Substanzen in unterschiedlich behandelten (enzymatisch und thermisch) lupinen-basierten Futtermitteln, Lupinenarten und -sorten.

Phytinsäure-Messungen:

Die Messungen wurden nach Standardprotokollen des Labors für Marine Biotechnologie an der Hochschule für angewandte Wissenschaften in Bremerhaven (Deutschland) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und die Messungen wurden gemäß einem von Schlemmer et al. (2001; 2010) beschriebenen HPLC-Protokoll durchgeführt [1, 2], das an ein Pharmacia FPLC-System angepasst wurde, das mit einem LKB-Programmiergerät GP-250 Plus, zwei P-500-Pumpen, einer optischen UV-1-Einheit von Pharmacia LKB, einem Fraction Collector von Pharmacia LKB FRAC-100 und einem Pharmacia-Gradientenmischer ausgestattet war, LKB V / Hand-Injektionsventil (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Für die Datenerfassung wurde die Clarity Software (Version 4.04.987; DataApex; Prag, Tschechische Republik) verwendet.

Ein linearer Gradient wurde unter Verwendung von Salzsäure (0,5 ml / min, 30 min; LMA: 0,005 mol / l; LMB: 0,6 mol / l; Carl Roth GmbH, Deutschland) in ultrareinem Wasser (Thermo Scientific TKA ultra- Reinwassersystem MicroLab UV (Deutschland) auf einer MonoQ-Ionenaustauschersäule (5/50 GL, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden).

Zur Nachsäulenderivatisierung wurde das Elutionsmittel mit einer FeCl₃-Lösung (0,1 mol / l HCl, 0,1306 mmol / l FeCl₃, 0,125 mol / l NaCl, pH 1, Carl Roth GmbH, Deutschland) gemischt, die von einem T-Adapter (0,4 ml / min). Die Absorption wurde bei 280 nm gemessen.

Die Identifizierung von IP6 wurde entweder durch Standardaddition oder durch Vergleich des Elutionsprofils durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde eine Standardkurve erhalten, indem acht verschiedene IP6-Konzentrationen im Bereich von 0,02 - 1,5 g Phytinsäure / L (0,03 - 2,27 mmol / L; Sigma Aldrich, Deutschland) mehrfach gemessen wurden. Der Bestimmungskoeffizient betrug R² > 0,996 für die Standardkurve, und jede Probe oder jeder Standard wurde zweimal hergestellt und in Duplikaten gemessen.

Zur Probenvorbereitung wurden 2 g der Probe mit 20 ml Salzsäure (2,4% HCl) gemischt und 1 Stunde unter Rühren gekocht. Nach Zentrifugation (15000 U / min, Hettich, Universal 320R, Hettich, Deutschland) wurden 25 µl des Überstands auf die Säule aufgetragen.

Methodik 8: Bestimmung der in-vitro-Verdaulichkeit unterschiedlichen Lupinenarten und Sorten sowie Formulierung und Überprüfung eine Futtermittelrezeptur für Sander

Nach der pH-Stat Methode, beschrieben von Dimes & Haard (1994) wurde mittels Titration der Grad der Protein-Hydrolyse (DH %) bestimmt. Dazu wurden 10 ml einer Suspension aus der zu untersuchenden Proteinquelle (z.B. Lupinenmehl unbehandelt; Lupinenmehl thermisch behandelt) auf einen pH von 8,0 eingestellt und auf 37°C temperiert, bevor 1 ml des Enzymextrakts (Vorbereitung s. unten) aus den Verdauungstrakt des Fisches mit definierter Enzymaktivität (alkalische Protease, s. unten) hinzugegeben wurden. Durch die proteolytische Reaktion sinkt der pH im Reaktionsgefäß. Mittels eines automatischen Titrationsystems wurde der pH durch Zugabe von einer Standard-Natronlauge (0,02 NaOH) auf 8,0 stabilisiert. Das zugegebene Volumen der Natronlauge wurde 80 min lang aufgezeichnet, woraus sich das Hydrolyse-Äquivalent (h) ergibt. Der Grad der Protein-Hydrolyse (DH%) wurde folgend berechnet:

$$DH\% = (h/h_{\text{hot}}) \times 100$$

wobei h_{hot} die Gesamtzahl der Peptid-Bindungen in dem Protein ist. Diese wird über das Molekulargewicht der Aminosäuren-Reste bestimmt, welches man über die Aminosäuren-Zusammensetzung errechnen kann.

Alkalische Protease:

Zür Bestimmung der in-vitro Verdaulichkeit mithilfe der pH-Stat Methode muss im ersten Schritt die Enzymaktivität von alkalischen Proteasen in den Verdauungstrakten von Wolfsbarsch und Zander bestimmt werden (Alacron et al., 2002). Diese ist wichtig um für die pH-Stat Methode ein optimales Verhältnis von Enzymen zu Proteinquelle (Futtermittel, Futterrohstoff) zu haben. Die Aktivität der alkalischen Proteasen in dem Enzymextrakt der Verdauungsorgane wird mit der Casein Methode von Walter (1984) bestimmt. Dazu wird Enzymextrakt in 0,5 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 8,0; 25°C) gemischt und mit 0,5 ml Casein-Lösung für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird mit 0,5 ml 20%-iger Trichlor-Essigsäure gestoppt, die Reaktionsmischung zentrifugiert und über die Absorbanz des Überstandes bei 280 nm der Gehalt an freigesetztem Tyrosin bestimmt. Die Einheit (U) der Aktivität der alkalischen Protease ist definiert als 1 µg Tyrosin welches pro min freigesetzt wird. Zusätzlich wird noch die Zusammensetzung der proteolytischen Enzyme (Trypsin, Chymotrypsin, Peptidasen) in den Verdauungstrakten von Zander und Wolfsbarsch mithilfe photometrischen und fluorogener Methoden bestimmt.

Da keine Studien zu speziellen Futtermitteln für Zander existieren und die Ansprüche von Zander denen von Wolfsbarsch und Forelle ähneln, wurde die Futtermittelrezeptur mit Lupinen als Eiweißquelle basierend auf eigenen Erfahrungen und der Literatur (FAO, 2017, Glencross et al., 2011, Salini & Adams, 2014) durchgeführt. Eine Verifizierung der pH-Stat Methode für Zander erfolgte über den Vergleich der in-vitro Verdaulichkeit des Fischmehl-basiertem Versuchsfutters von Wolfsbarsch mit der von Zander. Das Potential der für Zander formulierten Futtermittelrezeptur erfolgt durch die Bestimmung der in-vitro Verdaulichkeit und den Vergleich mit dem Fischmehl-basiertem Futter.

3a. Methodische Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Wie im Projektantrag bereits vorgesehen wurden die relevanten Ergebnisse der Versuche regelmäßig mit dem **Lupinen-Netzwerk** und dessen Mitgliedern bei Vorträgen und über den Newsletter und den Internetauftritt kommuniziert. Dabei konnten vor allem bei den Treffen und Vorträgen Kontakte zu anderen Forschungseinrichtungen sowie zu Lupinenproduzenten und –verarbeitern (s. Anhang B) geknüpft werden. Dieser Austausch führte unter anderem dazu, dass weitere Untersuchungen wie die Lipidanalyse und die in-vitro Verdaulichkeit angestoßen wurden. Zudem konnten so weitere Lupinenarten und Produkte für die Analysen besorgt werden.

Ein Austausch mit Johan Aerts vom „**Institute for Agricultural and Fisheries Research**“ (**ILVO**) aus Belgien führte zu der Untersuchung von Dauerstress durch die Fütterung von pflanzlichen Proteinquellen mit der innovativen und präzisen Analyse des Cortisols in den Fischschuppen.

Für die Analyse der Aminosäuren- und Fettsäurezusammensetzung, sowie der Bestimmung des Gehalts an Phytinsäure in den Futtermitteln und Lupinenarten und –sorten kooperierte das AWI mit Prof. Dr. Stefan Wittke von der **Hochschule Bremerhaven**.

Zu Beginn der Versuche wurden die Fische an der Tierärztlichen Hochschule Hannover gesundheitlich untersucht. Die Sozioökonomische Analyse wurde wie geplant im Unterauftrag von **SeaKult** durchgeführt.

Wegen mangelnde Interesse Firmenseits kam eine angestrebte Zusammenarbeit mit der **Firma IBZ** (Herrn Boback) nicht zustande. Dies führte zu einer erheblichen Reduzierung der Analyse von Antinutritiven Substanzen.

4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die Zuwendung wurde für die Durchführung der einzelnen Arbeitsschritte, sowie für die Öffentlichkeitsdarstellungen innerhalb der Arbeitspakete verwendet.

Arbeitspaket 1 Futtermittelrezeptur und Nährstoffbedarf

Es wurden anhand von Daten der FAO (2017) und wissenschaftlichen Veröffentlichungen (Glencross et al. 2011, Kousoulaki et al. 2015) Futtermittelrezepturen (s. Tabelle) entworfen, die den Bedarf an Nährstoffen, wie Protein, Lipide, und Aminosäuren, für juvenile Wolfsbarsche abdeckt. Dabei wurde darauf geachtet mögliche Defizite durch eine ausgewogene Mischung von Rohstoffen auszugleichen um einen Einsatz von zugesetzten Aminosäuren zu vermeiden. In dem Projekt wurden 13 verschiedene Rezepturen mit Fischmehl (FM), unbehandelten Lupinenkernmehl (LM), fermentiertem Lupinenkernmehl (FLM), Lupinen-Proteinkonzentrat (LPC), Sojamehl (SM) und Soja-Proteinkonzentrat (SPC) formuliert (s. Tabelle).

Bei den auf Basis der Analysen der Lupinenrohstoffe berechneten Aminosäurezusammensetzung zeigte sich bei den Futtermitteln mit einem hohen Gehalt an Lupinenmehl in einigen essentiellen Aminosäuren leichte bis starke Defizite (s. Tabelle orange markiert).

Arbeitspaket 2 Entwicklung eines Verfahren zur Vorbehandlung von Lupinen (Schälung und Fermentation), Extrusion und Coating des Futters.

Im Projekt konnte gemeinsam mit dem Partner ttz Bremerhaven ein Prozess für die Herstellung von Wolfsbarschfutter aus Lupinenmehl und aus fermentiertem Lupinenmehl entwickelt

werden. Dabei wurde sowohl die Fermentation des Lupinenmehls (Pre-Processing), als auch spezifische Extrusionsprozesse, die Trocknung der verschiedenen Futtermittel (Main-Processing), die Herstellung verschiedener Coatings zur Maskierung des Wolfsbarschfutters und der Coatingprozess (Post-Processing) entwickelt. Dabei zeigte sich ein Einfluss des Lupinenmehls auf die Färbung der Pellets; je höher der Lupinenmehlgehalt, desto stärker ausgeprägt ist eine Gelbfärbung.

