
Untersuchungen zum Einfluss einer Mikroorganismen-
Mischung als Fischmehl- und Fischölalternative in Mastfutter
für Speisefische – Vergleich von Regenbogenforelle
(*Oncorhynchus mykiss*) und Zander (*Sander lucioperca*) aus
deutscher Aquakultur

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg,
Hamburg School of Food Science

vorgelegt von
Michaela Janine Schafberg

Hamburg
2024

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2012 bis Dezember 2016 an der *Hamburg School of Food Science* – Institut für Lebensmittelchemie des Fachbereiches Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn angefertigt.

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| 1. Gutachter der Dissertation: | Herr Prof. Dr. Sascha Rohn |
| 2. Gutachter der Dissertation: | Frau Prof. Dipl.-Ing. Dr. Agnes Weiß |

Prüfungskommission:

- | | |
|------------|-----------------------------------|
| Vorsitz: | Herr Prof. Dr. Hartmut Schlüter |
| 2. Prüfer: | Herr Prof. Dr. Gerrit A. Luinstra |
| 3. Prüfer: | Herr Prof. Dr. Sascha Rohn |

- | | |
|----------------------|--------------------|
| Tag der Disputation: | 13. September 2024 |
| Druckfreigabe: | 18. September 2024 |

Danksagung

Ich bin all jenen dankbar, die mich während meiner Dissertation unterstützt und begleitet haben. Ohne ihre Hilfe und Ermutigung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Sacha Rohn, meinem Doktorvater, der nicht nur meine akademische Entwicklung gefördert hat, sondern auch mit wertvollen Einsichten, Anleitungen und neuen Projekten stets begeisterte.

Die Zusammenarbeit mit verschiedenen Firmen, darunter das IfB, das IGV und das ILU, sowie folgende Professoren und ihre Arbeitskreise: Prof. Dr. Peter Winterhalter und Prof. Dr. Ulrich Engelhardt von der TU Braunschweig, Prof. Dr. Gerrit Luinstra vom Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der Universität Hamburg, sowie Prof. Dr. Hartmut Schlüter vom Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des UKE, haben meine Forschung auf eine einzigartige Weise bereichert. Ein herzliches Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Bernward Bisping, Prof. Dr. Michael Sandmann, Dr. Daniel Kadow, Dr. Gerold Jerz, Dr. Mirko Himmel und Dr. Maria Riedner, die mit ihrem fachlichen Rat und konstruktivem Feedback maßgeblich zu meiner Arbeit beigetragen haben. Genauso wie Kathrin Mink und Gaby Graack, die mir mit ihrem praktischen Wissen immer weiterhelfen konnten.

Ich bin zudem dankbar, dass ich die Betreuung von Abschlussarbeiten für die engagierten Studierenden Christin Claassen, Fabian Tietz, Laura Tumm, Denise Abert, Lucas Walkling und Maren Nolte übernehmen durfte. Ihre Begeisterung und Hingabe haben meine eigene Forschung zusätzlich bereichert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt meiner akademischen Reise war der Austausch mit Kolleginnen und Kollegen. Die Tee- und Kaffeerunden, fachlichen Diskussionen und auch die fachfremden Gespräche haben nicht nur meinen Horizont erweitert, sondern auch eine wertvolle Gemeinschaft geschaffen. Besonderer Dank gilt den KollegInnen, die nicht nur WegbegleiterInnen, sondern auch FreundInnen wurden und mich seitdem begleiten.

Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Familie für ihre fortwährende Unterstützung während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit. Ihre Ermutigung und Bestärkung haben mir den Mut gegeben, meinen eigenen Weg zu gehen. In diesem Zusammenhang möchte ich besonders Lena, Britta, Christin, Dani und Franzi nennen.

Ich bin zutiefst dankbar für die vielfältige Unterstützung, die ich auf diesem Weg erfahren durfte.

Liste der Veröffentlichungen

Beiträge zur kumulativen Dissertation (*peer reviewed* Publikationen)

Schafberg, M., Loest, K., Müller-Belecke, A., Rohn, S.
Pike Perch (*Sander lucioperca*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil—Fishes' Growth Performances and Quality Traits, *Foods* **2021**, 10 (8) 1788 DOI: [10.3390/foods10081799](https://doi.org/10.3390/foods10081799)

Schafberg, M., Loest, K., Müller-Belecke, A., Rohn, S.
Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture* **2020**, 518 DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734633](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734633)

Schafberg, M., Loest, K., Meister, U., Kurth, E., Müller-Belecke, A., Rohn, S.
Partial fishmeal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*), *European Food Research and Technology* **2018** 244 (3-4) DOI: [10.1007/s00217-017-2939-6](https://doi.org/10.1007/s00217-017-2939-6)

Weitere Zeitschriftenartikel

Lorenz, C., Schafberg, M., Roscher, L., Meyer, S., Primpke, S., Kraus, UR., Gerdt, G.
Paraffin and other petroleum waxes in the southern North Sea, *Marine Pollution Bulletin* **2021** 162 DOI: [10.1016/j.marpolbul.2020.111807](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111807)

Logemann, A., Schafberg, M., Brockmeyer, B.
Using the HPTLC-bioluminescence bacteria assay for the determination of acute toxicities in marine sediments and its eligibility as a monitoring assessment tool, *Chemosphere* **2019** 233, 936-945 DOI: [10.1016/j.chemosphere.2019.05.246](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.246)

Sandmann, M., Lippold, M., Schafberg, M., Rohn, S.
Aufdeckung von Produktheterogenitäten in der Bioprozesstechnik durch automatisierte Partikel-Analysen-Technologie, *Chemie Ingenieur Technik* **2018** 90 (9) 1234-1234 DOI: [10.1002/cite.201855225](https://doi.org/10.1002/cite.201855225)

Sandmann, M., Schafberg, M., Lippold, M., Rohn, S.
Analysis of population structures of the microalga *Acutodesmus obliquus* during lipid production using multi-dimensional single-cell analysis, *Scientific Reports* **2018** (8) 6242 DOI: [10.1038/s41598-018-24638-y](https://doi.org/10.1038/s41598-018-24638-y)

Mocan, A., Zengin, G., Simirgiotis, MJ., Schafberg, M., Mollica, A., Vodnar, DC., Crişan, G., Rohn, S.
Functional constituents of wild and cultivated Goji (*L. barbarum* L.) leaves: phytochemical characterization, biological profile and computational studies, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2016** 32 (1) DOI: [10.1080/14756366.2016.1243535](https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1243535)

Mocan, A., Schafberg, M., Crişan, G., Rohn, S.
Determination of lignans and phenolic components of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using HPLC-ESI-ToF-MS and HPLC-online TEAC: Contribution of individual components to overall antioxidant activity and comparison with traditional antioxidant assays, *Journal of Functional Foods* **2016** (24) 597-594 DOI: [10.1016/j.jff.2016.05.007](https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.05.007)

Vorträge

Schafberg, M., Krauss UR., Brockmeyer B.

Paraffin – ein Trend?

Meeresverschmutzungskonferenz 2018, Jaruplund Højskole (Deutschland),

10.-11. September **2018**

Schafberg, M., Lau, AE., Krauss, UR., Brockmeyer, B.

Towards a cost-effective and rapid toxicological screening method for organic contaminants in marine matrices using HPTLC bioluminescence detection with *Aliivibrio fischeri*

Dioxin 2018, Krakau (Polen), 26.-31. August **2018**

Sandmann, M., Schafberg, M., Lippold, M., Odika, CP., Rohn, S.

Lipid productivity and single-cell dynamics in algal cultures

10. Bundesalgenstammtisch der DECHEMA e.V., Merseburg, 11.-12. September **2017**

Schafberg, M., Rohn, S.

Verbundprojekt FENA – Fischmehl und -öl Ersatzstoff für eine nachhaltige Aquakultur

Workshop zum Thema „Mikroalgenutzung in der Raumfahrt“ der OHB System AG und des Zentrums für Luft- und Raumfahrt (DLR), Bremen, 05.-06. November **2015**

Schafberg, M., Rohn, S.

„Verbundprojekt FENA – Fischmehl und –öl Ersatzstoffe für eine nachhaltige Aquakultur“

Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft,

Oldenburg (Deutschland), 10. März **2015**

Posterpräsentationen

Schafberg, M., Fischer J., Loest, K., Müller-Belecke, A., Rohn, S.

Accumulation of bioactive compounds in rainbow trout and pike-perch fillets after feeding with a microorganism enriched diet, *Aquaculture Europe 19 der European Aquaculture Society*, Berlin, 7.-10. Oktober **2019**

Sandmann, M., Schafberg, M., Rohn, S.

Heterogeneity in cell populations and possible implications on products heterogeneities.

Jahrestagung des Regionalverbandes Nordost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft,

Berlin, 06. März **2018**

Sandmann, M., Lippold, M., Schafberg, M., Odika, CP., Rohn, S.

Insights in lipid enrichment in algal cultures through novel particle analytical technique.

6th Congress of International Society for Applied Phycology, Nantes (Frankreich),

18.-23. Juni **2017**

Sandmann, M., Lippold, M., Schafberg, M., Odika, CP., Rohn, S.

Image analysis as a tool for process monitoring in biotechnology, *4th European Conference on Process Analytics and Control Technology (EUROPACT 2017)*, Potsdam,

10.-12. Mai **2017**

Schafberg, M., Kurth, E., Loest, K., Müller-Belecke, A., Rohn, S.

Anreicherung von bioaktiven Stoffen in Regenbogenforelle und Zander durch die Verwendung eines Algen-Hefe-Mixfuttermittels in der nachhaltigen Aquakultur, *9. Bundesalgenstammtisch*, Jülich, 26.-27. September **2016**

- Sandmann, M., Lippold, M., Schafberg, M., Rohn, S.
Etablierung einer neuartigen Partikel-Analysen-Technologie (PAT) für biotechnologische Prozesse, *9. Bundesalgenstammtisch*, Jülich, 26.-27. September **2016**
- Himmel, M., Schafberg, M., Rohn, S., Streit, W.
Characterisation of bacterial volatile compounds as biomarkers for species identification and metabolic profiling, *68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie*, Ulm, 11.-14. September **2016**
- Schafberg, M., Kurth, E., Loest, K., Müller-Belecke, A., Rohn, S.
Anreicherung von bioaktiven Stoffen in Regenbogenforelle und Zander durch die Verwendung eines Algen-Hefe-Mixfuttermittels in der nachhaltigen Aquakultur *45. Lebensmittelchemikertag*, Freising 12.-14. September **2016**
- Schafberg, M., Kurth, E., Loest, K., Müller-Belecke, A., Rohn, S.
Verwendung und Variation von verschiedenen Mikroorganismen als Ersatzstoff für Fischmehl und -öl in der Fischzucht, *Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Braunschweig, 4-5. April **2016**
- Himmel, M., Schafberg, M., Streit, W., Rohn, S.
Non-invasive monitoring of microbial cultures by HS-SPME-GC/MS: a pilot study *49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie*, Hamburg, 28. Februar-02. März **2016**
- Schafberg, M., Kurth, E., Loest, K., Müller-Belecke, A., Rohn, S.
Potential use of a mixture of *Spirulina platensis*, *Cryptocodium cohnii* and *Rhodotorula glutinis* in diets for rainbow trout and zander, *Algae Europe 2015*, Lissabon, Portugal 01.-03. Dezember **2015**
- Schafberg, M., Claassen, C., Kurth, E., Loest, K., Rohn, S.
Entwicklung einer Screening-Methode für Metabolitenprofile ausgewählter Cyanobakterien, *43. Deutscher Lebensmittelchemikertag*, Gießen, 22.-24. September **2014**
- Schafberg, M., Claassen, C., Kurth, E., Loest, K., Rohn, S.
Entwicklung einer Screening-Methode für Metabolitenprofile ausgewählter Mikrogrünalgen und Cyanobakterien, *7. Bundesalgenstammtisch*, Köthen, 03.-04. Juni **2014**
- Schafberg, M., Jerz, G., Kurth, E., Loest, K., Winterhalter, P., Rohn, S.
Isolation and characterization of bioactive compounds from *Scenedesmus* sp. by Spiral Coil Countercurrent Chromatography (spiral-CCC), *Jahrestagung des Regionalverbandes Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft*, Hamburg, 24.-25. März **2014**
- Schafberg, M., Kurth, E., Loest, K., Rohn, S.
Entwicklung einer Screening-Methode für Metabolitenprofile ausgewählter Mikrogrünalgen und Cyanobakterien, *Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Lebensmittelverfahrenstechnik und Phytoextrakte*, Freising, 25.-28. Februar **2014**
- Schafberg, M., Rahlf, A.F., Kerner, M., Luinstra, G., Rohn, S.
Comparison of three rapid methods for the determination and characterization of fatty acids in selected microalgae, *Jahrestreffen der ProcessNet-Fachgruppen Lebensmittelverfahrenstechnik und Phytoextrakte*, Freising, 25.-28. Februar **2014**

Schafberg, M., Jerz, G., Kurth, E., Loest, K., Winterhalter, P., Rohn, S.
Isolation and characterization of bioactive compounds from *Scenedesmus* sp. by *Spiral Coil Countercurrent Chromatography* (spiral-CCC), 7th international Algae Congress, Hamburg, 03.-04. Dezember **2013**

Schafberg, M., Jerz, G., Kurth, E., Loest, K., Winterhalter, P., Rohn, S.
Isolierung von bioaktiven Inhaltsstoffen aus der Mikroalge *Scenedesmus spp.* mittels *Spiral Coil-Countercurrent-Chromatography* (spiral-CCC), 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Braunschweig, 16.-18. September **2013**

Inhaltsverzeichnis

Liste der Veröffentlichungen	I
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	IX
1. Kurzfassung	1
2. Abstract	2
3. Einleitung	3
4. Theoretischer Hintergrund.....	5
4.1. Problematik der industriellen Fischerei.....	5
4.2. Aquakultur.....	6
4.3. Untersuchte Fische	7
4.3.1. Zander (<i>Sander lucioperca</i>)	7
4.3.2. Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	9
4.4. Qualitätsparameter von Fischen.....	10
4.5. Fischhaltung und Fischfutter	12
4.5.1. Konventionelle Futter.....	13
4.5.2. Fischmehl und Fischöl.....	14
4.5.3. Mikroorganismen	17
4.5.4. Cyanobakterien und Algen	18
4.5.5. Fetthefen	19
4.6. Instrumentelle Analytik und Statistische Datenanalyse.....	20
5. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit	21
6. Kumulativer Teil der Dissertation	23
6.1. Partial fishmeal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) and pike-perch (<i>Sander lucioperca</i>) (Publikation I).....	24
6.2. Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (Publikation II)	43
6.3. Pike-Perch (<i>Sander lucioperca</i>) and Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil - Fishes' Growth Performances and Quality Traits (Publikation III)	56
7. Zusammenfassende Diskussion	78
7.1. Nachhaltige Fischfuttermittel: Substitution und Effekte	78

7.2.	Auswahl der Mikroorganismen	79
7.3.	Fütterungsstudie im Kleinmaßstab	80
7.4.	Einfluss der Herstellung auf Testfutter Nr. 5.....	82
7.5.	Fütterungsstudie im Pilotmaßstab	83
7.6.	Sensorische Betrachtung der Fischfilets	84
8.	Ausblick.....	85
9.	Literatur	86
10.	Anhang	99
10.1.	Ergänzende Informationen zu den Publikationen (<i>Supplemental Material</i>)	99
10.1.1.	Publikation II	99
10.1.2.	Publikation III.....	104
10.2.	Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe	106
11.	Eidesstattliche Versicherung.....	108

Abkürzungsverzeichnis

ALA	α -Linolensäure
ASC	<i>Aquaculture Stewardship Council</i>
BAP	<i>Best Aquaculture Practices</i>
BLE	Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
<i>C. cohnii</i>	<i>Cryptocodium cohnii</i>
DHA	Docosahexaensäure
DVO	Durchführungsverordnung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EG	Europäische Gemeinschaft
EPA	Eicosapentaensäure
ESR	Elektronenspinresonanz
etc.	<i>et cetera</i>
EU	Europäische Union
€	Euro
e.V.	Eingetragener Verein
F1	Fütterungsversuch F1
F2	Fütterungsversuch F2
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen
FM	Futtermittel
GAA	<i>Global Aquaculture Alliance</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals</i> global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien
IfB	Institut für Binnenfischerei Potsdam-Sacrow
IGV	Institut für Getreideverarbeitung GmbH
i.d.R.	in der Regel
LM	Lebensmittel
Mio.	Million
MO	Mikroorganismus
MPa	Megapascal
Mrd.	Milliarde
NfE	Stickstoff-freie Extraktstoffe
n.d.Z.	nach der Zeitenwende
Nr.	Nummer
PAK	Polycyclische Kohlenwasserstoffe
PCB	Polychlorierte Biphenyle

PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i> mehrfach ungesättigte Fettsäure
R. glutinis	<i>Rhodotorula glutinis</i>
sp.	nicht näher bezeichnete Spezies
spp.	<i>species pluralis</i>
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> Trolox-Äquivalent Antioxidative Kapazität – Assay
TMA-N	Trimethylamin-Stickstoff
TPC	<i>Total phenolic content</i> Gesamtphenolgehalt
TVB-N	<i>Total volatile basic nitrogen</i> Gesamtmenge des flüchtigen basischen Stickstoffs
u.a.	unter anderem
US\$	US-Dollar
usw.	und so weiter
VO	Verordnung
vs.	<i>versus</i>
z.B.	zum Beispiel

Des Weiteren wurde das internationale Einheitensystem (SI-Einheiten) mit den entsprechenden Einheitenzeichen und Präfixen verwendet.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Zander (<i>Sander lucioperca</i>), Altonaer Fischmarkt April 2023 (Foto: M. Schafberg).....	8
Abbildung 2 Regenbogenforellen (<i>Oncorhynchus mykiss</i>); hier mit der Handels- bezeichnung Lachsforelle, Altonaer Fischmarkt April 2023 (Foto: M. Schafberg).....	10
Abbildung 3 Beschreibung der Futtermittelentwicklung.....	21
Abbildung 4 Schema des Ablaufs der vorliegenden Studie.....	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ausschnitt möglicher Parameter zur Überprüfung der Qualität von Fisch ^{46,48}	11
Tabelle 2 Nährwertdeklaration von jeweils zwei Mastfuttern für Regenbogenforellen und Zander (Alleraqua und Biomar) mit einem Durchmesser von 6 mm ⁵⁰⁻⁵²	14
Tabelle 3 Auszug von bereits verwendeten Ersatzstoffen bzw. Zutaten bei der Fütterung von verschiedenen aquatischen Spezies ^{54,70-110}	16
Tabelle 4 Übersetzung aus dem Englischen - Auszug aus dem EU Futtermittelregister nach ¹¹⁵ Stand 14. Mai 2024.	18
Tabelle 5 Gehalt an Mikroorganismen, Fischmehl und Fischöl in den Testfuttern Nr. 1 bis Nr. 5 und der Kontrolle	81
Tabelle 6 Ausschnitt der betrachteten Parameter zur Qualitätsbeurteilung aus Schafberg et al. ¹⁵⁰⁻¹⁵²	82
Tabelle 7 Liste der verwendeten Gefahrstoffe.....	106
Tabelle 8 GHS Kennzeichnung und Bedeutung gemäß VO (EG) 1272/2008 ¹⁶⁷	107

*“It's something unpredictable,
but in the end, it's right.
I hope you had the time of your life.”*

Billie Joe Armstrong

1. Kurzfassung

Das Lebensmittel Fisch hat seit Jahrtausenden eine große Bedeutung für den Menschen, aufgrund seiner Nährstoffzusammensetzung, der globalen Verfügbarkeit und teilweise leichten Zugänglichkeit. Fisch als lebenswichtige Quelle der menschlichen Ernährung steht aufgrund der Überfischung vor Herausforderungen, was die Entwicklung der Aquakultur und nachhaltiger innovativer Fütterungsstrategien anregt.

Die Arbeiten dieser Dissertation konzentrierten sich auf eine verringerte Abhängigkeit von Fischmehl und Fischöl in der Fischhaltung durch den Einsatz von Mikroorganismen-biomasse als alternativem Rohstoff. Ziel war es, durch neue Futtermittel eine vergleichbare oder bessere Fischfiletqualität als herkömmliche Fischfilets zu erreichen. Nach Auswahl der Mikroorganismen folgte die Entwicklung verschiedener Futtermittel, welche in einer zweistufigen Studie an Zandern (*Sander lucioperca*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) getestet wurden.

Die Zusammensetzung des finalen Futters umfasste die Arten *Rhodotorula glutinis*, *Cryptocodium cohnii* und *Arthrospira sp.*, womit die Hälfte des herkömmlichen Fischmehl- und Fischölgehalts im Futtermittel ersetzt werden konnte. Die an Zander und Regenbogenforellen durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass das auf Mikroorganismen basierende Futtermittel das Wachstum und die Qualität der Speisefische aufrechterhält, die mit herkömmlichen Futtermitteln für Regenbogenforellen vergleichbar sind. Beim Zander besteht weiterhin Optimierungsbedarf, da das Futtermittel zu einer verminderten Wachstumsleistung führte. Die sensorische Bewertung der Fischfilets beider Spezies ergab nur geringfügige Unterschiede in Textur, Geruch und Geschmack, was auf das Potenzial für eine breite Marktakzeptanz hinweist. Die Arbeiten betonen die Bedeutung neuer, nachhaltiger Futtermittelzutaten und deren Potential in der Aquakultur.

2. Abstract

The fish as a food has a huge importance to human nutrition for thousands of years, due to its nutrient composition, global availability and, in some cases, easy accessibility. Fish as an essential source of human nutrition faces challenges due to overfishing, giving rise to the development of aquaculture and sustainable alternatives, such as innovative fish feed ingredients.

The studies in this dissertation focused on reducing the dependence on fishmeal and fish oil by using a microorganism biomass mixture as alternative ingredient. The studies presented aimed for a comparable or better quality of fish fillet than conventional fish fillet by using the new feed. After the selection of microorganisms, various feed formulations were developed, which were further investigated in a two-stage study on pike-perch (*Sander lucioperca*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

The composition of the final feed included the species *Rhodotorula glutinis*, *Cryptocodium cohnii*, and *Arthrospira* sp., which were able to replace half of the conventional fishmeal and fish oil content in feed. The studies showed that the microorganism-based feed maintains growth and quality of rainbow trout that was comparable to conventional rainbow trout feeds. There is still a need for optimization when it comes to pike-perch, as the feed led to reduced growth performance. Sensory evaluation of pike-perch and rainbow trout fillets revealed minor differences in texture, odor, and taste, indicating potential for wider market acceptance. These studies emphasize the importance of new, sustainable feed ingredients and their potential in aquaculture.

3. Einleitung

Die Anfänge der Aquakultur gehen bis weit ins Altertum zurück. In vielen Teilen der Erde wurde bereits zu dieser Zeit die Wichtigkeit von Fisch für die menschliche Ernährung erkannt. So wurden zu jener Zeit Teiche zur Fischhaltung angelegt und Methoden zur Fischzucht entwickelt. Im „europäischen Raum“ erlangte Fisch als Lebensmittel weitere große Bedeutung im Mittelalter aufgrund der Zugänglichkeit und des christlichen Weltbilds, insbesondere aber der Fastenzeit. Auch heutzutage ist Fisch ein wichtiges Lebensmittel. Das spiegelt sich in *Food Trends* wie dem *Pescetarismus* oder dem *Seaganismus* wider, ebenfalls heben Ernährungsempfehlungen die Bedeutung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren besonders den Omega-3-Fettsäuren hervor, die im Fisch in hohen Konzentrationen vorhanden sind.

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts verzeichnet die Aquakultur, auch *Aquafarming* genannt, eine rasante Entwicklung, da diese als mögliches Werkzeug zur Wahrung der weltweiten Ernährungssicherheit angesehen wird. Die globalen Produktionsmengen aus dem industriellen Fischfang stagnieren seit den 1990er-Jahren, während die Weltbevölkerung stetig steigt. Der mit der steigenden Bevölkerung einhergehende wachsende weltweite Nahrungsmittelbedarf erfordert neue Lösungen. Aquatische Lebensmittel wie Fisch erfreuen sich aufgrund ihrer Nährstoffzusammensetzung, biologischen Wertigkeit und Zugänglichkeit großer Beliebtheit. Die Überfischung durch die industrielle Fischerei hat zu einem dramatischen Rückgang vieler Fischbestände geführt. In diesem Kontext wurden Fangverbote und Fangquoten für verschiedene Arten festgelegt und regelmäßig reevaluiert, um die wilden Bestände zu schützen. Infolgedessen sind verschiedene Innovationen vorgenommen worden, um die Produktion aquatischer Lebensmittel zu steigern. Daher bedarf es neuer Prozesse, um die Abhängigkeit der Aquakultur von der Fischerei zu lösen. Die Aquakultur ist eine Fischproduktionsart, die insbesondere seit den 1980er Jahren durch die Durchfluss- und Kreislaufsysteme großen Aufschwung bekam. Im Vergleich zur traditionellen Teichwirtschaft, bei der einst Naturfutter, Tiermehle und Schlachtabfälle verwendet wurden, hat sich seither in der Aquakultur vieles verändert. So vereinfachte die Fütterung mit Pellets die Aquakultur erheblich.

Seit Mitte der 1950er haben sich Pellets aufgrund ihrer Vorteile wie Handhabung, Dosierung und Gewässerbelastung gegenüber Naturfutter und „Nassfutter“ durchgesetzt. Neben der Art der Futterdarreichung wurden seither auch die Inhaltsstoffe den Bedürfnissen der Tiere angepasst. Die Futtermittelzutaten Fischmehl und Fischöl gelten als bedeutende Zutaten und stehen nur begrenzt zur Verfügung. Seit den 2000er Jahren sind die Preise für Fischmehl und Fischöl aufgrund des steigenden Bedarfs in der Fischfutterproduktion kontinuierlich gestiegen, während die Produktionskapazität stagniert. Um die Binnenaquakultur von der Hochseefischerei zu lösen, ist es daher unabdingbar Fischmehl und Fischöl im Futter zu ersetzen.

In den letzten Jahrzehnten wurden die Anteile von Fischmehl und Fischöl im Fischfutter bereits erheblich reduziert. Forschungsgruppen versuchen weiterhin, diese Anteile vollständig oder teilweise zu substituieren, wobei hauptsächlich eine einzige Zutat verwendet wird. Pflanzenöle, Tierfette und Algenextrakte wurden beispielsweise als Ersatz für Fischöl verwendet, während Tierknochenmehle und Pflanzenextrakte als Ersatz für Fischmehl verwendet wurden. Neben speziell für diesen Zweck angebauten Zutaten wurden auch

Produkte aus Neben- und Restströmen der Lebensmittelindustrie getestet, um so nachhaltigere Fischfuttermittel zu entwickeln.

Bei der Formulierung von Futtermitteln muss darauf geachtet werden, dass der Energiebedarf und die Makronährstoffe des neuen Futters den Bedürfnissen der Fische entsprechen, um mögliche Nährstofflücken zu vermeiden. Die resultierende Nährstoffzusammensetzung wurde bislang nur begrenzt berücksichtigt, hat aber im Laufe der Zeit an Bedeutung gewonnen. Eine Mischung verschiedener Zutaten ermöglicht einen leichteren Ausgleich von Nährstofflücken, da die Zusammensetzung besser variiert werden kann. Die verringerten Leistungsparameter der Fische im Vergleich zu konventionell gefütterten Fischen wurden daher häufig den Inhaltsstoffen der neuen Futtermittelzutaten zugeschrieben. Ebenfalls an Bedeutung gewinnt die Anreicherung mit Inhaltsstoffen, die einen zusätzlichen Mehrwert primär für den Menschen generieren sollen. Hierzu gehören mehrfachungesättigte Fettsäuren wie Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren genauso wie Carotinoide und Antioxidantien. Dahinter steht die Idee, dass die Verwendung einer Mischung zur Substitution von Fischmehl und Fischöl einen positiven Einfluss auf die Wachstumsleistung der Fische und infolgedessen auf die menschliche Ernährung haben kann.