Für die Fermentation des Lupinenmehls wurde „Natuphos 5000 Combi L“ und „Natugrain TS L“ der Firma BASF verwendet. Hierfür wurde eine 1%ige Enzymlösung im Verhältnis 100 zu 30 (Mehlmasse zu Enzymlösung) auf das Mehl aufgebracht und die Mehlmasse in einem „MIWE Klimaschrank“ bei 37°C für 24 Stunden fermentiert. Im Anschluss konnte das fermentierte Lupinenmehl mit entsprechenden Komponenten zu einer rieselfähigen Vormischung vermengt werden. Bei der Extrusion war eine hohe Wasserzugabe bei Produkten mit nativem Lupinenmehl nötig. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf das spezifische Aminosäureprofil der Lupine. Es wurden drei verschiedene Hydrolysate auf Basis von Krill, Fischmehl und Tintenfisch für die Coating-Anwendung auf Fischfutter hergestellt. *Detaillierte Informationen zu den Prozessen und Ergebnissen sind unten (3a.) beschrieben.*

Arbeitspaket 3 Steigerung der Verdaulichkeit von Lupinenmehl für karnivore Fische durch enzymatischen Abbau unverdaulicher Bestandteile.

Zur Überprüfung der Eignung von Lupinenmehl für die karnivore Zielart Wolfsbarsch wurden verschiedene Futtermittel in drei Fütterungsversuchen in Bezug auf *Steigerung der Akzeptanz durch Coating (3a), Lupinenmehlgehalt und –vorbehandlung (3b) sowie Lupinenqualität (3c)* untersucht.

3a: Steigerung der Akzeptanz des Futters durch Aufbringen eines Coatings

Die ausgewählten Coatings sollten das Futter für die Fische attraktiver machen. Dazu wurden drei Hydrolysate von *Fischmehl, Krillmehl und Tintenfisch*, sowie *Fischöl* ausgewählt, da im Wasser lösliche Aminosäuren für Fische als Lockmittel dienen. Die Ergebnisse des ersten Fütterungsversuches zeigten, dass sich die Futteraufnahme/ Akzeptanz nicht signifikant durch eines der ausgewählten Coatings hat steigern lassen. Dennoch ist ein Trend zur verbesserten Futteraufnahme bei den Coatings *Fischöl* und *Krillhydrolysat* zu erkennen. Deshalb wurde entschieden, dass für die weiteren Fütterungsversuche *Fischöl*, welches produktionsbedingt zu einem Teil vor der Extrusion der Futtermischung beigemischt wird und zum anderen Teil nach der Extrusion gecoatet wird, als Coating zu verwenden.

3b: Effekte von Lupinenmehlgehalt und Vorbehandlung auf das Wachstum, die Futtermittelverwertung und die Verdauungsphysiologie getestet werden

In dem zweiten Fütterungsversuch zu Lupinenmehlgehalt und Vorbehandlung wurde Futter getestet, in welchem das Fischmehl aus dem Kontrollfutter stufenweise durch unbehandeltes oder fermentiertes Lupinenkernmehl ersetzt wurde. Nach 91 Tagen Versuchslaufzeit zeigte sich bei den Fischen mit 60 g kein Effekt der Fermentation auf das Wachstum und die Gesundheit der Fische. Dennoch konnte in einem kleinen Vorversuch über 53 Tage ein Effekt der Fermentation bei jüngeren Fischen (15 g Durchschnittsgewicht) auf Wachstum, Gesundheit und Futtermittelverwertung nachgewiesen werden. **Dies legt nahe, dass vor allem bei der Inklusion von Lupinenmehl in das Futter von jüngeren Fischen, eine vorherige Fermentation zum Abbau anti-nutritiver Substanzen, empfehlenswert ist.**

Obwohl kein Effekt der fermentierten Rohstoffe zu beobachten war, hatte der totale Lupinenmehlgehalt im Futter eine deutliche Auswirkung auf das Wachstum, die Gesundheit und die Futtermittelverwertung. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der

Wachstumsrate um die Hälfte bei dem höchsten Lupinenmehlgehalt von 65% im Futter (100% Fischmehlersatz, s.

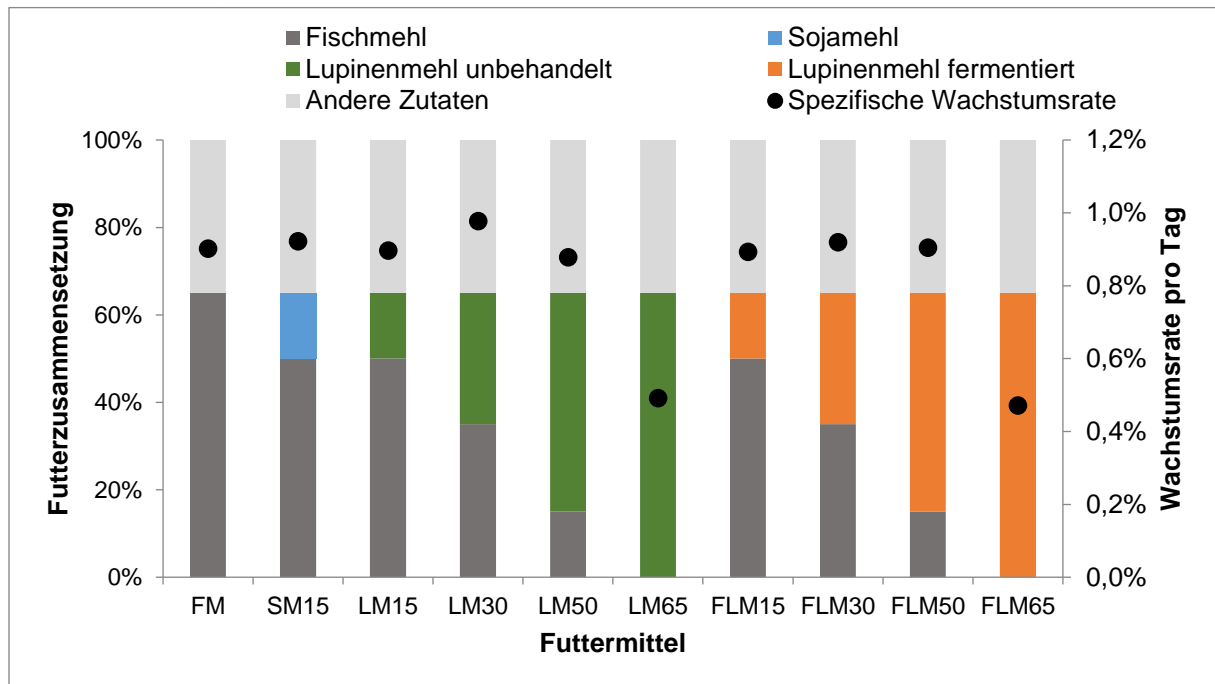


Abbildung 3: Bis zu einem Lupinenmehlgehalt von 50% waren keine negativen Auswirkungen auf Wachstum und Futterverwertung zu beobachten. Dennoch konnte bei den Gehalten von 50 und 65 % ein signifikant reduziertes Lebergewicht, sowie eine signifikant reduzierte Aktivität bei Protein und Lipid abbauenden Verdauungsenzymen festgestellt werden (s. Tabelle).

Histologische Untersuchungen von Darm und Leber zeigten keine Auswirkungen von Lupinenmehlgehalt und Fermentation.

Tabelle 5 Zusammenfassung der Ergebnisse bei unterschiedlichem Lupinenmehlgehalt

Lupinenmehlgehalt	30%	50%	65%
Spezifische Wachstumsrate	Normal	Normal	beeinträchtigt
Futterkonversion	Normal	Normal	beeinträchtigt
Proteolytische Enzymaktivität	Normal	beeinträchtigt	beeinträchtigt
Lipolytische Enzymaktivität	Normal	beeinträchtigt	beeinträchtigt
Hepato-Somatischer Index	Normal	beeinträchtigt	beeinträchtigt

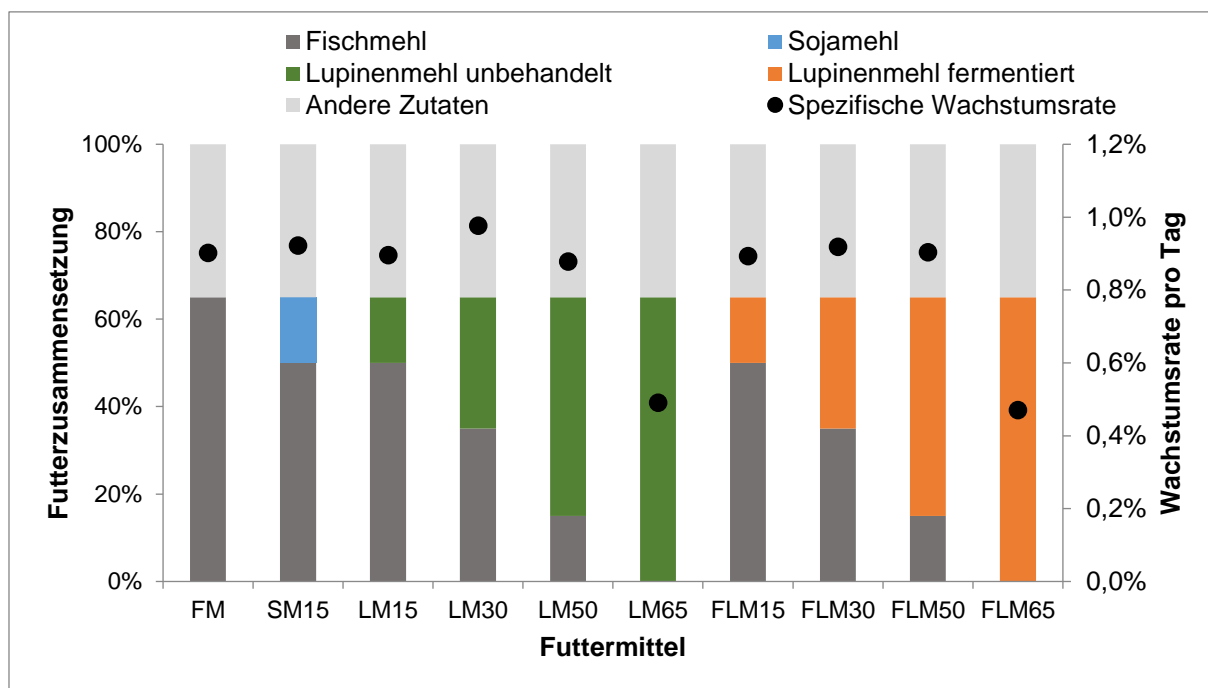


Abbildung 14 Zusammensetzung der getesteten Futtermittel (Balken) und Spezifische Wachstumsrate (% pro Tag, Punkte); Fischmehl (FM); Sojamehl (SM), Lupinenmehl unbehandelt (LM) und Lupinenmehl fermentiert (FLM)

3c: Effekt von Lupinenproteinqualität auf Wachstum, Futterverwertung und Gesundheit der Fische.