4. Theoretischer Hintergrund

4.1. Problematik der industriellen Fischerei

Fisch und andere aquatische Lebensmittel nehmen eine herausragende Stellung in der globalen Ernährung ein, was auf diverse Faktoren zurückzuführen ist. Aufgrund seiner Nährstoffzusammensetzung ist Fisch eine bedeutende Quelle essenzieller Makro- und Mikronährstoffe für den menschlichen Bedarf (Kapitel 4.4). Angesichts seiner historischen Bedeutung ist es kaum überraschend, dass Fisch seit Jahrtausenden zu den Grundnahrungsmitteln der Menschen gehören. Der älteste Industriezweig der Fischerei ist die Fangfischerei, welche sich derzeit in die Hochseefischerei, Küstenfischerei und Binnenfischerei gliedert.^{1,2} In Anbetracht der verfügbaren wirtschaftlichen Ressourcen und Technologien werden Fischereierzeugnisse weltweit genutzt, um das Leben von Millionen von Menschen zu sichern.^{3,4}

Aktuell leben etwa 8,2 Milliarden (Mrd.) Menschen auf der Erde (Stand Juni 2024). Somit hat sich die Weltbevölkerung in den letzten siebzig Jahren (1950er; 2,7 Mrd. Menschen) nahezu verdreifacht.^{5,6}

Mit diesem Bevölkerungswachstum ist ein gesteigerter Nahrungsmittelbedarf verbunden. Um diesen Bedarf zu decken, wird Fisch beziehungsweise Fischerei als mögliche Lösung betrachtet. Der Stellenwert von Fisch als Lebensmittel wird auch durch die steigenden Produktionszahlen der vergangenen Jahrzehnte unterstrichen. In den 1950er Jahren stammte der Fischereiertrag fast ausschließlich aus der Binnen- und Meeresfischerei, wobei die Gesamtjahresproduktion etwa 20 Millionen (Mio.) Tonnen betrug. Bis in die 1980er Jahre stieg die jährliche Produktion aus der Fischerei. Seitdem liegt diese weltweit im Durchschnitt zwischen 85 und 95 Mio. Tonnen Fisch pro Jahr.³

Dieser Zuwachs resultierte aus der Industrialisierung der Fischerei, die zu einer stetigen Steigerung der Fangquoten geführt hat. Ein weiteres Ergebnis der zunehmenden Fischproduktion ist die damit einhergehende Zunahme des Beifangs. Beide Phänomene haben die Überfischung der Meere gefördert und werden bereits seit den 1960er Jahren beobachtet und sowohl in der Wissenschaft als auch den Medien thematisiert.⁷⁻⁹ Die Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen (*englisch: Food and Agriculture Organization of the United Nations*, FAO) klassifiziert Meeresbestände, die kollabiert sind, überfischt werden oder sich im Erholungsprozess befinden, als „nicht nachhaltig genutzt“. Der Anteil der „nicht nachhaltig genutzten“ Meeresbestände stieg von 10% im Jahr 1974 auf 34,2% im Jahr 2017.^{3,10}

Um dieser Ausbeutung der Meeresressourcen entgegenzuwirken und das Risiko der Auslöschung von Arten zu mindern, wurde die Aquakultur als nachhaltiges Konzept entwickelt und ausgebaut. Seit den 1980er Jahren dient die Aquakultur verstärkt als Produktionsquelle aquatischer Organismen. Diese Entwicklung spiegelt sich auch in den jährlichen Produktionszahlen wider. Während die Erträge aus der Fischerei von 1986 bis 2018 stagnierten, stieg der durchschnittliche Ertrag der Aquakultur im gleichen Zeitraum um mehr als das Fünffache.^{3,11} Doch was genau verbirgt sich hinter dem Begriff „nachhaltige Aquakultur“ und welche Potentiale bietet sie?

4.2. Aquakultur

Die Aquakultur wurde erstmals im Jahr 1988 von der FAO als kontrollierte Erzeugung aquatischer Organismen definiert. Diese Definition umfasst eine breite Palette von Organismen, darunter Fische, Weichtiere, Krebstiere sowie Pflanzen, wozu auch Algen gezählt werden.¹² Dieser Wirtschaftszweig, der auch als *Aquafarming* bezeichnet werden kann, unterscheidet sich von der Fischerei, die das Ernten von aquatischen Lebewesen vor allem aus dem Meer durch das Abfischen oder Fangen beschreibt (Wildfang). Die Aquakultur erstreckt sich über verschiedene Wasserhabitats, einschließlich Süß-, Salz- und Brackwasser, und erfolgt in verschiedenen Systemen wie z.B. (Natur-)Teiche, Zuchtbecken, Netzgehege, Kreislaufanlagen oder auch Meereskäfige. Der Hauptzweck der Aquakultur liegt in der Aufzucht von Organismen für die Lebensmittelindustrie. Darüber hinaus werden die so aufgezogenen Tiere für die Erzeugung von Setzlingen in der Fischzucht, als Zierfische und für die allgemeine Arterhaltung genutzt. Außerdem wird die Aquakultur zur Gewinnung von Substanzen aus Algen verwendet, die Anwendung in der chemischen, pharmazeutischen oder Futtermittelindustrie finden um beispielsweise Carotinoide oder Treibstoffe herzustellen.^{12,13} Die Aquakultur befasst sich nicht nur mit der Haltung der Organismen, sondern auch mit deren Schlachtung und Verarbeitung.

Um die Qualität und Nachhaltigkeit der Aquakultur zu gewährleisten, hat die Europäische Union (EU) verschiedene Verordnungen (VO) und Durchführungsverordnungen (DVO) erlassen, darunter die VO zur gemeinsamen Fischereipolitik (VO 1380/2013), die VO über die Produktion und Kennzeichnung von ökologischen/biologischen Erzeugnissen (VO 2018/848), die DVO für die Produktion von Tieren und Meeresalgen in der ökologischen/biologischen Aquakultur (DVO 2020/464).¹⁴⁻¹⁶ Darüber hinaus existieren verschiedene Zertifikate mit unterschiedlichen Anforderungen an Haltung und Nachhaltigkeit, die für Verbraucher hilfreich sind und auf Verpackungen sowie auf Etiketten von loser Ware beworben werden. Zu diesen Zertifikaten gehören z.B. das internationale *Aquaculture Stewardship Council* (ASC), das *Best Aquaculture Practices* (BAP), welches von der *Global Aquaculture Alliance* (GAA) festgelegt wird oder auch das EU-Bio-Logo und das deutsche Naturland-Siegel für ökologische Aquakultur.

Der globale Aquakultursektor wuchs, gemessen an der Gesamtproduktion aquatischer Produkte, von 1980 bis 2012 jährlich um etwa 8%. Seit 2013 übersteigt die Produktion aquatischer Produkte in Aquakulturen die Produktion aus Wildfängen. Von 1980 bis 2019 hat sich die Produktion aquatischer Produkte in der Aquakultur fast um den Faktor 7 vergrößert, wobei der Hauptbeitrag von der Zucht von Süßwasserfischen und aquatischen Pflanzen stammt.¹⁵ Auch in der europäischen Aquakultur stieg das Produktionsvolumen von Süßwasserfischen im Zeitraum 2018 – 2019 um 8%.¹⁷

Der Großteil der aquatischen Produktion dient der humanen Ernährung und wird in frische oder lebende Fischvermarktung sowie in verarbeitete Produkte wie Fischkonserven unterteilt. Ein weiterer erheblicher Anteil wird für die Herstellung sogenannter *Non-Food*-Produkte wie Fischmehl oder Fischöl genutzt. 2019 wurden etwa 20 Mio. Tonnen (etwa 11% der Gesamtproduktion) für *Non-Food*-Produkte verwendet.¹¹ Fischmehl und Fischöl werden überwiegend für die Herstellung von Futtermitteln verwendet (Kapitel 4.5.2). Bei der Betrachtung der Jahre 2018 und 2019, war 2018 ein ertragreicheres Jahr als 2019. Hier wurden 22,2 Mio. Tonnen für *Non-Food*-Produkte verwendet, was einem Achtel der

Gesamtproduktion (Fischerei und Aquakultur) oder etwa einem Viertel der Fischereiproduktion entspricht.³

Kritikpunkte in diesem Kontext beziehen sich auf die Tatsache, dass durch die Zufütterung in offenen Gewässern zu viele Nährstoffe, Parasiten und Medikamente wie Antibiotika in das Ökosystem gelangen und diese negativ beeinflusst werden. Daher ist besondere Aufmerksamkeit auf die sogenannte *Biosecurity* erforderlich, da Krankheiten bei aquatischen Organismen eines der schwerwiegendsten Hindernisse für die Ausweitung und Entwicklung einer nachhaltigen Aquakultur sind.¹⁸ Eine erfolgreiche Aquakultur ist daher das Resultat der optimalen Anpassung an die spezifischen Bedürfnisse der gezüchteten Organismen, einschließlich Umweltfaktoren wie Sauerstoff und Nährstoffgehalt des Wassers sowie geeigneter Schutzmaßnahmen für Jungtiere oder angemessener Futtermittel.¹⁹

Während die Fischereiproduktion global steigt, sinken die Erträge in Deutschland (2016: etwa 460.000 t; 2022: 400.000 t). Derselbe Trend ist in den Produktionszahlen der deutschen Aquakultur sichtbar (2016: 19.000 t; 2022: 18.000 t).²⁰ In der deutschen Aquakultur konzentriert sich die Produktion hauptsächlich auf Süßwasserfische wie Karpfen, Forelle (Bachforelle, Lachsforelle und Regenbogenforelle), Saibling und Aal.²⁰

4.3. Untersuchte Fische

4.3.1. Zander (*Sander lucioperca*)

Die Gattung *Sander* gehört zur Unterfamilie Luciopercinae, innerhalb der Familie der Percidae (Barsche) und gehört somit zur Ordnung Perciformes (Barschartigen). Dieser Gattung werden derzeit fünf Spezies zugeordnet. Zu den europäischen Vertretern dieser Gattung gehören *Sander (S.) lucioperca* LINNAEUS zusammen mit *S. volgensis* GMELIN und *S. marinus* CUVIER. In der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden der Begriff „Zander“ synonym für *Sander lucioperca* LINNAEUS verwendet.

Zander zeichnen sich durch ihren langgestreckten, schlanken Körper aus, der zwei separate, aufrechtstehende Rückenflossen besitzt, wobei die vordere Rückenflosse ausgeprägte Stachelstrahlen aufweist (Abbildung 1). Die Oberseite des Körpers ist grünlich gefärbt, während der Bauch und der Bereich bis zur Seitenlinie eher weißlich sind. Zander zeichnen sich weiterhin durch ihre Größe (bis zu 1,3 Meter) und ihr Gewicht (bis zu 10 kg) aus.²¹ Aufgrund ihres niedrigen Fettgehalts, gehören Zander zu den Magerfischen. Das Filetfleisch ist von weißer Farbe und von fester Konsistenz. Darüber hinaus wird das Filets als zart mit einem geringen Grätenanteil beschrieben, was sie zu beliebten Speisefischen macht.²²

Zander sind ursprünglich in klaren Gewässern sowie in Brackwasserhabitaten, von China bis zur Elbe und von Schweden über Finnland bis Russland, beheimatet. Aufgrund von Besatzmaßnahmen im 19. Jahrhundert sind Zander heute auch in vielen großen Flüssen in Deutschland und Europa anzutreffen. In den letzten Jahrzehnten hat die Aquakultur als Aufzuchtmethode für Zander an Bedeutung gewonnen. Hierfür werden vorwiegend Becken und Teiche verwendet. Des Weiteren werden Zander als Nebenfische in der Karpfenzucht eingesetzt.^{19,23,24}



Abbildung 1 Zander (*Sander lucioperca*), Altonaer Fischmarkt April 2023 (Foto: M. Schafberg).

Zander sind Süßwasserfische und ernähren sich als pelagische Karnivore insbesondere piscivor. Sie orten ihre Beute vorrangig mit Hilfe ihres ausgeprägten Geruchs- und Sehsinns, der besonders gut ans Dämmerungslicht angepasst ist. Ihre Beutefische sind in der Regel kleinere Fische, deren Größenordnung sich nur wenig mit zunehmender Körpergröße des Zanders ändert. Ein Mangel an Beute führt vermehrt zu Kannibalismus, der in allen Lebensstadien auftreten kann. Die Verwendung von Trockenfuttermitteln in der Zanderzucht und -haltung ist aufwendig, da eine schrittweise Umstellung von Lebendfutter auf Trockenfutter erforderlich ist, um rentable Überlebensraten zu gewährleisten. Zudem haben äußere Gegebenheiten wie Besatzdichte und Temperatur einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf der Haltung, weshalb Zander im Allgemeinen als sensibel und anspruchsvoll in Bezug auf ihre Futtermittel betrachtet werden.^{19,25}

Im Jahr 2000 betrug die Gesamtproduktion von Zandern in Europa (ohne Großbritannien und Russland) durch Fischerei und Aquakultur 6.306 Tonnen, wobei der Anteil aus der Aquakultur lediglich 5% ausmachte. In den Jahren von 2009 bis 2019 (mit Ausnahme von 2016) verzeichnete die Zanderproduktion in der Aquakultur eine deutliche Steigerung, wobei die Menge von 4.800 auf 41.500 Tonnen anstieg. Im Jahr 2019, einem besonders ertragreichen Jahr für die Zanderproduktion, betrug der Anteil der Aquakultur an der Gesamtproduktion 17%, wobei etwa 41.500 Tonnen in der Aquakultur erzeugt wurde. Im Jahr 2020 hingegen sank die Menge auf etwa 11.400 Tonnen.

Die Anzahl der Aquakulturbetriebe, die Zander züchten und halten, steigt in Europa. Aufgrund der Haltungsart bieten diese Betriebe eine Möglichkeit, die Artenvielfalt in der Binnenfischerei erfolgsversprechend auszuweiten.²⁶⁻²⁸

Die Zanderproduktion in Deutschland ist im Vergleich zu anderen Ländern gering. Im Jahr 2020 wurden in Deutschland insgesamt 55.529 kg Zander in der Aquakultur erzeugt, was 0,3% der Gesamtproduktion an Fischen entspricht. Der Preis für 1 kg Zander im Direktverkauf lag in den Jahren 2011 bis 2019 durchschnittlich bei 16,95 € (\pm 2,60 €). Im Einzelhandel hingegen war der durchschnittliche Kilopreis im selben Zeitraum etwa 40% geringer und betrug 11,81 € (\pm 3,18 €). Die Preise für Zander variieren in Deutschland

erheblich und sind abhängig von Faktoren wie Region, Vertriebsweg (z.B. Direktverkauf oder Einzelhandel), Zeitpunkt und touristischer Aspekte. Signifikante Preisschwankungen im Jahr 2020 können mit den Auswirkungen der COVID-19-Pandemie auf verschiedene Lebensbereiche in Zusammenhang stehen.^{11,20,23}

4.3.2. Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM) gehört zur Gattung der Pazifischen Lachse (*Oncorhynchus*), innerhalb der Familie der Salmonidae (Lachsfische), somit sind sie Teil der Ordnung Salmoniformes (Lachsartigen).

Regenbogenforellen sind robuste Kaltwasserfische, die schnell wachsen. Sie zeichnen sich durch einen länglichen Körper mit einer Rückenflosse und einer sogenannten Fettflosse aus (Abbildung 2). Im Vergleich zu Bachforellen wirken Regenbogenforellen gedrungener. Ihr Körper hat eine grau-silbrige Farbe, entlang der Seitenlinie verläuft ein leuchtend rotes Band. Außerdem befinden sich dunkle Tupfen auf Kopf, Rücken und Schwanz, die zum Bauch hin abnehmen. Regenbogenforellen können eine Größe von weit über einem Meter und ein Gewicht von bis zu 10 kg erreichen.²¹ Sie sind Karnivore, aber nicht ausschließlich auf natürliche Nahrung wie Insekten oder kleinere Fische angewiesen, sondern fressen auch Futtermittelpellets.^{21,29} Regenbogenforellen verstoffwechseln Kohlenhydrate schlecht und benötigen daher eine höhere Proteinzufuhr durch ihre Nahrung. Seit den 1990er Jahren wird der Protein- und Fettanteil nicht mehr ausschließlich durch Fischmehl und Fischöl gedeckt, sondern vermehrt durch alternative Rohstoffe ersetzt. Die Verwendung von Futtermittelpellets ermöglicht auch die Zugabe von Zusatzstoffen wie Astaxanthin, um die Färbung des Fleisches insbesondere bei Lachsforellen zu steuern. Im Handel erwartet der Verbraucher weißes bis pinkfarbendes, festes Fleisch und einen charakteristischen Geschmack, während Gelb- oder Grünfärbungen der Filets unerwünscht sind.^{19,21}

Regenbogenforellen haben ihren Ursprung in den pazifischen Gewässern Amerikas und wurden erst im 19. Jahrhundert aus Nordamerika nach Europa importiert. Die in Deutschland derzeit gezüchteten Regenbogenforellen sind das Ergebnis von Kreuzungen folgender drei Unterarten, *Cutthroat*-Forelle, *Shasta*-Forelle und *Steelhead*-Forelle. Diese Unterarten unterschieden sich in ihrer Pigmentierung (Farbgebung und Punktierung) und ihrem Laichverhalten (standorttreu oder anadrom, Früh- oder Spätläicher). Seit dem Import von Regenbogenforellen wurde mit der Haltung dieser in Teichen begonnen und im Laufe der Zeit optimiert.¹⁹

In Europa erfolgt die traditionelle Forellenzucht in (Erd-)Teichen. Darüber hinaus werden Fließkanäle, Becken oder auch Netzgehege für die Zucht verwendet. Seit den frühen 2000er Jahren steigt die Nachfrage nach Bio-Forellen im europäischen Raum.¹⁹ Regenbogenforellen zählen zu den bedeutendsten Speisefischen in Europa.¹⁹ Im Jahr 2000 wurde in Europa (ohne Großbritannien und Russland) eine Gesamtmenge von 193.931 Tonnen Regenbogenforellen durch Fischerei und Aquakultur produziert. In den Jahren 2000 bis 2020 betrug der Anteil der durch Aquakultur produzierten Regenbogenforellen nahezu 100%. Von 2009 bis 2019 verzeichnete die Produktion von Regenbogenforellen in der Aquakultur erhebliche Steigerungen (1.539.507 bis zu 16.164.198 Tonnen) im Vergleich zu den Jahren 2000 bis 2008 (Durchschnittsproduktion 224.135 Tonnen pro Jahr). Deutschland erzeugte im Jahr 2019

etwa 7.800 Tonnen Regenbogenforellen in der Aquakultur, was etwa 0,05% der gesamten europäischen Produktion entspricht.^{11,19,20}



Abbildung 2 Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*); hier mit der Handelsbezeichnung Lachsforelle, Altonaer Fischmarkt April 2023 (Foto: M. Schafberg).

Im Jahr 2020 wurden in Deutschland 6.035 Tonnen Regenbogenforellen in der Aquakultur erzeugt, was 32,5% aller erzeugten Fische in Deutschland entspricht. Somit stellen Regenbogenforellen den größten Anteil an in Deutschland erzeugten Fischen dar. In den Jahren von 2011 bis 2019 betrug der Durchschnittspreis für 1 kg Regenbogenforelle im Direktverkauf 7,20 € ($\pm 0,55$ €). Im gleichen Zeitraum lag der durchschnittliche Kilopreis im Einzelhandel etwa 30% geringer bei 5,55 € ($\pm 0,71$ €).^{11,20}

4.4. Qualitätsparameter von Fischen

Fische sind eine bedeutende Quelle für wichtige Nährstoffe in der menschlichen Ernährung. Zu diesen Nährstoffen zählen Proteine (15-22%), Iod, verschiedene Vitamine (Vitamin A, D, E, K und B-Vitamine), Spurenelemente und Fett (0,6-26%), insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Omega-3-Fettsäuren. Fische werden anhand verschiedener Merkmale kategorisiert, wie ihrer Körperform (Rund- oder Plattfische), ihrem Lebensraum (Süß- oder Salzwasser; Warm- oder Kaltwasser), Fried- oder Raubfische oder ihrem Fettgehalt (Fettfische oder Magerfische). Magerfische wie Kabeljau oder Zander haben einen Fettgehalt von weniger als 1%, während Fettfische wie Aal, Hering oder Lachs einen Fettgehalt von mehr als 10% besitzen.^{1,2} Regenbogenforellen, mit einem Fettgehalt von 4 bis 7%, sind in dieser Einteilung dazwischen anzusiedeln. Darüber hinaus stellen Fische eine hochwertige Proteinquelle dar, deren Proteine leicht verdaulich sind. Der Kohlenhydratanteil in Fischfilets ist mit weniger als 0,3% vernachlässigbar.^{1,2}

Süßwasserfische und Salzwasserfische unterscheiden sich maßgeblich im Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*englisch: polyunsaturated fatty acids*; PUFA). Süßwasserfische bilden PUFA größtenteils selbst, während marine Fische PUFA genauso wie Carotinoide nicht selbst synthetisieren. Salzwasserfische nehmen diese Substanzen über ihre Nahrung durch

Primärproduzenten (Algen und Phytoplankton) oder durch Sekundärproduzenten (Zooplankton) auf. In Deutschland werden vorwiegend Karpfen, Zander und Regenbogenforellen produziert, diese gehören zu den PUFA-armen Binnenfischen.³⁰ Da diese Fische vorrangig in Aquakulturen produziert werden, bedeutet das, dass PUFA über das Futtermittel in die Fische gebracht werden können bzw. müssen. Die Futterkontrolle in Aquakulturen ist einfacher zu handhaben als in der See- oder Binnenfischerei. So wird in diesen Spezies ein entsprechender Mehrwert für die menschliche Ernährung geschaffen.

Um die Einhaltung der Qualitätsstandards auf dem europäischen und deutschen Markt zu gewährleisten, wurden Parameter festgelegt, die im Zusammenhang mit der allgemeinen Sorgfaltspflicht und Verantwortung des Lebensmittelunternehmers für die Sicherheit seiner Produkte stehen.^{31–47} Diese Parameter können grob in (mikro-)biologische und chemische Aspekte unterteilt werden. Diese dienen insbesondere der Überprüfung der Verkehrsfähigkeit der Produkte im Hinblick auf die Erhaltung der Verbrauchergesundheit und -sicherheit, sowie Aspekte, die die Deklaration betreffen (Tabelle 1).^{46,48}

Tabelle 1 Ausschnitt möglicher Parameter zur Überprüfung der Qualität von Fisch ^{46,48}

(Mikro)biologische Parameter	Chemische Parameter	Deklarationstäuschung
Krankheitserreger: Salmonellen, Vibrionen, Listerien	Schwermetalle z.B. Quecksilber, Blei, Cadmium, oder auch Arsen	Überprüfung der Fischart
Hygieneindikatoren: <i>E. coli</i>	Histamin und andere biogene Amine	Herkunftsangaben
Verderbniserreger: Pseudomonaden, Enterobacteriaceae, Hefen, Schimmelpilze	Flüchtige stickstoffhaltige Basen (TVB-N), Trimethylamin-Stickstoff (TMA-N)	Nicht gekennzeichnete Wasserzusatz
Parasiten	Rückstände von Arzneimitteln wie Antibiotika oder Triphenylmethanfarbstoffen	Differenzierung von wild, ökologisch, konventionell
	Verschiedene Sensorische Prüfverfahren	Überprüfung der Nährwertangaben
	Strahlenbehandlungsnachweis	
	Toxine wie Avermectine und Domoinsäure	
	Pestizide und Schadstoffe wie Dioxine, PCB, PAK, Organozinn-Verbindungen	
	Nicht zugelassene Zusatzstoffe wie Nitrit, Nitrat, Kohlenmonoxid	

Viele dieser Parameter stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit den Umgebungsbedingungen während der Haltung oder des Fangs (wie Schwermetalle oder Krankheitserreger). Andere Qualitätsparameter prüfen auf Verderbnis (z.B. Pseudomonaden).

Im Gegensatz dazu stehen Parameter, die auf die Zusammensetzung der verwendeten Futtermittel zurückzuführen sind (wie die Grundzusammensetzung oder Carotinoide). Dies unterstreicht die Bedeutung der sorgfältigen Auswahl und Überwachung von Futtermitteln in den unterschiedlichen Zucht- und Haltungskulturen.

4.5. Fischhaltung und Fischfutter

Obwohl Fischzucht und Fischhaltung seit mehreren Jahrhunderten betrieben werden, ist die Verwendung von Fischfuttermitteln in Form von Pellets, wie sie heute bekannt sind, noch keine 100 Jahre alt.

Insbesondere in der europäischen Fischhaltung hat die Aufzucht von Karpfen eine herausragende Rolle gespielt. Die Karpfenteichwirtschaft ist in Europa weit verbreitet und verfügt über eine lange Tradition, weshalb sie intensiv erforscht wurde. Karpfen wurden bereits in der Antike im heutigen südeuropäischen Raum gehalten. Ihre Verbreitung nahm im 8. Jahrhundert deutlich zu, als auf Anweisung von Karl dem Großen (747 – 814 n.d.Z., König des Frankenreichs) vermehrt Karpfen im Herrschaftsgebiet (heutiges westliches Europa) von Fischern gezüchtet wurden. Im Spätmittelalter, insbesondere im 14. und 15. Jahrhundert, wurde das Wissen über die Teichwirtschaft durch verschiedene Mönchsorden weitverbreitet. Teiche wurden so konzipiert, dass sie den Zuchttieren nicht nur ideale Bedingungen boten, sondern auch deren natürlicher Nahrung, wie zum Beispiel Bodentieren, Plankton oder kleineren Fischen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird natürliche Nahrung nur noch bei wenigen Fischarten oder in bestimmten Aufzuchtstadien verwendet. Zudem wurden seinerzeit Restprodukte aus der Landwirtschaft und Viehzucht in der Fischaufzucht eingesetzt.^{19,49}

Die Entwicklung von Trockenfutter für die Fischaufzucht und -haltung begann vor etwa 100 Jahren in den USA. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts werden (pelletierte) Futtermittel als Alleinfutter, in Kombination mit Naturnahrung oder Mischfuttermitteln unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet. Für die Beifütterung wurden verschiedene Getreidesorten, Hülsenfrüchte, Kartoffeln, Mais oder auch Restströme, wie Biertreber, Soja- oder Rapsschrot, genutzt. Mischfutter umfassen verschiedene Darreichungsformen, darunter Pellets und andere gepresste Futterformen, ebenso wie Trockenfutter. Aufgrund ihrer Praktikabilität und optimierten Zusammensetzung haben sich Mischfutter seit den 1950er Jahren als Alleinfuttermittel etabliert. Der Anteil an Fischmehl und Fischöl im Fischfutter ist seitdem rückläufig, obwohl diese bis in die 1990er Jahre als primäre Rohstoffe dienten, um den Protein- und Fettgehalt im Futter zu decken.¹⁹

Bisher hat sich das Vorgehen bewährt, die Zusammensetzung der Futtermittel sowie die zugefütterte Futtermenge stets an den spezifischen Nährstoffbedarf der betreffenden Fischart, ihrem Alter und der Haltungsart anzupassen. Hierbei erlangt insbesondere das Verhältnis zwischen Protein- und Fettanteil sowie der Gesamtkaloriengehalt des Futters eine erhebliche Bedeutung. Dies liegt daran, dass viele Getreidesorten, die zur Beifütterung als Alleinfutter verwendet werden, zwar den Energiebedarf der Fische decken können und teilweise den Rohproteingehalt bereitstellen, jedoch nicht das erforderliche Spektrum an Aminosäuren abdecken.¹⁹