Im vorherigen Versuch (3b) wirkte sich der Abbau der antinutritiven Substanzen durch eine Fermentation bzw. die im Futter vorhandenen antinutritiven Substanzen nicht auf das Wachstum und die Gesundheit der Fische aus. Deshalb wurde das ursprüngliche Ziel, die Effekte der einzelnen Fermentationsenzyme zu untersuchen aufgegeben und stattdessen unbehandeltes Lupinenmehl und ein einfaches Proteinkonzentrat von Lupinen (Lupinen-Flakes von ProLupin) gegen Sojamehl und Soja-Proteinkonzentrat bei einem gesamten Gehalt von 50% im Futter getestet.

Wie im vorherigen Versuch, hatte der hohe Lupinengehalt (Mehl oder Konzentrat) im Futter im Vergleich zur Fischmehlkontrolle, wie auch zum meist in Fischfuttermitteln verwendeten Soja-Proteinkonzentrat, keine Auswirkungen auf das Wachstum. Dies untermauert die hervorragende Eignung von Lupinen als alternative Proteinquelle. Aufgrund ihres höheren Proteingehalts und der besseren Aminosäuren-Zusammensetzung (s. Tabelle) haben die

Lupinen-Flakes ein großes Potenzial als Futterrohstoff für Fische. Bei den Analysen der Plasmaparameter und der Aktivität der Verdauungsenzyme, sowie den histologischen Untersuchungen waren keine Unterschiede zwischen den Futtermitteln zu erkennen.

Arbeitspaket 4: Marktpotential von Lupinen in der Fischfuttermittel-Industrie.

Die Ergebnisse der Fütterungsversuche zeigen, dass Lupinenmehl eine nachhaltige und kostengünstigere Alternative zu Fischmehl, mit großem Potenzial für die Verwendung in der Aquakultur, ist. Ob auch relevante Akteure der deutschen Futtermittelindustrie dieses Potenzial erkennen und nutzen möchten wurde im Rahmen einer sozioökonomischen Analyse im **Unterauftrag von SeaKult** untersucht (*vollständiger Bericht im Anhang*). Dazu wurden relevante Akteure aus der Forschung, Verbänden, Futtermittelherstellung, Behörden, NGOs und anderen Gruppen befragt.

Dabei zeigte sich, dass über 63% der Befragten eine Ergänzung der aktuellen Eiweißquellen in Futtermitteln durch regional erzeugte Lupinen für sinnvoll halten, es dennoch Nachteile beim Einsatz von Lupinen als Rohstoff gibt. Diese Nachteile könnten durch die Nachhaltigkeit bei der Produktion und dem Rohstoff selbst aufgewogen werden, welche dem Großteil (80%) der Befragten als sehr wichtig bis wichtig erscheint.

Bei der Frage, wie sich tatsächlich in der Praxis Lupinenerzeugnisse in Futtermitteln verwenden lassen und auch betrieblich eingesetzt werden könnten, wurden tendenziell positive Einschätzungen geäußert und mögliche Handlungsketten aufgezeigt. Allerdings wurden von den Befragten auch ganz deutlich Ausschlusskriterien, wie ein zu geringes beständiges Angebot am Markt, sowie die schwankenden Erträge und Qualität der in Deutschland angebauten Lupinen, identifiziert. Dies hat zur Folge, dass sich viele Futtermittelhersteller lieber an etablierten Bezugsstrukturen von Soja orientieren.

Arbeitspaket 5: Bestimmung von durch pflanzliche Proteinquellen ausgelösten Dauerstress in Schuppen

Bei der Analyse des Cortisols in den Schuppen der Versuchsfische aus dem Fütterungsversuch zu Lupinenmehlgehalt und Vorbehandlung (s. 3b) zeigte sich, dass die mit dem Kontrollfutter (FM) gefütterten Fische tendenziell den niedrigsten Gehalt von Kortisol in den Schuppen hatte. Der steigende Lupinenmehlgehalt scheint den Kortisolspiegel in den Schuppen zu erhöhen, wobei hier anhand der hohen Abweichungen, deutlich zu sehen ist, dass die Fische individuell sehr unterschiedlich reagieren. Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass unbehandeltes Lupinenmehl mehr Stress induziert, als fermentiertes Lupinenmehl und Fischmehl (s. Abbildung).

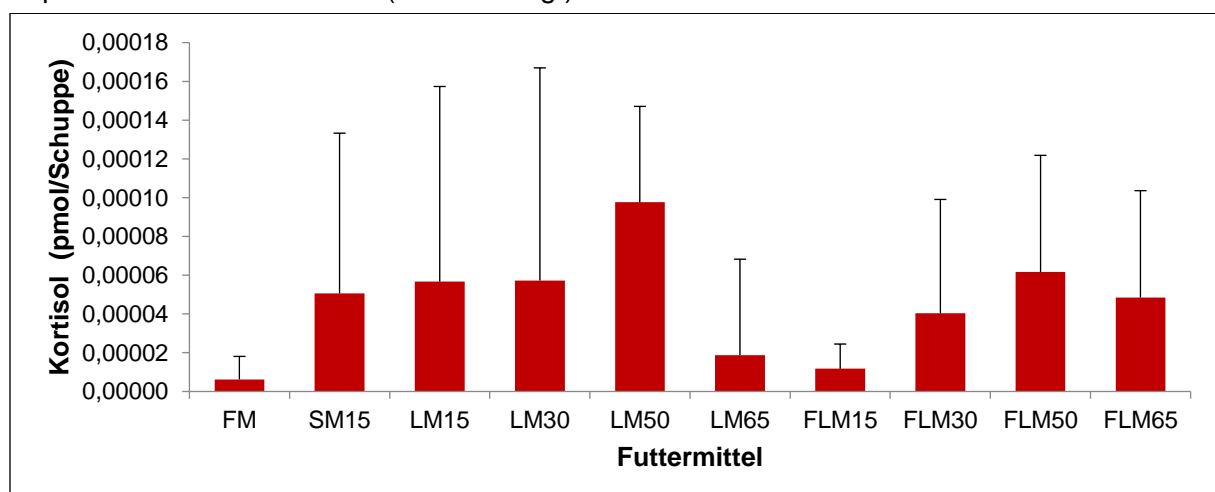


Abbildung 15 Kortisolgehalt (pmol/Schuppe) der verschiedenen Versuchsfuttermittel; Fischmehl-Kontrolle (FM), Futter mit einem Gehalt von 15% Sojamehl (SM15), 15 %, 30%, 50% und 65% unbehandeltem Lupinenmehl (LM) oder fermentiertem Lupinenmehl (FLM)

Im zweiten Teil der Kortisol-Analysen wurde die Schuppen nicht nur am Ende des Versuchs (t84 OG) beprobt, sondern auch zum Beginn des Versuchs (t0 OG), und die nachgewachsenen (regenerierten) Schuppen am Ende des Versuchs (t84 RG). Zu Beginn des Versuchs waren die Kortisol-Gehalte in den Schuppen gering und stiegen bei allen Futtermitteln über den Versuchszeitraum. Dabei führte im dritten Fütterungsversuch (3c) die Fütterung von Sojamehl (SM) und Lupinen-Protein-Konzentrat zu dem geringsten Kortisol-Anstieg (s. Abbildung).

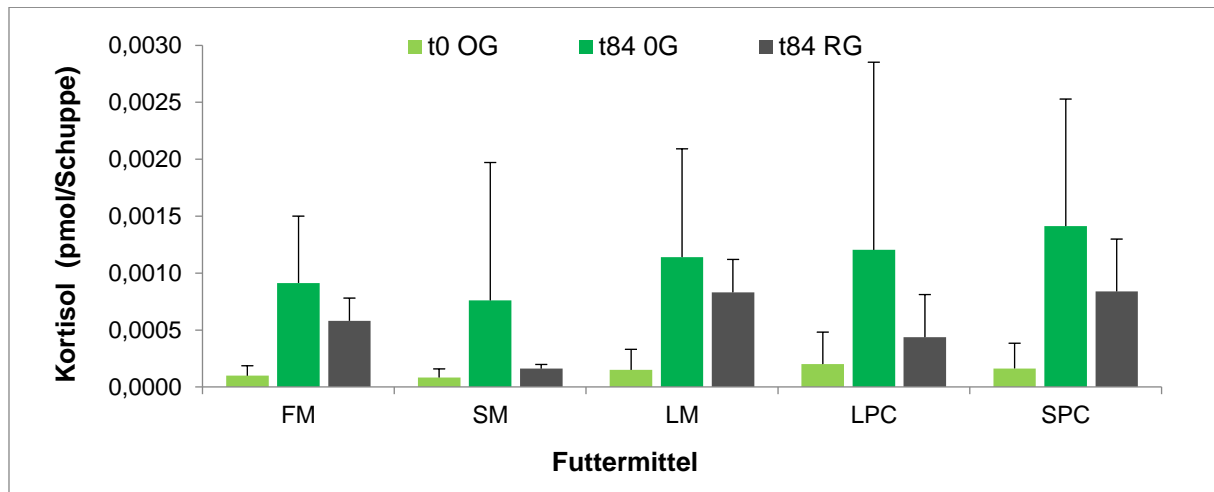


Abbildung 16 Kortisolgehalt (pmol/Schuppe) der verschiedenen Versuchsfuttermittel; Fischmehl-Kontrolle (FM), Sojamehl (SM), Lupinenmehl (LM), Lupinen-Protein-Konzentrat (LPC und Soja-Protein-Konzentrat (SPC)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bestimmung des Kortisol-Gehalts in den Schuppen ein innovativer Biomarker für chronischen Stress bei der Haltung und Fütterung von Aquakulturfischen ist. Für eine bessere Validierung der Stress-Effekte von Lupinenmehl auf Fische müssten, weitere Versuche mit einer längeren Versuchslaufzeit und mehr beprobten und genau identifizierten Fischen gemacht werden.