4.5.1. Konventionelle Futter

Gegenwärtig werden konventionelle Fischfutter unter Berücksichtigung der jeweiligen Fischart, des Alters und/oder der Haltungsort (Kreislaufanlage, offene Teiche, etc.) entwickelt und angeboten. Hierbei umfassen die Varianten unter anderem Brutfutter, Mastfutter, Laichfischfutter oder auch spezielle Futter. Diese speziellen Futter enthalten funktionelle Zutaten wie Pigmente oder Substanzen mit positiven physiologischen Effekten. Derzeit sind konventionelle Futter überwiegend in Form von Pellets oder Granulaten erhältlich, wobei die verwendete Pelletgröße vom jeweiligen Alter bzw. Größe der Fische abhängt.⁵⁰⁻⁵² Darüber hinaus werden verschiedene Zusatzstoffe verwendet, um z.B. die Haut- oder Fleischfarbe zu ändern oder Stoffe wie β -Glucane, Vitamine, Spurenelemente oder Aminosäuren, um die Gesundheit der Fische zu unterstützen.^{53,54} Ferner gibt es Zusatzstoffe wie diverse Enzyme, um die Verdaulichkeit der Futtermittel zu verbessern.^{27,55}

Beispielhaft setzt sich ein pelletiertes Mastfutter für Regenbogenforellen aus einer Vielzahl von Zutaten zusammen (hier in alphabetischer Reihenfolge): Blutprodukte, Einzelzellproteine, Fischmehl, Getreideprodukte, marine Nebenprodukte, nicht-marine Nebenprodukte, pflanzliche Proteine, pflanzliche Öle, verarbeitete tierische Proteine, verarbeitete tierische Öle sowie Vitamine und Mineralstoffe.⁵⁰⁻⁵² In der Aquakultur werden derzeit Futtermittel verwendet, bei denen der kombinierte Anteil von Fischmehl und Fischöl bis zu 50% der Gesamtzusammensetzung ausmacht.^{56,57}

Im Gegensatz dazu enthält ein Mastfutter für Zander weniger Komponenten (in alphabetischer Reihenfolge): Fischmehl, Fischöl, Getreideprodukte, pflanzliche Proteine sowie Vitamine und Mineralstoffe. Die pflanzlichen Proteine und Öle in diesem Futter stammen oft aus Quellen wie Soja, Raps, Sonnenblumen und anderen Leguminosen. Aufgrund der gestiegenen Nachfrage nach Fischerzeugnissen in den letzten Jahrzehnten hat sich der Bedarf an Fischmehl und -öl erhöht, was zu steigenden Preisen geführt hat. Aus diesem Grund gibt es seither Bestrebungen, den Anteil an Fischmehl und Fischöl in den Futtermitteln weiter zu reduzieren oder sogar gänzlich zu ersetzen.⁵⁰⁻⁵²

Das Mastfutter für Regenbogenforellen weist im Vergleich zum Zandermastfutter einen geringeren Rohproteingehalt auf, verfügt jedoch über einen höheren Gehalt an Kohlenhydraten und Rohfett (Tabelle 2). Darüber hinaus sind Spezialfutter erhältlich, die beispielsweise die äußere Erscheinung der Fische beeinflussen. Solche Futtermittel enthalten eine erhöhte Konzentration an Carotinoiden, die die Pigmentierung der Fischhaut oder des Fleisches verändern. Sie finden Anwendung in der Haltung von Zierfischen oder Speisefischen wie Lachsforellen.⁵⁸

In Abschnitt 4.2 wurden bereits Regulierungen von ökologischen/biologischen Erzeugnissen aus Aquakulturen erwähnt. So wird u.a. die Besetzdichte, sowie detaillierte Kriterien zur Produktion und zu Haltungssystemen (z.B. Erdteiche) in der DVO 2020/464 näher beschrieben.¹⁶ In der VO 2018/848 wird in Artikel 6, Artikel 9, Artikel 11 und Artikel 16 i.V.m. Anhang II Teil III und IV auf die Produktionsvorschriften von Tieren aus ökologischen/biologischen Aquakultur eingegangen.¹⁵ So dürfen bei der Herstellung z.B. nur pflanzliche Zutaten, die aus der ökologischen Landwirtschaft stammen, verwendet werden und keine gentechnisch veränderten Organismen.¹⁵ Nicht karnivore Fische sind auf das natürlich vorkommende Nahrungsangebot ihres Habitats angewiesen. Erst wenn dieses nicht

Tabelle 2 Nährwertdeklaration von jeweils zwei Mastfuttern für Regenbogenforellen und Zander (Alleraqua und Biomar) mit einem Durchmesser von 6 mm ⁵⁰⁻⁵²

	Forelle		Zander	
	Efico Enviro 9320 Advanced – Biomar	Aller Amber Regenbogenforelle – Aller Aqua	Efico Sigma 970 – Biomar	Aller Ivory Ex – Aller Aqua
Rohprotein [%]	38-41	40	54	54
Rohfett [%]	31-34	28	20	20
Kohlenhydrate (NfE) [%]	12,1-18,1	18,4	11,4	8,2
Rohzellulose [%]	0,9-2,8	2,1	0,9	0,9
Asche [%]	4,1-6,1	5,6	9,3	8,9
Totaler Phosphor [%]	0,9	1,0	1,5	1,1
Bruttoenergie [MJ]	24,4-26,4	24,0	22,4	22,2

ausreichend ist, dürfen ökologische/biologische Futtermittel zur Zufütterung eingesetzt werden.⁵⁹⁻⁶¹ Bei der Verwendung von Fischmehl und Fischöl (Anhang II Abschnitt II Nr. 3.1.3.3. der VO 2018/848) in der Fütterung von karnivoren Aquakulturtieren dürfen diese aus folgenden Quellen stammen: aus Überresten der Verarbeitung von Fischereierzeugnissen aus der Aquakultur; aus Überresten nachhaltiger Fischerei, welche für den menschlichen Verzehr geeignet ist und aus ganzen Fischereierzeugnissen, die nicht für den menschlichen Verzehr bestimmt sind.¹⁵ Darauf basierend haben die einzelnen Ökoverbände weitere Richtlinien verfasst, um ihre Prinzipien zur nachhaltigen Aquakultur durchzusetzen.^{60,61}

4.5.2. Fischmehl und Fischöl

Fische sind als Kaltblüter wechselwarme Lebewesen. Sie verwenden die aufgenommene kalorische Energie nicht zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, sondern setzen diese nahezu ausschließlich für ihr Wachstum ein.^{19,62} Fische verwerten Proteine und Fette effizienter als Kohlenhydrate, welche sie artspezifisch in unterschiedlichem Maße verdauen können.¹⁹ Fischmehl und Fischöl sind begrenzt verfügbare Rohstoffe, die hauptsächlich aus Proteinen und Fetten bestehen. Sie finden vorwiegend Verwendung in Futtermitteln für Fische und andere Tierarten wie Schweine und Geflügel.

Fischmehl zeichnet sich durch einen hohen Proteingehalt und eine hohe biologische Wertigkeit ihrer Aminosäurezusammensetzung aus. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich Fischöl durch sein Fettsäureprofil, insbesondere durch das Vorkommen essenzieller, mehrfach ungesättigter Fettsäuren, von anderen pflanzlichen Fetten.^{57,63} Besondere Bedeutung kommt dabei den Omega-3-Fettsäuren wie α -Linolensäure (ALA), Docosahexaensäure (DHA) und Eicosapentaensäure (EPA) sowie den Omega-6-Fettsäuren wie Linolsäure, γ -Linolensäure und Arachidonsäure zu. In der Humanernährung sind diese mehrfach ungesättigten Fettsäuren von großer Bedeutung und dienen unter anderem als Antioxidantien, als Vorstufen von körpereigenen Entzündungshemmern wie Eicosanoiden oder als Bestandteil von Phospholipiden in Zellmembranen.²

Diese Rohstoffe werden in der Regel aus Wildfängen gewonnen, wobei pelagische und bodenlebende Fischarten, die üblicherweise nicht für den direkten menschlichen Verzehr geeignet sind oder verwendet werden, häufig als Quelle dienen. Darüber hinaus stammen geringe Mengen aus der Verarbeitung von Fischereierzeugnissen sowie Verschnitten oder Beifängen.^{56,57,64} Ausgehend von 100 kg Rohstoff werden etwa 21 kg Fischmehl und 3 bis 6 kg Fischöl erzeugt.⁶⁵

Die weltweite Produktion von Fischereierzeugnissen und Aquakulturprodukten hat sich in den letzten 30 Jahren nahezu verdoppelt (1990: etwa 110,7 Mio. Tonnen Lebendgewicht; 2020: 177,8 Mio. Tonnen Lebendgewicht).³ Um die Wirtschaftlichkeit der Aquakultur zu sichern und auszubauen, steigt die Nachfrage nach geeignetem Futter, weswegen Fischmehl und Fischöl vermehrt benötigt werden.^{66,67} Das Abfischen aquatischer Lebewesen zur Herstellung von Fischmehl und Fischöl beeinträchtigt erheblich die Ökosysteme und führte zur Überfischung verschiedener Fischarten.^{66,67} Die Produktion von Fischmehl und Fischöl schwankt von Jahr zu Jahr, abhängig von den gefangenen Fischarten.³ Im Jahr 2020 betrug die Fischmehl- und Fischölproduktion etwa 9% der Gesamtproduktion von Fischereierzeugnissen weltweit, was etwa 16 Mio. Tonnen entspricht. Davon werden 86% des Fischmehls und 73% des Fischöls in der Aquakultur verwendet. Die verbleibenden Mengen an Fischmehl und Fischöl finden unter anderem Verwendung in der Tierernährung (für Schweine und Geflügel) sowie in der menschlichen Ernährung als Nahrungsergänzungsmittel.³ In der Europäischen Union werden jährlich etwa 0,40 – 0,60 Mio. Tonnen Fischmehl und 0,12 – 0,20 Mio. Tonnen Fischöl produziert. Zwischen 2009 und 2020 nahm der Verbrauch von Fischmehl in der EU um etwa 40% ab, rund 0,45 Mio. Tonnen.^{3,65}

Ein weiteres Problem im Zusammenhang mit Fischmehl und Fischöl ist deren Preis. Bis 2006 lag der Preis für eine Tonne Fischmehl im Durchschnitt bei etwa 400 – 500 US-Dollar. Im Jahr 2007 kam es zu einem ersten Preisanstieg, der erstmals die Marke von 1.000 US-Dollar pro Tonne Fischmehl überschritt. Dieser Preisanstieg setzte sich fort und erreichte im Februar 2013 seinen Höhepunkt von 1.900 US-Dollar. Seitdem liegt der durchschnittliche Preis für Fischmehl bei etwa 1.500 US-Dollar.⁶⁸

Für eine nachhaltige Aquakultur sind innovative Ansätze erforderlich, um Fischmehl und Fischöl ganz oder teilweise zu substituieren.⁶⁹ Viele Kombinationen von Zutaten wurden bereits getestet, um den Mangel an essenziellen Nährstoffen aus diesen Ressourcen auszugleichen oder um einen zusätzlichen Mehrwert zu generieren. Darüber hinaus ist der Geschmack des Futters nicht zu vernachlässigen, denn auch Fische fressen nicht alles. Tabelle 3 zeigt eine Auswahl verschiedener Ansätze, darunter viele pflanzenbasierte Alternativen, einschließlich Algen, sowie Reststoffe aus verschiedenen Industrien. In den letzten Jahrzehnten wurde vermehrt auf verschiedene Mikroorganismen gesetzt, da diese kosteneffizienter als Fische produziert werden können und somit eine Möglichkeit zur Reduzierung des Drucks auf die natürlichen Bestände bieten.^{54,70–109}

Das Problem geeignete Fischmehl- und Fischölsubstitute zu finden, besteht weiterhin. Die Forschung hat bereits vielversprechende Ansätze gezeigt (Tabelle 3), jedoch hat sich bis heute keines der Konzepte in der Aquakulturpraxis etabliert.^{54,70–109}

Tabelle 3 Auszug von bereits verwendeten Ersatzstoffen bzw. Zutaten bei der Fütterung von verschiedenen aquatischen Spezies ^{54,70–110}

Art	Ersatzstoff/Zutat	Referenz
Atlantischer Lachs (<i>Salmo salar</i>)	Leindotteröl und -mehl, Erbsenproteinkonzentrat, <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Tetraselmis chuii</i> , <i>Arthrospira platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i>	70–72,110
Brasse (<i>Rhabdosargus sarba</i> und <i>Sparus aurata</i>)	<i>Spirulina</i> sp., Pflanzenproteinmischungen	73,74
Garnelen (<i>Litopenaeus vannamei</i> und <i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	Verschiedene Mikroorganismen (<i>Haematococcus pluvialis</i> , <i>Thalassiosira weissflogii</i> , <i>Nannochloropsis</i> sp, <i>Spirulina platensis</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> and <i>Azolla pinnata</i>), Süßlupinenmehl, Reisproteinkonzentrat, Sojaöl, Geflügelfett und Leinsamenöl	75–81
Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	<i>Spirulina platensis</i>	82
Königsbarsch (<i>Rachycentron canadum</i>)	Sojamehl, Hefeprotein	83–85
Muscheln (<i>Haliotis laevis</i> , <i>Mercenaria mercenaria</i> und <i>Panopea generosa</i>)	<i>Dunaliella salina</i> , <i>Arthrospira maxima</i> , <i>Ulva lactuca</i> , <i>Spyridia filamentosa</i> , <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Spirulina</i> sp., <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Chaetoceros gracilis</i>	86–88
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Pflanzen und Pflanzenextrakte (Maca, Erbsen-, Ackerbohnen- und Rapspflanzenprotein, Sojaproteinkonzentrat, Mandeln, Pistazien), Farbstoffe (Astaxanthin, Canthaxanthin, Annatto), verschiedene Mikroorganismen (<i>Phaffia rhodozyma</i> , Bäckerhefe, <i>Spirulina platensis</i> , <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> , Algen), Insektenmehl (<i>Hermetia illucens</i> und <i>Tenebrio molitor</i>)	89–100
Rote Goldbrasse (<i>Pagrus major</i>)	Leindotteröl	101
Stachelmakrele (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Pflanzenöl (Raps- und Palmöl), Algenmehl (<i>Aurantiochytrium</i> sp.)	102
Steinbutt (<i>Psetta maxima</i>)	Extrudierte Lupinen- und Rapssaatmehl, Sojabohnen- und Leinsamenöl	103,104
Schnapper (<i>Lutjanus guttatus</i>)	Sojamehl	105
Tilapia (<i>Oreochromis</i> spp.)	Fischereinebenprodukte, Wasserpflanzen, Nebenprodukte der Landtierindustrie, Ölsaaten, Getreide, <i>Spirulina platensis</i> , <i>Schizochytrium</i> sp., <i>Nannochloropsis oculata</i>	106–108
Wolfsbarsch (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Pflanzenmehle und -öle, Mikroorganismenmehle, Hefen	54,109

4.5.3. Mikroorganismen

Mikroorganismen (MO) haben aufgrund ihrer vielfältigen Zusammensetzung ein großes Potential, Fischmehl und Fischöl in Fischfuttermitteln zu ersetzen. MO sind in der Regel mikroskopisch kleine Einzeller, die sowohl Prokaryoten als auch Eukaryoten umfassen. Zu den MO gehören Algen, Bakterien (genauer Archaea- und Eubacteria), Pilze (einschließlich Hefen und Schimmelpilze), Protozoen und Viren. MO verfügen über verschiedenste Eigenschaften: manche haben negative Effekte auf ihre Umgebung, indem sie Lebensmittel verderben oder Gesundheitsgefahren durch Toxine verursachen; andere haben positive Effekte, indem sie Nährstoffe freisetzen bzw. umwandeln. Diese Wirkungen werden seit Jahrtausenden zur Herstellung verschiedener Lebensmittel genutzt wie bei Bier, Essig, Käse, Salami und Sauerkraut sowie in der Futtermittelherstellung für beispielsweise Silage. Die Kultivierung von MO erfolgt durch die Optimierung der Verfahrenstechnik einfach und effizient. Die so erhaltenen Inhaltsstoffe und Stoffwechselprodukte stehen daher seit längerem im Fokus, potentielle Quellen für gesundheitsfördernde Substanzen für Mensch und Tier zu sein.^{111,112}

Die EU reguliert die Verwendung von MO sowohl als Futtermittel gemäß VO (EG) Nr. 767/2009 (Inverkehrbringen und Verwendung von Futtermitteln) als auch als Futtermittelzusatzstoffe gemäß VO (EG) Nr. 1831/2003 in Verbindung mit Anhang 1.^{113,114} In der Positivliste der Einzelfuttermittel werden unter Punkt „08. Andere Pflanzen, deren Erzeugnisse und Nebenerzeugnisse“ Zutaten wie Seealgenmehl, Spirulina-Algen, Chlorella-Algen, *Schizochytrium limacinum*-Algen und Tetraselmis-Algen aufgeführt. Darüber hinaus sind verschiedene andere MO unter Punkt „14. Proteinerzeugnisse aus Mikroorganismen“ aufgeführt, darunter *E. Coli*, Hefen und andere Pilze. Diese Produkte können auch in Mischfuttermitteln kombiniert werden, da Mischfuttermittel als „[...] eine Mischung aus mindestens zwei Einzelfuttermitteln, mit Futtermittelzusatzstoffen oder ohne Futtermittelzusatzstoffe [...]“ definiert sind.¹¹³ Darüber hinaus sind im europäischen Futtermittelregister (*englisch: Feed Material Register*, Tabelle 4) registrierte Futtermittelrohstoffe aufgeführt, auch hier sind verschiedene MO gelistet.¹¹⁵

Die Verwendung von MO in der Aquakultur zielt darauf ab, positive Effekt auf die aufgezogenen Organismen oder deren Umgebung zu erzielen. Seit vielen Jahrzehnten werden Binnenfische mit PUFA-angereichertem Futter gefüttert, um einen zusätzlichen Mehrwert in der Humanernährung zu bieten. Darüber hinaus werden Mikroalgen verwendet, um die Fleischfarbe der Fische zu modifizieren oder zu intensivieren.⁵⁸

Um Fischmehl und Fischöl vollständig durch MO zu ersetzen, ist es erforderlich, dass die eingesetzten Organismen einen entsprechenden Anteil an Proteinen und Fetten haben. Die Metabolisierung der wertgebenden Nährstoffe wiederum ist abhängig von der Produktionsweise, der Prozessführung und den verwendeten Substraten.

Tabelle 4 Übersetzung aus dem Englischen - Auszug aus dem EU Futtermittelregister nach ¹¹⁵ Stand 14. Mai 2024.

Zutatenbezeichnung	Beschreibung
Chlorella Alge	Getrocknete <i>Chlorella pyrenoidosa</i> (Grünalge) als mikrofeines Pulver
Prozessierte Braunalgen	Erzeugnis, das durch die Verarbeitung von Meeresalgen, insbesondere der Braunalgenart <i>Padina</i> , gewonnen wird
Meeresalgenmehl	Erzeugnis, das durch chemische Hydrolyse von Meeresalgen, insbesondere Braunalge <i>Ascophyllum nodosum</i> und Rotalgen gewonnen wird
Spirulysat	Spirulysat; Bezeichnung für einen kalten Extrakt aus frischen Spirulina-Mikroalgen (<i>Arthrospira platensis</i>), der reich an Phycocyanin ist, dem blauen Fotopigment, das von den Algen für ihren internen Prozess der Fotosynthese verwendet wird; Kein Lösungsmittel (außer Wasser)
<i>Haematococcus pluvialis</i> Zellen	Aus <i>Haematococcus pluvialis</i> -Algen gewonnene Biomasse, die als hochwertiges Futtermittel verwendet wird
Spirulina, getrocknet	Getrocknete Alge; Mikroalge der Arten <i>Spirulina maxima</i> und <i>Spirulina platensis</i> ; Rohasche
AFA8000-Yarrowii Fermentierte Pflanzen	Carotinoidhefen, wie <i>Yarrowia Lipotica</i> Erzeugnis, das durch Fermentation von Alkohol-, Essigsäure und Milchsäuregärung aus einer ganzen getrockneten Pflanze gewonnen wird, deren Produktion auf Saccharose vergärende Hefen zurückzuführen ist

4.5.4. Cyanobakterien und Algen

Algen werden in der Regel aufgrund ihrer äußeren Merkmale, wie ihrer Größe (Mikro- oder Makroalgen) und ihrer Farbe (Braun-, Rot- und Grünalgen), näher klassifiziert.¹¹⁶ Mikroalgen umfassen ein- und mehrzellige Organismen, die sich in Bezug auf ihre Morphologie (Größe, Pigmentierung, Zellwandaufbau), ihren Stoffwechsel (aerobe, anaerob, photosynthetisch, nicht-photosynthetisch), ihrem Lebensraum (Süßwasser, Salzwasser, Luft oder auch Bodenalgen) und daraus resultierend ihrer allgemeinen Zusammensetzung erheblich unterscheiden.¹¹⁷ Aufgrund ihrer blau-grünen Erscheinung, ihrer Größe und Form werden Cyanobakterien ebenfalls häufig als Mikroalgen bezeichnet.¹¹⁶ Mikroalgen sind potentielle Rohstoffquellen für verschiedene bioaktive Substanzen sowie primäre und sekundäre Metabolite. Daher sind der Proteingehalt, der Fettgehalt, das Fettsäureprofil (hohe Gehalte an Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren) oder auch Vitamine hier von besonderem Interesse für verschiedene Branchen (Lebensmittel, Futtermittel, Kosmetik, Pharmazie und Chemie). Derzeit werden nur wenige Arten kommerziell genutzt, dazu gehören z.B. *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* und *Spirulina*.^{118–120} Kommerziell erhältliche Mikroalgen werden in getrockneter Form als Pulver oder Kapseln vermarktet.

Grünalgen sind Eukaryoten und gehören zur Untergruppe Chlorophyta. Diese Algen zeichnen sich durch Merkmale wie den Chloroplasten, Zellkerne und zellulosehaltige Zellwände aus. Diese Algen erscheinen grün, da sie durch die Kombination der enthaltenen Chlorophylle

(*Chlorophyll a* und *Chlorophyll b*) in ihren Plastiden (Chloroplasten) grünes Licht reflektieren. Ihre Morphologie ist mannigfaltig von kugelförmig bis zu Stäbchen und sie treten einzeln oder in Aggregationsverbänden auf. Bekannte Süßwasservertreter sind *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus* sp.^{121,122}

Eine weitere Gruppe sind die Rotalgen, die sich von den Grünalgen unter anderem durch ihre Plastidpigmente unterscheiden. Die Plastiden der Rotalgen, auch Rhodoplasten genannt, verleihen ihnen ihre rote Färbung. Darüber hinaus enthalten sie *Chlorophyll a*, Carotinoide und Phycobiline und nutzen diese zur Photosynthese.¹²³

Cryptocodinium cohnii (*C. cohnii*) sind marine heterotrophe Eukaryoten und gehören zu den Dinoflagellaten, welche den symbiontischen Rotalgen zugeordnet werden.^{124,125} Der Fettanteil von *C. cohnii* beträgt mehr als ein Fünftel ihrer Trockenmasse, wobei sie große Mengen an Docosahexaensäure (DHA) produzieren, bis zu 30-50% des Gesamtfettgehalts.^{124,126} *C. cohnii* ist nicht auf Photosynthese angewiesen, so konnte in den letzten Jahrzehnten die Zelldichte im Labormaßstab durch die Verwendung von Bioreaktoren und verschiedene Kohlenstoffquellen auf bis zu 100 g/L gesteigert werden.^{126,127}

Cyanobakterien haben eine blau-grüne Erscheinung, aufgrund dieser sie früher fälschlicherweise als „Blualgen“ bezeichnet wurden. Sie sind photosynthetische Prokaryoten, die neben *Chlorophyll a* auch Phycocyanin als akzessorisches Pigment verwenden. Die Morphologie von Cyanobakterien ist ebenfalls vielfältig, von einzelnen Zellen bis zu Aggregationen, die sich faden-, kugel- oder stäbchenförmig anordnen. Sie unterscheiden sich von Grünalgen durch ihre Zellmembran, die aus vier Schichten besteht, deren Hauptbestandteil u.a. Peptidoglucane sind und keine zellulosehaltigen Zellwände besitzen.^{128–130}

Die bekanntesten Vertreter der Cyanobakterien sind die Gattungen *Spirulina* sp. und *Arthrospira* sp., die oft fälschlicherweise synonym verwendet werden. Sie unterscheiden sich in Merkmalen wie der Struktur ihrer interzellulären Septen, der Verteilung von Poren in den Zellwänden und der Ausprägung ihrer Helixwindungen. In jüngerer Zeit wurde festgestellt, dass *Spirulina platensis* und *Spirulina maxima* genetisch eher zur Gattung *Arthrospira* zu zuordnen sind.^{129,131}

In dieser Arbeit wird daher folgend der Begriff „*Arthrospira* sp.“ verwendet. *Arthrospira* sp. enthält etwa 58 bis 73% Proteine und 6 bis 8% Fett in der Trockenmasse. Darüber hinaus sind sie reich an Pigmenten, Vitaminen, PUFA und Antioxidantien.^{80,94,95,97,128,131–134}

4.5.5. Fetthefen

Hefen sind ubiquitäre eukaryontische Organismen, die zur Gruppe der Pilze gehören. Diese lassen sich in die Abteilungen Ascomyceta und Basidiomyceta teilen. Viele Hefen sind fakultativ anaerob und nutzen vielfältige Kohlenstoffquellen, was zu einer Vielzahl an Stoffwechselprodukten führt.¹³⁵ Diese Eigenschaften haben in verschiedenen Industriezweigen, darunter Lebensmittel, Futtermittel, Pharmazie und Chemie, Anwendung gefunden. Beispiele hierfür sind die Produktion von Bio-Alkoholen und alkoholische Getränke durch *Saccharomyces cerevisiae*, die Herstellung von Weichkäse oder Salami durch *Penicillium camemberti* oder die Produktion von Antibiotika durch *Penicillium notatum*. Hefen sind auch

wichtige Quelle für Proteine, Fette (inkl. PUFA), Vitamine oder Polysaccharide wie β -Glucane, die bereits in Futtermischungen verwendet werden (Tabelle 4).

Sogenannte „Fetthefen“ wie *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, und *Lipomyces lipofer* bilden außergewöhnlich hohe Lipidgehalte (> 20% Trockenmasse). Studien haben gezeigt, dass *Yarrowia lipolytica* sogar Gehalte bis zu 80% ihrer Trockenmasse produzieren kann.^{136,137} Diese Hefen eignen sich daher zur Einbringung von den genannten Nährstoffen in Futtermittel und somit zur Verbesserung der Fischgesundheit.^{138,139} Süßwasserfische können anschließend die Linolensäure der Hefen in PUFA umwandeln.^{62,138–140} *Rhodotorula glutinis* (*R. glutinis*), als eben solch eine Fetthefer, gehört zur Ordnung der Sporidiobolales, zur Klasse der Microbotryomyceten und zum Stamm der Basidiomyceta. *R. glutinis* wurden bereits aus Ozeanen, Gewässern, Böden, Gras, Luft, menschlicher Haut und Fäkalien isoliert.^{140,141} Die Zellen dieser Hefe sind kugelförmig bis länglich geformt und erscheinen aufgrund ihrer Carotinoid-Gehalte rot bis gelblich.^{140–142} *R. glutinis* ist bekannt für seine hohen Gehalte an β -Carotin, Lipiden, Proteinen und Vitaminen.^{143,144} Diese Spezies kann Lipidgehalte von über 60% ihrer Trockenmasse produzieren, wobei die vorherrschenden Fettsäuren Palmitinsäure (10-30%), Ölsäure (> 60%), Linolsäure (5-25%) und Linolensäure (6-8%) sind.^{140,145} Diese Eigenschaften machen *R. glutinis* zu einer vielversprechenden Zutat, als Substitut für Fischmehl und -öl.