Arbeitspaket 6: Bestimmung des Fett- und Aminosäureprofils unterschiedlicher Lupinenarten und -sorten bzw. Verarbeitungsstufen, der Futtermittel und der Fische

Die Analyse der unterschiedlichen Lupinenarten und Sorten bzw. Verarbeitungsstufen zeigte große Schwankungen im Proteingehalt der blauen Lupine zwischen den verschiedenen Verarbeitungsstufen (s. Tabelle). Es ist zu erkennen, dass durch das Schälen oder Sieben der Lupine (weiße Lupine gesiebt, ganz und geschält) sowie durch die Herstellung der Flakes der Proteingehalt angehoben wird, durch Fermentation gesenkt wird, wenn der Wassergehalt nicht vor der Weiterverarbeitung reduziert wird (blaue Lupine geschält und fermentiert).

Die Analyse der Fettsäuren (s. Tabelle) in den Futtermitteln ergab eine gute Abdeckung des Bedarfs insbesondere bei der Linolsäure (C18:2) und der Tomnodonsäure (C20:5). Nur das Gehalt an Cevronsäure (C22:5) ist verhältnismäßig gering. Die Unterschiede in der Zusammensetzung des Futters spiegelt sich nicht im Fettsäurenprofil der Fische wieder (s. Tabelle), da diese einen geringen Teil essentieller Fettsäuren selbst synthetisieren und selektiv die Fettsäuren einlagern. Meeresfische wie Wolfsbarsch benötigen n-3-PUFA, um gutes Wachstum zu erzielen, wohingegen Süßwasserarten kein längerkettiges PUFA benötigen, aber Linolsäure. Enzymsysteme verlängern die Linolensäure, und bilden n-3-

PUFA, EPA und DHA mit längerer Kette, die für Stoffwechselfunktionen und Zellmembrankomponenten erforderlich sind. Die Zusammensetzung der Fettsäuren bei sämtliche Futtermitteln enthalten reichlich Linolsäure. Diese sind entsprechend für Süßwasserfische für ein gutes Wachstum und passendes Tierwohl mehr als ausreichend geeignet. Die Aminosäurezusammensetzung ist für ländliche Nutztiere auch gut geeignet, die bekannte reduziertes Vorhandensein an Methionin und Tryptophan sind erkennbar, sind aber nicht wachstumslimitierend bei Monogastrier bzw. können in formulierten Futtermitteln ausgeglichen werden. Bei den Fettsäuren ist das geringe Cevronsäure (C22:5) -gehalt möglicherweise auszugleichen mit Zugabe von anderen nachhaltigen Ölen. Diese Ergebnisse sind bei den zwei größten Mischfutterproduzenten Deutschlands präsentiert worden, um diese in die Praxis und in die angewandte Entwicklung zu bringen. Die erste Veröffentlichung der Gesamtergebnisse des Projekts ist für Mai 2019 im Fischmagazin freigegeben, es werden weitere, spezifische Veröffentlichungen zu Mischfutter angestrebt.

Tabelle 6 Analysierter Nährstoffgehalt (%) und Aminosäureprofil (g/100g) verschiedener Verarbeitungsstufen von Blauer Lupine und Weißer Lupine

	Blaue Lupine							Weiße Lupine		
	geschält ¹	fermen- tiert ¹	ganz ²	Flocken ³	getoastet 130 °C ²	getoastet 155 °C ²	getoastet ⁴	1 mm gesiebt ⁵	ganz ⁶	geschält ⁶
Nährstoffgehalt (%)										
Trockenmasse	91,3	70,3	84,5	86	86,1	86,8	90,9	89,6	88,1	88,1
Rohprotein	25,2	19,6	28	37,5	26,4	27,1	30,4	31	26,5	32,1
Rohfett	6,2	4,3	5,6	0,7	5,1	5,1	6,6	10	10,7	13,1
Rohfaser	18,2	15,2	4	32,8	6,3	7,7	13,7	10	11,3	2,4
Kohlenhydrate	38,4	28,6		12,4						
Rohasche	3,3	2,6	3,6	2,6	3,6	3,6	3,9	3,3	3,3	3,5
Phytinsäure	2,14		2,43	2,99	2,39	2,67	2,24	1,35		
Available P	1,04	0,8		1,63						
Aminosäuren (g/100g)										
Arginine	2,57	2,00		3,17						
Histidine	0,85	0,60		1,35						
Isoleucine	3,23	2,68		3,71						
Leucine	1,77	1,40		2,25						
Lysine	1,16	0,94		1,30						
Methionine	0,34	0,25		0,26						
Phenylalanine	1,12	0,93		1,20						
Threonine	0,99	0,73		1,28						
Tryptophan	0,18	0,13		0,23						
Valine	1,47	1,09		1,79						

¹Saatgutzucht Steinbach; Jahrgang 2014; in den Versuchen verwendet als Lupinenkernmehl

²Wanen Agrar, Jahrgang 2017;

³Lupinen-Flakes, ProLupin; in einem Versuch verwendet als Lupinen-Proteinkonzentrat

⁴Börde Kraftkorn; Jahrgang 2017

⁵Rickert; Jahrgang 2017

⁶Brotbüro; Jahrgang 2017

Tabelle 7 Futterzusammensetzung (g/kg), analysierter Nährstoffgehalt (%), Aminosäure- und Fettsäureprofil (g/100g) der in Projekt verwendeten Versuchsfuttermittel; Fischmehl (FM); Sojamehl (SM), Lupinenmehl unbehandelt (LM), Lupinenmehl fermentiert (FLM), Lupinen-Protein-Konzentrat (LPC und Soja Protein-Konzentrat (SPC)

	FM	SM	LM	SPC	LPC	FMK	SM15	FLM15	FLM30	FLM50	FLM65	LM15	LM30	LM50	LM65
Fischmehl Substitution (%)	0	75	75	75	75	0	25	25	50	75	100	25	50	75	100
Zusammensetzung (g/kg)															
Fischmehl	650	150	150	150	150	650	500	500	350	150	0	500	350	150	0
Fischöl	77	77	100	77	90	77	77	77	77	77	77	77	77	77	77
Lupinenmehl	0	0	500	0	0	0	0	150	300	500	650	0	0	0	0
Lupinenmehl fermentiert	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	150	300	500	650
Lupinenflakes	0	0	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sojamehl	0	500	0	0	0	0	150	0	0	0	0	0	0	0	0
Sojakonzentrat	0	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Weizengluten	20	155	0	155	150	20	65	65	110	155	190	65	110	155	190
Weizenstärke	177	87	180	87	79	177	147	147	117	87	52	147	117	87	52
Zellulose 10% of FM	65	20	59	20	20	65	50	50	35	20	20	50	35	20	20
Vitamin/Mineral-Premix	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Marker	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Nährstoffgehalt (%)															
Trockenmasse	96,0	96,2	95,6	95,6	96,2	95,6	95,5	95,8	95,2	95,0	95,1	96,3	96,5	96,5	96,3
Rohprotein	44,4	35,6	41,4	43,1	42,5	45,1	43,9	44,9	44,0	42,0	40,1	44,6	43,8	41,3	47,1
Rohfett	15,0	21,9	13,8	11,7	11,9	15,3	17,1	15,5	14,5	14,6	13,6	13,3	15,4	14,9	13,0
Kohlenhydrate	22,6	42,8	34,8	35,3	24,3										
Rohasche	14,0	6,1	5,4	6,9	6,2	14,3	11,5	11,4	9,2	5,9	3,4	10,1	8,0	5,8	2,5
Gesamt Energie MJ/kg	20,3	23,0	20,8	20,4	20,7	20,4	21,1	20,9	20,8	21,2	21,5	21,0	21,2	21,3	21,6
Phytinsäure						0,0	0,1			0,5				1,7	
Available P				0,5	1,3	2,2	1,8	1,8	1,5	1,0	0,7	1,8	1,4	0,9	0,5
Aminosäuren (g/100g)															
Arginine				0,8	2,4	2,6	2,6	2,5	2,3	2,1	2,0	2,4	2,2	1,8	1,6
Histidine				0,4	1,1	1,1	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7	1,0	0,9	0,7	0,6
Isoleucine				0,9	2,7	2,2	2,4	2,3	2,4	2,5	2,5	2,2	2,2	2,2	2,2
Leucine				2,3	3,4	3,6	3,6	3,5	3,5	3,2	3,0	3,5	3,3	3,0	2,8
Lysine				0,9	1,6	3,4	2,9	2,9	2,3	1,5	0,9	2,8	2,2	1,4	0,8
Methionine				0,5	0,6	1,4	1,2	1,2	0,9	0,6	0,4	1,2	0,9	0,6	0,4
Phenylalanine				1,0	1,6	2,0	2,0	1,8	1,7	1,5	1,4	1,8	1,7	1,4	1,3
Threonine				0,7	1,4	2,0	1,8	1,7	1,5	1,2	1,0	1,7	1,4	1,1	0,8
Tryptophan				0,2	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,1
Valine				1,0	1,8	2,4	2,4	2,2	2,0	1,7	1,4	2,2	1,9	1,5	1,2
Fettsäuren (g/100g)															
Linolsäure	12,99	55,10	20,95	10,03	11,23	10,05	22,48	6,41	2,26	18,27	7,17	13,76	15,92	20,76	21,83
Linolensäure	0,08	0,02	0,00	0,07	0,02	0,00	0,00	0,05	0,00	0,06	0,03	0,09	0,06	0,07	0,05
Tomnodonsäure (EPA)	3,62	2,55	1,90	2,15	2,10	4,61	4,41	2,27	0,67	3,82	1,21	4,64	4,17	4,05	3,08
Cevronsäure (DHA)	0,41	0,25	0,22	0,40	0,20	0,51	0,33	0,24	0,04	0,26	0,10	0,34	0,26	0,24	0,23

Tabelle 8 Analysierter Nährstoffgehalt (%) und Fettsäurenprofil (g/100g) der mit den jeweiligen Versuchsfuttermitteln gefütterten Fische am Versuchsende; Fischmehl (FM); Sojamehl (SM), Lupinenmehl unbehandelt (LM), Lupinenmehl fermentiert (FLM), Lupinen-Protein-Konzentrat (LPC und Soja-Protein-Konzentrat (SPC)