4.6. Instrumentelle Analytik und Statistische Datenanalyse

Die allgemeinen Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung entsprechen den gängigen Analyseverfahren zur Aufklärung von Naturstoffen. Lesern mit Interesse an der Lebensmittelanalytik, Chromatographie, Massenspektrometrie und photometrischen Methoden wird empfohlen, sich beispielsweise die Bücher „Lebensmittelanalytik“ oder „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalysen, Applikationen“ zu konsultieren.^{1,2,146,147} Die verwendeten Analysemethoden können den Publikationen aus Kapitel 6 entnommen werden. Aufbau und Funktionen der jeweiligen Geräte werden daher nicht genauer erläutert. Diese Informationen können ebenfalls der jeweiligen Publikation (Kapitel 6) und in einschlägig bekannter Literatur nachgeschlagen werden. Zur Beurteilung der Parameter bezüglich der Qualität der Fische während der Fischhaltung wird z.B. „Das Lehrbuch der Teichwirtschaft“ empfohlen.¹⁹

5. Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Verwendung von Fischmehl und Fischöl stellt die Aquakultur vor ökologische und ökonomische Herausforderungen. Die steigenden Kosten für diese Zutaten in den letzten 20 Jahren und ihre nicht-nachhaltige Gewinnung erfordern die Entwicklung einer innovativen Lösung. Bisherige Versuche, Pflanzen und Mikroorganismen (z.B. Zooplankton, Pilze und Bakterien) als Ersatz zu verwenden, führten zumeist zu unzureichender Nährstoffversorgung und minderer Qualität der erzeugten Fische. Dieses Problem erfordert eine umfassende Untersuchung, um eine nachhaltige Alternative zu entwickeln, die nicht nur die Kosten senkt, sondern auch eine hochwertige Ernährung für die Fische und nachfolgend auch für die Menschen gewährleistet.^{148,149}

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Frage, ob eine Teilsubstitution (50%) von Fischmehl und Fischöl in Futtermitteln durch eine Mischung verschiedener Mikroorganismenbiomassen zu Fischen bzw. Fischfilets gleichwertiger Qualität führt, wie es durch konventionelle Fischfuttermittel i.d.R. der Fall ist. Die Nährstoffzusammensetzung des Fischfuttermittels sollte sich hierbei an die Mastphase bei der Haltung von Zander und Regenbogenforellen richten.

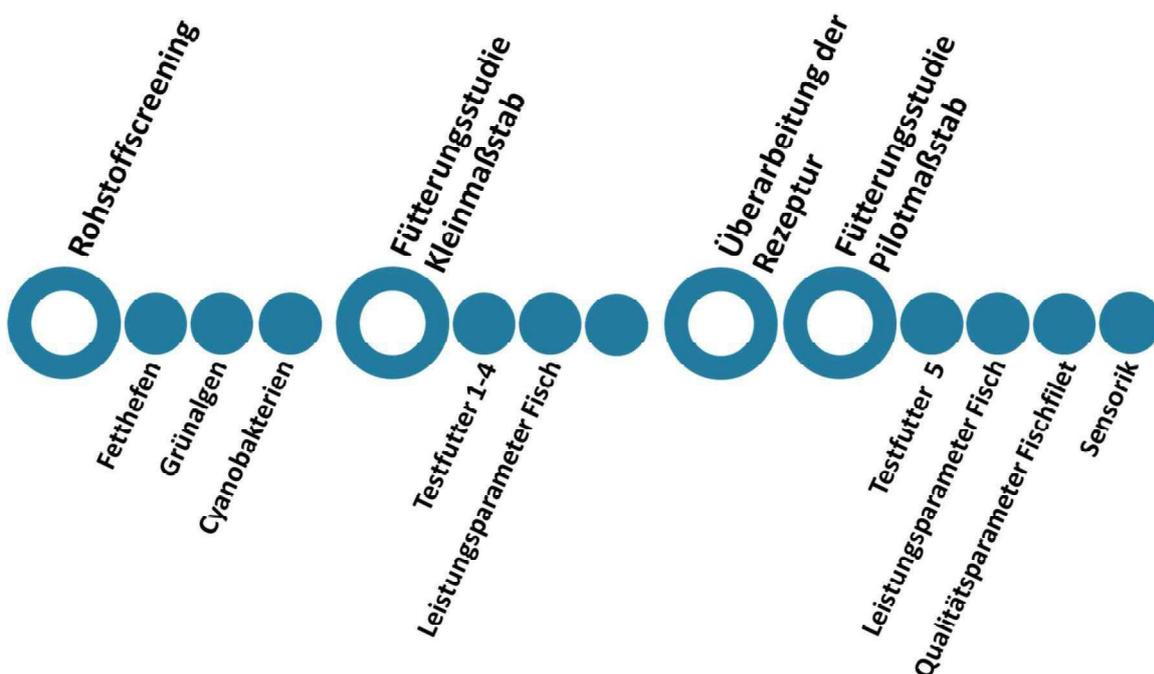


Abbildung 3 Beschreibung der Futtermittelentwicklung.

Die Entwicklung dieses Futtermittels sollte über einen mehrstufigen Prozess erfolgen (Abbildung 3). Konkret sollten folgende Aspekte betrachtet werden:

1. Rohstoffscreening

Zunächst wurden die Rohstoffe charakterisiert und MO ausgewählt, um die Protein- und Lipidlücke auszugleichen, die durch die Reduktion entstanden sind. Hierfür sollten die Grundzusammensetzung und die antioxidative Aktivität der Mikroorganismen untersucht werden.

2. Fütterungsstudie Kleinmaßstab

Um sicherzustellen, dass die Verwendung der Futtermittelmischungen hochwertige und gesunde Fische hervorbringt, sollten zunächst umfangreiche Studien im Kleinmaßstab an Regenbogenforellen und Zandern durchgeführt werden. Hierfür sollten vier Mischungsverhältnisse der MO im Futter über etwa 60 Tage an ca. 150 Individuen pro Spezies getestet und mit zwei weiteren Futtermitteln (Standard- und Kontrollfutter) verglichen werden. Diese Vergleichsfuttermittel sollen sowohl Aussagen über den Einfluss der Mikroorganismen als auch die gewählte Futtermittelrezeptur ermöglichen. Zunächst sollte untersucht werden, ob beide Spezies die Futtermittel annehmen. Darauf aufbauend sollten der Einfluss des Mischungsverhältnisses der Mikroorganismen auf die Wachstumsleistung und die Qualitätsparameter der Fische vergleichend untersucht werden. Zu diesen Parametern gehörten u.a. Gewichts- und Größenzunahme, Futterquotient, Lebergewicht und -farbe genauso wie der Protein- oder Fettgehalt. Für die Entwicklung eines erfolgreichen Futtermittels sollte zusätzlich die antioxidative Aktivität und das Fettsäureprofil untersucht werden. Am Ende des Studienzeitraums sollte zusätzlich die Filetfarbe bewertet werden.

3. Rezepturüberarbeitung

Die gewonnenen Erkenntnisse der Studie im Kleinmaßstab bildeten die Grundlage zur Entwicklung der finalen Futtermittelrezeptur. Die Herstellung des Futtermittels erfolgte mittels Extrusion, einem Prozess, bei dem verschiedene Kräfte (besonders Temperatur und Druck) auf die Rohstoffmischung wirken, um Pellets zu formen. Diese Kräfte haben einen beträchtlichen Einfluss auf die Inhaltsstoffe des Futtermittels wie den Vitaminen oder Antioxidantien. Daher sollte auch untersucht werden, ob es Veränderungen in der antioxidativen Aktivität auf dem Weg vom Rohstoff zum fertigen Pellet gibt.

4. Fütterungsstudie Pilotmaßstab

In der Pilotstudie wurden ebenfalls Regenbogenforellen und Zander untersucht, wobei der Untersuchungszeitraum etwa vier Monate betrug und ca. 400 Individuen pro Spezies untersucht wurden. Diese Individuen wurden in jeweils zwei Becken pro Futtergruppe (Standard-, Kontroll- oder Testfutter) aufgeteilt. In dieser Studie wurden ebenfalls die gleichen Wachstums- und Qualitätsparameter wie in der Studie im Kleinmaßstab untersucht. Neben der optischen Bewertung sollte darüber hinaus ein Sensorikpanel die Fischfilets bewerten und vergleichend einordnen. Dies sollte der Prüfung dienen, ob sensorische Auffälligkeiten durch das neue Futtermittel auftreten und mögliche Verbraucher vom späteren Kauf abhalten könnten.

6. Kumulativer Teil der Dissertation

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation in Form von wissenschaftlichen Originalpublikationen dargelegt. Diese wurden in den Fachzeitschriften *European Food Research and Technology*, *Aquaculture* und *Foods* in den Jahren 2018 bis 2021 publiziert.^{150–152}

Die jeweiligen Mitwirkenden sind in den Autorenangaben aufgeführt, ebenso wie die Zusammenarbeit mit anderen Instituten.

Die Veröffentlichungen umfassen die Etappen zur Entwicklung eines geeigneten Fischfuttermittels mit einem teilsubstituierten Fischmehl- und Fischölanteil, welcher durch eine Mischung verschiedener Mikroorganismenbiomassen ersetzt wurde. Der erläuterte Prozess (Abbildung 3) begann mit der Auswahl der ersten Testfutter und wurde weitergeführt in ihrer Verwendung in einer kleinen Fütterungsstudie über ca. 60 Tage an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Zander (*Sander lucioperca*) (Publikation I). Aus den Erkenntnissen der Wachstumsleistung wurde die Zusammensetzung des finalen Futters abgeleitet. Weiterhin wurde die Veränderung der antioxidativen Aktivität der einzelnen Rohstoffe über verschiedene Verarbeitungsschritte bis ins fertige Futter untersucht (Publikation II). Dieses Futtermittel fand anschließend Verwendung in einer viermonatigen Pilotstudie mit einer Anzahl von ca. 400 Testindividuen. Nachfolgend wurden die Wachstumsleistungen der Regenbogenforellen (Publikation II) und Zander (Publikation III) mit verschiedenen Qualitätsmerkmalen der Fischfilets korreliert. Abschließend wurden die Ergebnisse der sensorischen Beurteilung der Fischfilets beider Spezies dargestellt und im Verbraucherkontext eingeordnet (Publikation III).

6.1. Partial fishmeal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*) (Publikation I)

Partial fishmeal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and pike-perch (Sander lucioperca)

Michaela Schafberg, Karin Loest, Ute Meister, Elke Kurth, Andreas Müller-Belecke, Sascha Rohn

European Food Research and Technology **2018**, 244, 127-143

Impact Factor: 2.06 (2018)

DOI: [10.3390/foods10081799](https://doi.org/10.3390/foods10081799)

Synopse

Die Verwendung von Fischmehl und Fischöl in Fischfutter wird aufgrund folgender Aspekte als nicht nachhaltig angesehen. Fischmehl und -öl werden oft aus Wildfängen oder Beifang hergestellt. Da große Mengen für die Aquakultur benötigt werden, ist bereits ein eigener Industriezweig entstanden. Die intensive Fischerei nutzt für die Herstellung von Fischmehl und Fischöl unter anderem kleine, ölfreiche Arten. Dieses Abfischen hat negative Auswirkungen auf die Ökosysteme und die Artenvielfalt. Fischmehl und Fischöl sind wichtige Quellen für (essenzielle) Aminosäuren und Fettsäuren, die für das Wachstum und die Gesundheit der Fische unverzichtbar sind. Die Mengen, die zur ausschließlichen Fütterung mit Fischmehl und Fischöl in der Aquakultur benötigt werden, können nicht durch die Fischerei abgedeckt werden. Die Verwendung von Fischmehl und Fischöl in Fischfutter führt daher zu einem zusätzlichen Rohstoffwettbewerb zwischen Futtermittelindustrie und menschlicher Ernährung. In Anbetracht dieser Herausforderungen widmen sich bereits seit Jahrzehnten zahlreiche Studien mit der Erforschung von nachhaltigen Alternativen, wie beispielsweise pflanzliche Proteine und Öl oder auch Algen.

Gegenstand der vorliegenden Publikation ist eine Studie zur teilweisen Substitution von Fischmehl und Fischöl durch eine Mischung aus Mikroorganismenbiomassen. Diese Studie untersucht die Auswirkungen von vier Testfuttern mit unterschiedlichen Verhältnissen der Mikroorganismen zueinander auf die Wachstumsparameter und die Nährstoffzusammensetzung von Regenbogenforellen und Zandern. Das Ziel war das optimale Mischungsverhältnis von *Arthrospira* sp., *Rhodotorula glutinis*, *Cryptocodinium cohnii* im Fischfutter zu ermitteln, um die Hälfte des Fischmehl- und Fischölteils zu ersetzen. Zu diesem Zweck wurden diese vier Testfutter mit einem konventionellen Standardfutter und einer weiteren Kontrolle verglichen. Hierfür wurden verschiedene Kriterien wie Wachstums- und Schlachtkörperparameter, aber auch chemisch-analytische Parameter wie antioxidative Aktivität oder Carotinoidgehalt festgelegt. Mit Hilfe dieser Kleinstudie konnten Aussagen über das mögliche optimale Mischungsverhältnis, über die Futterakzeptanz der Fische und Qualitätsunterschiede der Fischfilets gemacht werden.