	FM	SM	LM	SPC	LPC	FMK	SM15	FLM15	FLM30	FLM50	FLM65	LM15	LM30	LM50	LM65
Fischmehl Substitution (%)	0	75	75	75	75	0	25	25	50	75	100	25	50	75	100
Nährstoffgehalt (%)															
Trockenmasse	98,1 ± 0,4	98,7 ± 0,4	98,6 ± 0,2	98,6 ± 0,6	98,7 ± 0,1	96,3 ± 0,8 ^a	97,2 ± 0,7 ^a	96,5 ± 0,9 ^a	96,4 ± 0,7 ^a	97,0 ± 0,4 ^a	94,8 ± 1,1 ^a	97,5 ± 0,2 ^a	97,1 ± 0,1 ^a	96,3 ± 0,3 ^a	95,3 ± 1,5 ^a
Rohprotein	36,4 ± 1,1	47,0 ± 1,7	44,1 ± 2,2	41,4 ± 6,5	40,0 ± 2,4	46,7 ± 2,7 ^a	43,8 ± 2,2 ^a	44,2 ± 3,0 ^a	47,6 ± 4,4 ^a	48,3 ± 2,6 ^a	43,1 ± 2,1 ^a	43,3 ± 2,4 ^a	46,2 ± 3,8 ^a	44,7 ± 2,4 ^a	45,5 ± 3,2 ^a
Rohfett	47,7 ± 3,7	41,7 ± 1,8	45,8 ± 3,5	46,3 ± 4,4	47,6 ± 2,2	39,0 ± 1,6	48,9 ± 1,8	26,1 ± 8,6	23,2 ± 15,6	37,3 ± 4,4	42,6 ± 3,2	25,8 ± 14,6	15,2 ± 2,3	26,2 ± 14,3	39,7 ± 8,2
Kohlenhydrate															
Rohasche	10,4 ± 0,9	8,6 ± 0,2	9,9 ± 1,2	10,5 ± 1,5	9,8 ± 0,5	9,3 ± 0,5 ^a	8,4 ± 0,5 ^a	10,0 ± 0,8 ^a	10,0 ± 0,8 ^a	11,1 ± 0,9 ^a	9,4 ± 1,2 ^a	8,7 ± 0,7 ^a	9,8 ± 0,8 ^a	9,3 ± 1,0 ^a	10,3 ± 2,7 ^a
Gesamt Energie MJ/kg Available P						24,6	25,4	26,3	24,9	24,8	24,5	25,8	25,4	25,5	22,1
Fettsäuren (g/100g)															
Linolsäure	12,99	55,10	20,95	10,03	11,23	10,05	22,48	6,41	2,26	18,27	7,17	13,76	15,92	20,76	21,83
Linolensäure	0,08	0,02	0,00	0,07	0,02	0,00	0,00	0,05	0,00	0,06	0,03	0,09	0,06	0,07	0,05
Tomnodonsäure (EPA)	3,62	2,55	1,90	2,15	2,10	4,61	4,41	2,27	0,67	3,82	1,21	4,64	4,17	4,05	3,08
Cevronsäure (DHA)	0,41	0,25	0,22	0,40	0,20	0,51	0,33	0,24	0,04	0,26	0,10	0,34	0,26	0,24	0,23

Arbeitspaket 7: Bestimmung anti-nutritiver Substanzen in unterschiedlich behandelten (enzymatisch und thermisch) lupinen-basierten Futtermitteln, Lupinenarten und -sorten.

Es sind mehrere antinutritive Substanzen in den Lupinen vorhanden (Raffinose, Stachyose, Cellulose, Hemicellulose/ Xylane und Phytinsäuren), von denen die Phytinsäure die schädlichste bei der Verwendung als Futtermittel ist, die am häufigsten vorkommt und einen Mineralverlust im gefütterten Tier bewirkt. Die angestrebte Zusammenarbeit mit der Firma IBZ (Herrn Boback) kam aufgrund von mangelndem Interesse der Firma nicht zustande. IBZ sollte die Bestimmung sämtlicher antinutritiver Substanzen in ihren eigenen Laboren vornehmen. Allerdings waren nur sehr geringe Sachmittel für die Bestimmung vorgesehen. So wurde für die Bestimmung der anti-nutritiven Substanzen die Phytinsäure als wichtigstes Beispiel genommen und an der Hochschule Bremerhaven bestimmt.

Bei den untersuchten Futtermitteln kann man deutlich erkennen, dass ohne pflanzliche Proteinquelle, in dem Kontrollfutter mit Fischmehl (FM) keine Phytinsäure enthalten war (s. Tabelle). Im zu 15 % Sojamehl enthaltenden Futter (SM15), sowie im Futter mit 50 % fermentiertem Lupinenmehl (FLM50) war nur wenig Phytinsäure enthalten. Im Vergleich zu dem Futter mit 50% unbehandeltem Lupinenmehl, welches mehr als dreimal so viel Phytinsäure wie FLM50 enthält, kann man deutlich sehen, dass die Fermentation Phytinsäure abgebaut hat. Dennoch hatte die im LM50 Futter enthaltene Phytinsäure keinen Einfluss auf das Wachstum der Versuchsfische.

Der Vergleich von verschieden behandelter Blauer Lupine kann man insbesondere bei der Blauer Lupine von Wanen Agrar erkennen, dass durch das Schälen der Kerne sich die Konzentration von Phytinsäure erhöht (s. Tabelle). Dahingegen im Vergleich von ganzer Lupine zu ganzen getoasteten Lupinen ist kein Effekt der Hitzebehandlung zu erkennen. Dies unterstützt die Werte aus den Futtermitteln, dass ein effektiver Abbau der Phytinsäure nur durch enzymatische Fermentation möglich ist.

Arbeitspaket 8: Bestimmung der in-vitro-Verdaulichkeit unterschiedlichen Lupinenarten und Sorten

Mithilfe der Enzymextrakte von Wolfsbarschen wurde die in-vitro-Verdaulichkeit von einigen Futterrohstoffen bestimmt. Die Enzymaktivität der alkalischen Proteasen in den Verdauungstrakten von Zander konnten wegen maschinellen Fehler und mangelnde Probenqualität nicht bestimmt werden. Casein wurde dabei als Kontrolle eingesetzt, da es auch für Fische eine hohe Verdaulichkeit aufweist. Die Werte für die anderen Futterrohstoffe sind in Prozent der in-vitro-Verdaulichkeit von Casein angegeben. Die Verdaulichkeiten der Futterrohstoffe sind im Vergleich zu Literaturangaben relativ gering, was auf verschiedene Faktoren, wie eine niedrige Temperatur (21°C) oder zu wenig Enzymaktivität im Extrakt, zurückzuführen sein könnten. Dennoch lassen sich in den erzielten Ergebnissen wertvolle Tendenzen in der Verdaulichkeit erkennen. Weitere Anpassungen der Methodik in Bezug auf Temperatur, Enzymaktivität im Ansatz, Protein-Enzymverhältnis und weiterer Faktoren, sind nötig um genauere Ergebnisse zur Verdaulichkeit zu bekommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die getoastete Blaue Lupine von Wanen-Agrar mit 62% eine deutlich bessere Verdaulichkeit als Fischmehl mit 35% hat. Die unbehandelte Blaue Lupine zeigte in der pH-Stat Methode nur eine geringe Verdaulichkeit von 4%, ebenso wie die Weiße Lupine mit nur 1% der Verdaulichkeit von Casein.

Die Werte aus der pH-Stat Methode spiegeln nicht genau die Ergebnisse aus den Fütterungsexperimenten wieder. Alle Futtermittel wurden von den Fischen sehr gut verwertet,

wobei das Fischmehlfutter kein besseres Ergebnis erzielte, wie die Ergebnisse der pH-Stat Methode vermuten lassen.

Dennoch kann man aus den Ergebnissen der pH-Stat Methode erkennen, dass eine Hitzebehandlung, wie sie von Wanen-Agrar für die Aufbereitung der Lupine als Rinderfutter durchgeführt wird, die Verdaulichkeit deutlich verbessert. Diese Ergebnisse zeigen somit das Potential der Hitzebehandlung der Lupinen für Monogastrier wie Schweine und Hühner auf.

5. Diskussion der Ergebnisse

Die in dem Projekt durchgeführten Arbeiten wurden bisher in dieser Form weltweit noch nicht durchgeführt. Versuche und weitere Ziele wurden auf Basis der im Projekt erworbenen und in der Literatur veröffentlichten Erkenntnisse angepasst und neu formuliert.

Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, Möglichkeiten zu finden, um die Lupine für die Herstellung von Fischfutter attraktiver zu machen. Hierzu wurden die Vermarktungschancen von Lupinen in der Fischfutterindustrie analysiert und Verfahren entwickelt werden, um die Verdaulichkeit und die Akzeptanz von Lupinenmehl für Fische zu verbessern. Durch deren hohen Innovationskraft und das Fehlen von vergleichbaren Projekten ist trotz positiver Ergebnisse aus Vergleichsuntersuchungen (z.B. Tabrett et al. 2012) ein wissenschaftlich-technisches und wirtschaftliches Risiko vorhanden. Das Futtermittel musste entsprechend des Nährstoffbedarfs, der Akzeptanz, Verdaulichkeit und Verwertbarkeit für die Fische und der technologischen Anforderungen der Futtermittelherstellung konzipiert werden. Hierbei zeigte sich, dass Forschungsfragen, wie die Verbesserung der Akzeptanz des Futters durch Coating ebenso wie positive Effekte durch eine spezifische Vorbehandlung durch Enzyme nicht eindeutig geklärt werden konnten. Dennoch waren die Ergebnisse nicht negativ, denn diese ermöglichen eine Reduzierung der Produktionskosten des Futters und machen Lupine noch attraktiver als alternative Futtermittelkomponente in der Aquakultur. Trotzdem war es notwendig, die Fische unter geeigneten und praxisrelevanten Bedingungen zu halten und zu füttern, um die Fütterungseffekte eindeutig zuordnen zu können. Unter diesen Umständen ergeben physiologische, histologische und immunologische Untersuchungen belastbare Ergebnisse über den Einsatz von Lupinenmehl als Futterzusatz. Diese komplexe Forschung, die auch einen zusätzlichen Personalaufwand bedeutet, verspricht zum einen generelle Ergebnisse zur Akzeptanz von Lupinenmehl bei Fischen in Aquakulturanlagen, zum anderen generiert sie wichtige Daten zur Wirkung des Lupinenmehls auf das Wachstum und Gesundheit bei Fischen. Derartige komplexe Studien in Zusammenarbeit mit den genannten Unterauftragnehmern sind von den beteiligten Forschungsinstitutionen ohne staatliche Förderung nicht durchführbar. Ein wissenschaftliches Risiko besteht auch in dem Fall, dass die eingesetzten Verfahren sich zwar als erfolgreich erweisen, aus Kostengründen aber keine wirtschaftliche Alternative zur Herstellung von konventionellen Futtermitteln darstellen. **In jedem Fall ist es sinnvoll durch die Zusammenarbeit des Alfred-Wegener-Instituts mit dem ttz Bremerhaven die strategische Forschung zur Futtermittelentwicklung in der Aquakultur mit entsprechender Kompetenz in Verfahrenstechnologie zu verknüpfen.**

Seit Antragstellung sind verschiedene Studien zur Fütterung von Wolfsbarschen und zur Nutzung und Optimierung von Lupinen für Fischfutter veröffentlicht worden. Kousoulaki et al. (2015) geben eine Übersicht darüber wie die Futterformulierung für Wolfsbarsche einer bestimmten Größe in Bezug auf die Pelletgröße, die analytischen Bestandteile (Rohprotein, Rohfett, Phosphorgehalt etc), Aminosäurenbedarf, Vitamin- und Mineralbedarf und verschiedener Futterrohstoffe (pflanzliches Protein, Kohlenhydrate) optimiert werden kann. Sekundäre Pflanzenstoffe, wie die aus Soja stammenden Saponine und Phytosterole können

das Wachstum und die Gesundheit von Fischen negativ beeinflussen, dennoch konnten Couto et al. in zwei Studien zeigen, dass sowohl juvenile (2015a), als auch heranwachsende Wolfsbarsche (2015b) von diesen nicht beeinträchtigt werden. Durch Fermentation von Lupinenmehl konnte die Menge an dieser anti-nutritiv wirkenden sekundären Pflanzenstoffen reduziert und das Aminosäureprofil verbessert werden und erfolgreich als Fischmehlersatz für Barramundi eingesetzt werden (Van Vo et al. 2015). Positiv wirkte sich außerdem der Zusatz von organischem Selen in Futter mit einem hohen Lupinenmehlgehalt auf das Wachstum, die Physiologie und Morphologie von Barramundi (Iham et al. 2016) aus. Ergebnisse einer Studie an Goldfischen und Doraden (Omnes et al. 2015) deuten auf strukturelle Anpassungen des Verdauungssystems an die Fütterung von Lupinenmehl hin, ohne eine Beeinträchtigung des Wachstums. Ein Problem bei der Futterformulierung ist der geringe Phosphorgehalt von Lupinenmehl, welcher bei Regenbogenforellen durch eine bessere Verwertung des Phosphors im Vergleich zu Soja und Fischmehl kompensiert wurde (Hernandez & Roman 2016). Zur Bestimmung der Verdaulichkeit des Proteins und der Energie in Futtermitteln für Barramundi haben Glencross et al. (2017) eine Nahinfrarot-Reflektionspektroskopie vorgestellt

6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Akzeptanz- und Wachstumsergebnisse deuten erstmal auf eine wirtschaftlich relevante mögliche Anwendung größerer Anteile preisgünstigem unbehandeltem Lupinenkernmehl oder Lupinen-Flakes in kommerziellen Futtermitteln für Wolfsbarsche hin. Diese als positiv zu bewertenden Ergebnisse wurden und werden weiterhin über die Projektveröffentlichungen sowie über die Outputs des Lupinen-Netzwerks an potentielle Nutzer sowie in Form von aufgezeigten Wertschöpfungsketten auch an Lupinenproduzenten und Verarbeiter kommuniziert. Die bisherigen Veröffentlichungen und Informationsveranstaltungen zu den Ergebnissen des Projektes haben erhebliches Interesse bei Deutschlands zwei größten Agrarhandelsfirmen geweckt. Diese beiden Unternehmen wurden bei einem Treffen in Bremerhaven über die Engpässe in der Wertschöpfungskette von Lupinenmehl sowie über die erhebliche Marktpotential als Futtermittelinhaltstoff informiert.

Hierbei ist herauszustellen, dass Lupinenmehl zum jetzigen Zeitpunkt weniger als €450 pro Tonne kostet (2019 Februar), dagegen kostet Fischmehl in Futterqualität (ex-Peru niedrige Aschegehalt) aktuell €1450 pro Tonne. Die Ergebnisse aus diesem Projekt zeigen, dass man 500 Gramm pro Kilo Fischmehl in Futter ersetzen kann ohne Wachstumsverluste bei Wolfsbarschen befürchten zu müssen. Nach den genannten Preisen ist mit Lupinenmehl so ein Ersparnis von €500 pro Tonne Fischfutter zu erzielen, ohne Produktionsverluste. Mit der Abschätzung des Potenzial von Lupinenmehl für Zander mittels der in-vitro Verdaulichkeit, kann das Potenzial der Lupine auch für den deutschen Aquakulturmarkt genutzt werden.

Die im Projekt gewonnenen Ergebnisse zeigen das große Potenzial der Lupine als alternative Proteinquelle für Fischfutter. Ein fast vollständiger Ersatz von Fischmehl ist durch Lupine allein ohne Einbußen im Wachstum und der Fischgesundheit nicht möglich. Eine Fermentation des Lupinenmehls ist aus wirtschaftlicher Sicht nur bei der Nutzung für sehr junge Fische sinnvoll, wohingegen bei älteren Wolfsbarschen bis mittleren Lupinenmehlgehalt im Futter keine negativen Auswirkungen zu beobachten waren. Proteinkonzentrate wie die Lupinen-Flakes von ProLupin haben gegenüber normalem Fischmehl den Vorteil des höheren Proteingehaltes und eines besseren Aminosäureprofils.

Damit die Lupine auch wirklich als alternative Proteinquelle in Fischfutter verarbeitet wird, müssen sich aus Sicht der Stakeholder (Fischfutterproduzenten, Forschung etc.) die Qualität und Menge der in Deutschland und Europa produzierten Lupinen deutlich steigern. Die Vorteile der nachhaltig und lokal produzierten Lupinen werden von den Stakeholdern klar erkannt und deren Nutzung auch erwünscht.

In Deutschland angebaute Lupine hat sowohl aus biologischer als auch aus wirtschaftlicher Sicht ein großes Potenzial als Alternative zu Fischmehl und Soja in Teilen in Fischfutter eingesetzt zu werden.

Alle Ergebnisse wurden und werden gemäß den DFG-Richtlinien für gutes wissenschaftliches Arbeiten in „peer-reviewed“ Journalen veröffentlicht und darüber hinaus in weiteren Medien bzw. in der Öffentlichkeit (Vorträge, Messen, Presse) dargestellt.

In Deutschland angebaute Lupine hat sowohl aus biologischer als auch aus wirtschaftlicher Sicht ein großes Potenzial als Alternative zu Fischmehl und Soja in Teilen in Fischfutter eingesetzt zu werden.

Alle Ergebnisse wurden und werden gemäß den DFG-Richtlinien für gutes wissenschaftliches Arbeiten in „peer-reviewed“ Journalen veröffentlicht und darüber hinaus in weiteren Medien bzw. in der Öffentlichkeit (Vorträge, Messen, Presse) dargestellt.

7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Ziel 1 Futtermittelrezeptur und Nährstoffbedarf

Bei einigen Rezepturen vor allem diejenigen mit sehr hohem Gehalt an Lupinenmehl zeigte sich eine mögliche leichte Defizite in einigen essentiellen Aminosäuren. Dennoch ist das Ziel eine bzw. mehrere vollständig nutritiv und ausgeglichene Futtermittel mit steigendem Lupineninhalt zu formulieren gut gelungen. Angesichts der Entwicklungen von spezialisierten und sehr effektiven Aminosäurezusatzstoffe für Aquafeeds während der Projektlaufzeit (z.B. Methionin Dimer Zusatzstoffe), wäre eine weiterführende Fragestellung, inwieweit eine Gezielte Supplementierung mit Aminosäuren die Formulierung verbessern, bzw. der Erfolg von einer Formulierung mit komplettem Ersatz von Fischmehl sichern könnte.

Ziel 2 Entwicklung eines Verfahren zur Vorbehandlung von Lupinen (Schälung und Fermentation), Extrusion und Coating des Futters.

Im Projekt konnte vom ttz Bremerhaven ein erfolgreicher Fermentierungsprozess und einfache bzw. kommerziell anwendbares Methodik für die Herstellung (Extrusion) von Wolfsbarschfutter aus Lupinenmehl und aus fermentiertem Lupinenmehl entwickelt werden.

Es wurden drei verschiedene Hydrolysate auf Basis von Krill, Fischmehl und Tintenfisch für die Coating-Anwendung auf Fischfutter erfolgreich hergestellt und angewendet. Siehe auch Ziele 3a unten. Die Anwendung von Hydrolysate um Futterakzeptanz zu steigern hat sich als weniger Erfolgreich als geplant erwiesen, daher die Entscheidung für eine einfacheres Coating

mit Fischöl. In Zukunft sollen / können andere Hydrolysate getestet werden. Denn diese zeigen durchaus erstaunliche Wirkung (pers. Obs.) wenn das für die Spezies genau passende Rezeptur gefunden wird. Hier bedarf es weitere und breitere Versuchsansätze.

Ziel 3 Steigerung der Verdaulichkeit von Lupinenmehl für karnivore Fische durch enzymatischen Abbau unverdaulicher Bestandteile.

Dieses zentrale Ziel des Projektes wurde mit vollem Energie gefolgt, sogar mit wiederholten Fütterungsversuchen, die Aufschlüsse über die Steigerung der Akzeptanz, Lupinenmehlgehalt und –vorbehandlung (bei Zwei Größenklassen der Tiere) sowie im Anschluss auch die Lupinenqualität (3c) liefern konnten.

Es wurde klar, dass die unbehandelte Lupine eine hervorragende Proteinquelle für Aquafeeds darstellt, egal ob „roh“, behandelt oder angereichert. Der Abbau antinutritiven Substanzen durch eine Fermentation bzw. die im Futter vorhandenen antinutritiven Substanzen keine Wirkung auf das Wachstum und die Gesundheit von Fischen über 15 g hat. Aus den Ergebnissen leitend ist ein Fokus weiterführende Fragestellung das Beprobung der gezielten Verbesserung der Verdaulichkeit von Lupinen bei Tieren unter 15 g. Weiterhin ist die Beprobung Lupinen in aquafeeds für andere, sehr wertvolle Arten in der Aquakultur z.B. Lachs und Shrimp (wird mit EU Förderung 2018/19 Umgesetzt) von großem Interesse.

Ziel 4 Marktpotential von Lupinen in der Fischfuttermittel-Industrie.

Die sozioökonomische Analyse die im Unterauftrag von SeaKult durchgeführt wurde, kontte erfolgreich umgesetzt werdeb und zeigte ein deutliches Interesse unter potentiellen Anwender und Anbieter, jedoch erhebliche Schwächen in der Produktions- bzw. Wertschöpfungskette für Lupine. Weiterführende Fragestellungen hier sollten auf die Erstellung zuverlässige Strukturen entlang der Wertschöpfungskette für Lupine um den Anbau bis zu Konsum zu fördern.

Ziel 5: Bestimmung von durch pflanzliche Proteinquellen ausgelösten Dauerstress in Schuppen

Die Bestimmung des Kortisol-Gehalts in den Schuppen wurde als eine innovative Methodik für chronischen Stress bei der Haltung und Fütterung von Aquakulturfischen vollständig getestet und bestätigt. Hierzu sind auch Methodikveröffentlichungen in Vorbereitung. Leider zeigt sich diese Bestimmung bzw. die entstehenden Daten genauso variabel und wenig Statistisch aussagekräftig wie die direkte Kortisolbestimmung in Blut/Plasma. Für eine bessere Validierung der Stress-Effekte von Lupinenmehl auf Fische müssten, weitere Versuche mit einer längeren Versuchslaufzeit mit genau identifizierten und womöglich mehrfachbeprobten Fischen umgesetzt werden.

Ziel 6: Bestimmung des Fett- und Aminosäureprofils unterschiedlicher Lupinenarten und -sorten bzw. Verarbeitungsstufen, der Futtermittel und der Fische

Dieses Ziel konnte auch vollständig umgesetzt werden, hierbei sind extreme Schwankungen zwischen verschiedenen Produkten und sogar zwischen Chargen oder Ernten festgestellt. Diese wirken nicht nur bei der Futterformulierung (siehe Ziel 1 sowie Ziel 3) sondern bei der kommerziellen Verwendung der Lupine bzw. die Ergebnisse des Projektes. Fragestellungen zur Sicherstellung der Produktqualität bzw. Stabilität sind weit außerhalb der Rahmen dieses Projektes dennoch sind sicherlich Untersuchungen zur Beimischungsmengen bzw. Batchbestimmung notwendig um kommerziell anwendbare Futterformulierungen zu entwickeln.

Ziel 7: Bestimmung anti-nutritiver Substanzen in unterschiedlich behandelten (enzymatisch und thermisch) lupinen-basierten Futtermitteln, Lupinenarten und -sorten.

Es war nicht möglich, in Zusammenarbeit mit der Firma IBZ, sämtliche anti-nutritiven Substanzen zu bestimmen. Dennoch wurde Phytinsäure als repräsentative Substanz unter den Antinutritiven bestimmt. Bei den untersuchten Futtermitteln kann man deutlich erkennen, dass ohne pflanzliche Proteinquelle, in dem Kontrollfutter mit Fischmehl (FM) keine Phytinsäure enthalten war (s. Tabelle). Im zu 15 % Sojamehl enthaltenden Futter (SM15), sowie im Futter mit 50 % fermentiertem Lupinenmehl (FLM50) war nur wenig Phytinsäure enthalten. Im Vergleich zu dem Futter mit 50% unbehandeltem Lupinenmehl, welches mehr als dreimal so viel Phytinsäure wie FLM50 enthält, kann man deutlich sehen, dass die Fermentation Phytinsäure abgebaut hat. Dennoch hatte die im LM50 Futter enthaltene Phytinsäure keinen Einfluss auf das Wachstum der Versuchsfische.

Der Vergleich von verschieden behandelte Blauen Lupine kann man insbesondere bei der Blauen Lupine von Wanen Agrar erkennen, dass durch das Schälen der Kerne sich die Konzentration von Phytinsäure erhöht (s. Tabelle). Dahingegen im Vergleich von ganzer Lupine zu ganzen getoasteten Lupinen ist kein Effekt der Hitzebehandlung zu erkennen. Dies unterstützt die Werte aus den Futtermitteln, dass ein effektiver Abbau der Phytinsäure nur durch enzymatische Fermentation möglich ist.

Ziel 8: Bestimmung der in-vitro-Verdaulichkeit unterschiedlichen Lupinenarten und Sorten

Mithilfe der Enzymextrakte von Wolfsbarschen wurde die in-vitro-Verdaulichkeit von einigen Futterrohstoffen bestimmt. Jedoch ist die Bestimmung mit Zanderenzymen fehlgeschlagen. Casein wurde dabei als Kontrolle als Kontrolle eingesetzt, da es auch für Fische eine hohe Verdaulichkeit aufweist. Die Werte für die anderen Futterrohstoffe sind in Prozent der in-vitro-Verdaulichkeit von Casein angegeben. Die Verdaulichkeiten der Futterrohstoffe waren im Vergleich zu Literaturangaben relativ gering, was auf verschiedene Faktoren, wie eine niedrige Temperatur (21°C) oder zu wenig Enzymaktivität im Extrakt, zurückzuführen sein könnten. Dennoch lassen sich in den erzielten Ergebnissen wertvolle Tendenzen in der Verdaulichkeit erkennen. Weitere Anpassungen der Methodik in Bezug auf Temperatur, Enzymaktivität im Ansatz, Protein-Enzymverhältnis und weiterer Faktoren, sind nötig um genauere Ergebnisse zur Verdaulichkeit zu bekommen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die getoastete Blaue Lupine von Wanen-Agrar mit 62% eine deutlich bessere Verdaulichkeit als Fischmehl mit 35% hat. Die unbehandelte Blaue Lupine zeigte in der pH-Stat Methode nur eine geringe Verdaulichkeit von 4%, ebenso wie die Weiße Lupine mit nur 1% der Verdaulichkeit von Casein.

Die Werte aus der pH-Stat Methode spiegeln nicht die Ergebnisse aus den Fütterungsexperimenten wieder. Alle Futtermittel wurden von den Fischen sehr gut verwertet, wobei das Fischmehlfutter kein besseres Ergebnis erzielte, wie die Ergebnisse der pH-Stat Methode vermuten lassen.

Dennoch kann man aus den Ergebnissen der pH-Stat Methode erkennen, dass eine Hitzebehandlung, wie sie von Wanen-Agrar für die Aufbereitung der Lupine als Rinderfutter durchgeführt wird, die Verdaulichkeit deutlich verbessert. Diese Ergebnisse zeigen somit das Potential der Hitzebehandlung der Lupinen für Monogastrier wie Schweine und Hühner auf (s. oben unter Ergebnisse).

8. Zusammenfassung

Das Projekt "Optimierung von Lupinenmehl für die Aquakultur" (OLA) zielte auf eine ausführliche Prüfung der Möglichkeiten einer erfolgreichen Anwendung von Lupine aus ökologischem Anbau in Futtermitteln für die Aquakultur. Innerhalb des Projekts wurde nicht nur die Anwendung von Lupine in Futtermitteln untersucht, sondern auch die Aufarbeitung des Rohprodukts, die Verbesserung der Akzeptanz und Verdaulichkeit, die Auswirkung auf das Wachstum, sowie die Immun- und Stress Antwort der gemästeten Tiere. Hierzu arbeiteten die Projektpartner des Alfred-Wegener-Instituts (AWI) und des ttz Bremerhaven eng zusammen. Das ttz war für die Aufarbeitung der Rohstoffe sowie deren Umsetzung in extrudiertes und gecoatetes Futter zuständig, das vom AWI in Fütterungsversuchen und weiteren Laboruntersuchungen getestet wurde. Des Weiteren wurden (im Unterauftrag durch die Firma Seakult) die Hindernisse entlang der Wertschöpfungskette ausführlich in sozio-ökonomischen Betrachtungen mit Stakeholdern aus Produktion, Agrarhandel und verarbeitenden Industrien untersucht. Es konnten alle Arbeiten erfolgreich umgesetzt werden.

Eine Behandlung der Lupine zeigte sich in den Fütterungsversuchen als wirkungslos beim Mastfisch. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Behandlung der Lupinen in Futtermitteln für kleinere Fische durchaus von Vorteil ist. Bei kleineren Tieren hatte die Fermentation eine signifikant positive Wirkung auf das Wachstum. Enzymatische Analysen zeigten eine signifikante Beeinträchtigung der Verdauungsenzyme durch Lupine. In vitro Verdaulichkeitsprüfungen zeigten, dass ein Toastingverfahren eine wesentliche Verbesserung der Verdaulichkeit der Proteine bewirkt. Insgesamt ist dann für sensiblere Tiere und frühe Lebensstadien eine Behandlung der Lupine mit Enzymen oder Hitze zu empfehlen, jedoch bei Masttieren unnötig und kostspielig.

Die vom AWI durchgeführten Futtermittel Tests zeigten das ein Futter mit 50% Lupine vergleichbare Wachstumsraten wie ein Futtermittel mit 65% Fischmehl erreicht. Dadurch ist auch eine finanzielle Ersparnis von €500 Euro pro Tonne Futtermittel möglich. Weitere Tests mit Lupinenkonzentrat gegen Sojakonzentrat zeigten auch ähnlich positive Ergebnisse. Dadurch ist klar abzuleiten, dass die Lupine aus ökologischen Anbau eine nachhaltige und kostengünstige Alternative zu Fisch- und Sojamehl in Futtermitteln für die Aquakultur darstellt. Jedoch muss das Produkt verfügbar sein bzw. muss die komplette Wertschöpfungskette und Lieferkette vorhanden sein bevor marktreife Futtermittel aus Lupine erzeugt werden können.

Die in der sozioökonomischen Untersuchung zum Einsatz von Lupinenmehl als Bestandteil von Futtermitteln in der Aquakultur durchgeführten Stakeholderanalysen zeigten eine grundsätzliche positive Bewertung von Lupinen aus ökologischen Landbau als sinnvollen Futtermittelinhaltstoff. Es waren mehrere Partner an einer Anwendung von Lupine interessiert und das Interesse an Informationsveranstaltungen war sehr hoch. Die Stakeholder äußerten aber Bedenken über die Umsetzbarkeit des Vorhabens auf kommerzieller Ebene. Am häufigsten wurden von größeren Abnehmern Schwankungen bei Angebot, Qualität und Zusammensetzung als Ausschlusskriterium wahrgenommen. Diese Ergebnisse konnten an die wichtigsten Stakeholder getragen werden. Das Projekt und seine Ergebnisse konnten in den verschiedensten Foren präsentiert werden. Von internationalen wissenschaftlichen

Konferenzen bis hin zur Internationalen Grünen Woche in Berlin, 2018.

9. Literaturverzeichnis

Aerts, J., Metz, J.R., Ampe, B., Decostere, A., Flik, G., De Saeger, S., 2015. Scales tell a story on the stress history of fish. PLoS One 10, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123411>.

Afinah S, Yazid AM, Anis Shobirin MH, Shuhaimi M (2010) Phytase: application in food industry. International Food Research Journal 17:13-21.

Ai Q, Mai K, Zhang W, Xu W, Tan B, Zhang C, Li H (2007) Effects of exogenous enzymes (phytase, non-starch polysaccharide enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorous excretion of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 147:502-508.

Brenes A, Slominski BA, Marquardt RR, Guenter W, Viveros A (2003) Effect of enzyme addition on the digestibilities of cell wall polysaccharides and oligosaccharides from whole, dehulled, and ethanol-extracted white lupins in chicken. Poultry Science 82:1761-1725.

Carter, C. G. and R. C. Hauler (2000). "Fish meal replacement by plant meals in extruded feeds for Atlantic salmon, *Salmo salar* L." Aquaculture 185(3-4): 299-311.

Couto, A., et al. (2015a). "Saponins and phytosterols in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: effects on growth, intestinal morphology and physiology." Aquaculture Nutrition 21(2): 180-193.

Couto, A., et al. (2015b). "Dietary saponins and phytosterols do not affect growth, intestinal morphology and immune response of on-growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." Aquaculture Nutrition 21(6): 970-982.

FAO (2017) Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System - European seabass - *Dicentrarchus labrax*. <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/european-seabass/european-seabass-home/en/>. 19.12.2017 13:33

FAO (2010) The state of world fisheries and aquaculture - SOFIA. FAO Fisheries and Aquaculture Department, Rome pp 218

Forum Bio- und Gentechnologie e.V. (2014) Sojabohne. Die transGEN-Datenbank. <http://www.transgen.de/datenbank/pflanzen/67.sojabohne.html>. 15.04.2014, 09:48

Gatesoupe, F.-J., et al. (2014). "The effects of dietary carbohydrate sources and forms on metabolic response and intestinal microbiota in sea bass juveniles, *Dicentrarchus labrax*."

Aquaculture 422-423: 47-53.

Gatlin III DM, Barrows FT, Brown P, Dabrowski K, Gaylord TG, Hardy RW, Herman E, Hu G, Krogdahl A, Nelson R, Overturf K, Rust M, Sealey W, Skonberg D, Souza EJ, Stone D, Wilson R, Wurtele E (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research* 38:551-579.

Glencross, B., et al. (2017). "Using near-infrared reflectance spectroscopy to predict the digestible protein and digestible energy values of diets when fed to barramundi, *Lates calcarifer*." *Aquaculture Nutrition* 23(2): 397-405.

Glencross B, Rutherford N, Hawkins W (2011) A comparison of the growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) when fed soybean, narrow-leaf or yellow lupin meals in extruded diets. *Aquaculture Nutrition* 17:e317-e325.

Glencross BD, Booth M, Allan GL (2007) A feed is only as good as its ingredients – a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquaculture Nutrition* 13:17-34.

Glencross, B. D., et al. (2004b). "A comparison of the digestibility of a range of lupin and soybean protein products when fed to either Atlantic salmon (*Salmo salar*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquaculture* 237(1-4): 333-346.

Glencross, B., et al. (2003). "Evaluation of the variability in chemical composition and digestibility of different lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel meals when fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Animal Feed Science and Technology* 107(1-4): 117-128.

Glencross, B., et al. (2004a). "Evaluation of dietary inclusion of yellow lupin (*Lupinus luteus*) kernel meal on the growth, feed utilisation and tissue histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquaculture* 235(1-4): 411-422.

Hernandez, A. J. and D. Roman (2016). "Phosphorus and nitrogen utilization efficiency in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with lupin (*Lupinus albus*) or soybean (*Glycine max*) meals as partial replacements to fish meal." *Czech Journal of Animal Science* 61(2): 67-74.

Kousoulaki, K., et al. (2015). "Review on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) nutrition and feed management: a practical guide for optimizing feed formulation and farming protocols." *Aquaculture Nutrition* 21(2): 129-151.

Iham, et al. (2016). "Effects of organic selenium supplementation on growth, glutathione peroxidase activity and histopathology in juvenile barramundi (*Lates calcarifer* Bloch 1970) fed high lupin meal-based diets." *Aquaculture* 457: 15-23.

Jackson A (2012) Fishmeal and fish oil and its role in sustainable aquaculture. *International Aquafeed* 15:18-21.

Omnes, M. H., et al. (2015). "Influence of lupin and rapeseed meals on the integrity of digestive tract and organs in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and goldfish (*Carassius auratus* L.) juveniles." *Aquaculture Nutrition* 21(2): 223-233.

Salini, M. J. and L. R. Adams (2014). "Growth performance, nutrient utilisation and digestibility by Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed Tasmanian grown white (*Lupinus albus*) and narrow-leaved (*L. angustifolius*) lupins." *Aquaculture* 426-427: 296-303.

Serrano E, Storebakken T, Penn M, Landsverk T, Hansen JO, Mydland LT (2008) Responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to increasing dietary dose of lupine alkaloid. In Palta JA and Berger JB (eds) *Lupins for health and wealth. Proceedings of the 12th International Lupin Conference, 14-18 Sept. 2008, Fremantle, Western Australia.* International Lupin Association. Canterbury, New Zealand.

Tabrett, S., et al. (2012). "Digestibility of *Lupinus albus* lupin meals in barramundi (*Lates calcarifer*)." *Aquaculture* **364-365**: 1-5.

Van Vo, B., et al. (2015). "Optimized fermented lupin (*Lupinus angustifolius*) inclusion in juvenile barramundi (*Lates calcarifer*) diets." *Aquaculture* 444: 62-69.

10. Übersicht erfolgte und geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

In der Projektlaufzeit von insgesamt 33 Monaten wurden die Ergebnisse in Fachkonferenzen/Vorträgen, Abschlussarbeiten, Artikeln in Fachzeitschriften, Newsletter und in Internet-Artikeln, veröffentlicht.

Vorträge:

- Zeytin, S., Aerts, J., Hörterer, C. and Slater, M. J. (2017) Chronic Stress Effect of High Levels of Lupine Meal Inclusion in Diets Revealed by Scale Cortisol in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquaculture Europe 17, Dubrovnik, Croatia, 17. – 20. Oktober 2017.
- Hörterer, C. (2017) Vom Feld in den Fisch - Lupinen in Futtermitteln in der Aquakultur, 7. Eiweißpflanzen-Workshop, Bad Bernburg, 23 May 2017
- Hoerterer, C., Zeytin, S., Weiss, M. and Slater, M. J. (2016) Lupine Meal as Primary Protein Source in Diets for European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture Europe 16, Edinburgh, Scotland, 20. – 23. September 2016.
- Hörterer, C. and Weiss, M. (2016) Vom Feld in den Fisch – Lupine für den Wolfsbarsch,
- Slater, M. J. BMBF/BMEL Fachbeirat Fisch, Berlin 29. März 2017.
- Hoerterer, C., Zeytin, S., Fitzel, T. and Slater, M. J. Berlin Lupinennetzwerk BMEL Leguminosen Tag 31. Oktober 2016

Abschlussarbeiten:

- Enno Fricke (2016) Dehulled Lupin Seed Meal as a Feed Supplement for the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). Masterarbeit. Universität Bremen
- Philip Just (2016) Lupine meal as a potential protein source for the diet of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Masterarbeit. Universität Bremen
- Dennis Jäsche (2018) Effekt verschiedener Lupinenkernmehlfractionen (*Lupinus angustifolius*) auf die Wachstumsperformance Europäischer Wolfsbarsche (*Dicentrarchus labrax*). Bachelorarbeit. Hochschule Bremerhaven
- Susanne Renken (2018) Einfluss der Blauen Süßlupine (*Lupinus angustifolius*) als alternative Proteinquelle im Fischfutter bei Anzucht des Europäischen Wolfsbarsches (*Dicentrarchus labrax*): Histologie und Wachstumsperformance. Masterarbeit. Hochschule Bremerhaven (in Bearbeitung)

Zeitschriften:

- *Lupinen bieten nachhaltige Alternative zu Soja*, von Nina Weiler (im Auftrag der BLE). Mühle + Mischfutter. 154. Jahrgang. Heft 2.19. Januar 2017
- *Raubfische lassen sich mit Lupinen großziehen*. von Nina Weiler (im Auftrag der BLE). Fischmagazin 12 / 2016

Internet:

- Lupinen in der Aquakultur. von Christina Hörterer; Alfred-Wegener-Institut, Helmholtz-Zentrum für Polar- und Meeresforschung. Lupinennetzwerk: Newsletter und [Internetseite](#). Mai/Juni 2017.
- *Auf der Suche nach Fischmehlersatzstoffen*. von Nina Weiler (im Auftrag der BLE). Pflanzenforschung.de 06.12.2016

- *Lupinenmehl ist nachhaltige und günstige Alternative zu Fischmehl im Fischfutter.* Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung. [Internetseite](#). 23. November 2016
- *Fischfutter: Lupinenmehl ist Alternative zu Fischmehl.* Presseinformation BLE-Pressestelle. Bonn, 18. November 2016

Desweiteren sind noch Veröffentlichungen als wissenschaftlichen Artikel geplant, die Ergebnisse folgender Teile aufgreifen.

- Fricke, E.*; Saborowski R., Weiß M., Hoerterer C., Zeytin S., Slater M. J., Fitzel T. *Growth and digestive characteristics of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed untreated and fermented lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel meal.* Submitted Manuscript – Aquaculture Nutrition
- *Steigerung der Akzeptanz des Futters durch Aufbringen eines Coatings. Arbeitstitel*
- *Effekte von Lupinenmehlgehalt und Vorbehandlung auf das Wachstum, die Futtermittelverwertung und die Verdauungsphysiologie getestet werden. Arbeitstitel*
- *Effekt von Lupinenproteinqualität auf Wachstum, Futtermittelverwertung und Gesundheit der Fische. Arbeitstitel*
- *Bestimmung von durch pflanzliche Proteinquellen ausgelösten Dauerstress in Schuppen. Arbeitstitel*