Die Arbeiten dieser Publikation wurden in Kooperation mit verschiedenen Einrichtungen durchgeführt: Das Institut für Getreideverarbeitung GmbH (IGV) kultivierte die

Cyanobakterien „*Arthrospira* sp.“. Am Institut für Angewandte und Molekulare Mikrobiologie der Technischen Universität Berlin wurde die Fettheife „*Rhodotorula glutinis*“ kultiviert. Das Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Berlin kultivierte die Rotalge „*Cryptothecodinium cohnii*“. Die Testfutter und ein Vergleichsfutter wurden am IGV hergestellt. Die Fütterungsstudien sowie die Aufnahme der Wachstums- und Schlachtkörperparameter wurden am Institut für Binnenfischerei Potsdam-Sacrow (IfB) durchgeführt.

Die Analytik und die statistische Auswertung wurden an der Universität Hamburg am Institut für Lebensmittelchemie in Hamburg durchgeführt. Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 40% angegeben.

This article was originally published in *European Food Research and Technology*, 244, 127-143 by Schafberg, M., Loest, K., Meister, U., Kurth, E., Müller-Belecke, A. & Rohn, S., Partial fishmeal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*), 2018, Copyright Springer Nature (2017), <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-017-2939-6>

Partial fishmeal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*)

Michaela Schaffberg¹ · Karin Loest² · Ute Meister² · Elke Kurth³ ·
Andreas Müller-Belecke⁴ · Sascha Rohn^{1,3}

Received: 17 January 2017 / Revised: 9 June 2017 / Accepted: 24 June 2017
© Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract Fishmeal and oil are regarded as byproducts resulting from fish processing. However, the procedures are hypothesized to be an ecological harm for maintaining the balance of the aquatic ecosystems. This study aimed at characterizing an innovative algae–yeast mix for a partial substitution of fishmeal and oil in fish feed. The microorganism mix consisted of the cyanobacterium *Arthrospira* sp., the microalgae *Cryptocodinium cohnii*, and the yeast *Rhodotorula glutinis* to create a balanced nutritional composition with an enrichment of bioactive compounds for inducing positive health effects in selected fish species. Such a modification can also be interpreted in terms of a positive (human) nutritional effect. From an ecological point of view, all these microorganisms can be cultivated without minimum effort. In fish feeding trials, pike-perch (*Sander lucioperca*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were taken for evaluating the feed acceptance, fish health, and fish filet quality. The study revealed a successful feed development, which resulted in healthy organisms depending on the species and compared to conventionally fed organisms.

Keywords Fishmeal substitution · Rainbow trout · Polyunsaturated fatty acids · *Arthrospira* sp. · *Cryptocodinium cohnii* · *Rhodotorula glutinis*

Introduction

Seafood, especially fish, is one of the most important sources for polyunsaturated fatty acids (PUFA) for achieving the daily recommendation for human nutrition. Aquaculture is a promising starting point for the enrichment of a nutritional added value in edible fish for ensuring this accomplishment. The content of PUFA in inner land aquaculture fish originates from the composition of the fish feed, with a typical content of fishmeal and oil up to 50% of the ingredients. However, fishmeal and oil are globally traded, but very limited resources. Both raw materials are generally produced from wild-caught, pelagic or demersal fish, or bycatch [1, 2].

The application of fishmeal and oil for fish feed is highly criticized by European consumers. The production of fishmeal and oil in Europe is forbidden and in general questionable because of non-sustainable reasons. The ecosystem suffers from overfishing and eradication. The import of fishmeal and oil from Latin America is legal, but supports the local exploitation. The overfishing problem is just shifted regionally, but not solved.

The increasing demand for fishmeal and the limited amount of resources points out that it is important for a sustainable aquaculture that innovative ideas have to be developed. However, many combinations of ingredients have already been tested to balance the lack of indispensable nutrients. In some studies, fishmeal and/or oil have been completely or partly substituted. For example, Lund et al. [3] replaced fishmeal with organic plant proteins for

✉ Sascha Rohn
rohn@chemie-uni-hamburg.de

¹ Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany

² Institut für Getreideverarbeitung GmbH (IGV), Arthur-Scheunert-Allee 40/41, 14558 Nuthetal, Germany

³ Institute for Food and Environmental Research e.V. (ILU), Arthur-Scheunert-Allee 40/41, 14558 Nuthetal, Germany

⁴ Institut für Binnenfischerei e.V. (IfB), Im Königswald 2, 14469 Potsdam, Germany

trout, and Øverland et al. [4] substituted fishmeal with pea protein concentrate or soy meal in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar*). The fishmeal substituted diet, which was reduced by 17–23%, had no negative effects on the health (growth performance, digestibility, or carcass) of the fishes. Radhakrishnan et al. [5] substituted fishmeal in the diets of *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae with different amounts of *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, or *Azolla pinnata*. These formulated diets led to an enhanced vitamin C and E concentrations in the hepatopancreas and muscle tissue [5].

When considering the partial substitution of fishmeal for breeding rainbow trout, the use of one component such as nut meal (almond and pistachio), *Spirulina* meal, extracted algae, or mussels led to a good growth performance and fish health [6]. Teimouri et al. [7] also showed that the addition of *Spirulina platensis* (2.5–10%) revealed correlations between the blood carotenoid concentration and the weight gain, final weight, and the specific growth rate (SGR). The correlation between the blood carotenoid concentration and the feed conversion ratio (FCR) showed negative effects. The high blood carotenoid concentration levels led to high carotenoid concentrations in the filet as well.

Another study demonstrated that supplementing with 2.5–10% *Spirulina platensis* and 50 mg Astaxanthin kg⁻¹ effected the skin and filet pigmentation. The higher the concentration of *S. platensis*, the more redness and yellowness were detected. The addition of 7.5% *S. platensis* was recommended as the concentration at which no adverse effects on fish growth occurred and which acted well as an alternative natural carotenoid source for a desired pigmentation [8].

As further promising ingredients, yeasts have also been already considered in the past. Grain distillers dried yeast as protein replacement for fishmeal in rainbow trout feeds was studied as well [9]. The control feed contained 42% protein and 20% fat. Those parts were substituted with concentrations from 25 to 100% grain distillers dried yeast. 25–37.5% grain distillers dried yeast diets led to no significant differences in fish compared to the control. Higher substitutions showed generally lower health and production performances [9].

The use of proteins, e.g., deriving from yeasts or plants such as soybean meal, soybean isolate, hemp seed meal for coibia (*Rachycentron canadum*) or organic pea, horsebean, and rapeseed plant protein concentrates for rainbow trout for fishmeal replacement was examined as well [3, 10, 11]. Lunger et al. [11] showed that substitutions over 50% had negative effects of the fish health performance (muscle ratio, visceral somatic index, and hepatosomatic index). In general, the negative effects result from a lack in nutrients. Lund et al. [3] explain that the addition of amino acids for organic rainbow trout is not allowed, and therefore, a fully

balanced nutrition could not be reached in this case. The red yeast (*Phaffia rhodozyma*) diet reduced the oxidative stress in rainbow trout and was a good source for the accumulation of pigments in the filet [12]. Nakano et al. [12] suggested that the antioxidant activity resulted from the high astaxanthin concentration.

Consequently, it seems to be necessary to develop a feed that combines several natural raw materials with their specific advantages. Mixtures are important to accomplish full nutritive potential of fishmeal and oil, because the replacement by single components was not sufficient [4–6, 9–12]. However, a feed consisting of other ingredients than fishmeal or oil can create off-flavors, consequently leading to consumer's rejection.

The aim of the present study was the characterization of an innovative mix of microorganisms to compensate any nutritional limitations that might occur when using only a single component. Based on a typical fish feed recipe, fishmeal and oil were replaced to 50% by a mixture of three microorganisms for a better nutrient composition.

The great variety of yeasts offers a multitude of specific compounds that can be used in feed mixes. Especially, yeast species that overexpress lipids can be used to enhance the amount of PUFA in the feed and consequently in the animals. These organisms have a high lipid content (up to 80% w/w) and a high protein content [14, 15]. Freshwater fish can transform the linolenic acid of the yeasts into PUFA [13]. High contents of β -glucans, several B vitamins, and antioxidants, typically present in yeast strains might also lead to a better fish health [14, 15]. In preceding tests with different yeasts (e.g., *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodospiridium toruloides*, *Cryptococcus curvatus*, *Trichosporon pullulan*, and *Lipomyces lipofer*), only *R. glutinis* provided the required characteristics for the feed mixes [16]. To balance the lack of lipids (because of the reduction of the fish oil), they were used as the main lipid source. The cyanobacterium *Cryptocodium cohnii* was used to enrich the PUFA content in the feed (and correspondingly in the fish). It came to use because of its potential to produce high amounts of docosahexaenoic acid (DHA) [17–20]. As new protein source, cyanobacteria and microalgae have been considered because of their high contents of protein, amino acids, biological value, and fatty acid profile with a good ω 3- to ω 6-fatty acid ratio, and antioxidants [5–8, 21–23]. Besides the desired characteristics, microalgae are rich in bioactive, antioxidant components which can support feed stability [24–26]. By varying the composition of *Arthrospira* sp., *R. glutinis*, and *C. cohnii*, different innovative feed mixes were produced and tested in two fish feeding trials. Feed mixes were tested in pike-perch (*Sander lucioperca*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under mast farming conditions and compared with a commercially available feed. Feed

and fish quality were characterized and evaluated in terms of different parameters such as nutritional composition, growth parameters, and from a consumer-oriented perspective (human nutritional quality). Furthermore, the fish filet color was determined to estimate the future consumer acceptance.

Materials and methods

Raw materials and feed processing

Raw materials

Arthrospira sp. were produced and harvested by the Institut für Getreideverarbeitung GmbH (IGV), Nuthetal, Germany. *Arthrospira* sp. was cultivated photoautotrophic in a 1500 L tubular photobioreactor *PBR 2000* from IGV. The cyanobacteria were harvested in a modified Zarrouk's medium under outdoor conditions, i.e., under natural sunlight (with day and night changes), with a pH-value of 9.5, and at a temperature over 25 °C. The system was additionally heated and/or artificial illuminated to balance the seasonal temperature fluctuations and overnight respiration losses. *R. glutinis* was purchased from the Department of Applied and Molecular Microbiology of the Technical University of Berlin, Germany. The lipid yeast was fermented in a bioreactor with sucrose as main substrate, carbon excess, nitrogen limitation, and continuous stirring. Under these conditions, the lipid accumulation was maximized to $\geq 35\%$ dry weight. *C. cohnii* was from the Department Bioprocess Engineering of the Technical University of Berlin. The culture (CCMP 316) was obtained from the Provasoli-Guillard National Center of Marine Phytoplankton, Maine, USA.

C. cohnii was cultivated heterotrophic in a 200 L single-use bioreactor *Cell-tainer* (CELLution Biotech BV, Winterswijk Brinkheurne, The Netherlands) [20].

The resulting feed mixes M1–4 varied in their amount of *Arthrospira* sp., *R. glutinis*, and *C. cohnii* in the extruded pellets (Table 1). Therefore, the microbial biomasses were dried to simplify the handling for the manufacturing of each pellet premix.

Feed processing

Each raw material was ground to a fine powder, mixed, and extruded. The requirements for the pellets were a particle size of 3–5 mm, slowly sinking velocity in the fish tank (sink speed of 12–20 s/m water column), high water stability, and a bulk weight < 0.5 t/m³.

The extrusion was performed on a single screw lab extruder *20DN* from Brabender GmbH & Co. KG (Duisburg, Germany) linked to a universal machine UMC5 from Stephan Machinery GmbH (Hameln, Germany). After the drying process at 35–40 °C for 16–18 h, the extrudates were coated with fish oil in a drum mixer. The pellets were stored in light and air shielded plastic bags at room temperature until the feeding study.

Fish feed

Two controls (I and C) and four different feed mixes (M1–4) were tested. The standard (I) was an industrial feed: ALLER METABOLICA (4.5 mm; Prod. No. 41400342) was purchased from Aller Aqua GmbH, Golssen, Germany. Control I served as a comparison to show the normal fish performance of a commercially available feed. The control diet (C) and the four test diet mixes (M1–4) based on

Table 1 Fish feed compositions calculated for 1 kg final feed pellets (kg)

Diet	Control 1	Mix 1	Mix 2	Control 2	Mix 3	Mix 4
Ingredient						
Fish meal 70	0.375	0.189	0.189	0.375	0.189	0.189
<i>Arthrospira</i> sp. (DW)	–	0.129	0.129	–	0.194	0.097
<i>Rhodotorula glutinis</i> (DW)	–	0.065	0.097	–	0.032	0.097
<i>Cryptocodinium cohnii</i> (DW)	–	0.065	0.032	–	0.032	0.065
Wheat	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140	0.140
HP-shredded soy extract	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120	0.120
Pea protein	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Hemoglobin powder	0.050	0.050	0.05	0.050	0.050	0.050
Feather meal hydrolys.	0.050	0.050	0.05	0.050	0.050	0.050
Monoca-Phosphat (Cafk)	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
Aqua-Mix/F 0.5	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
Cholinchlorid 60%	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020
Fish oil	0.136	0.068	0.068	0.136	0.068	0.068

a well-established recipe of *vitafeed* Spezialfuttermittelwerk Beeskow GmbH (Beeskow, Germany), C consisted of 37.5% fishmeal and 13.6% fish oil. For M1–4, 50% fishmeal and oil were reduced to a half and substituted with different amounts of *Arthrospira* sp., *R. glutinis*, and *C. cohnii* (Table 1). Control C had the function to show that this basic recipe led to normal fish performances. In addition, it should ensure that only the effects of the substitution can be evaluated (compared to M1–4). The final pellets had a size of 4 mm and were slowly sinking. Every feed was produced in cooperation with IGV GmbH and *vitafeed* Spezialfuttermittelwerk Beeskow GmbH (Sfw), Beeskow, Germany.

Fish feeding trials

Experimental setup

Feed mixes were tested with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*) under laboratory conditions. The fish feeding experiment was split into two feeding trials (Table 2) with four different diets per trial. In the first feeding run, both fish species were fed for 57 days. In the second feeding run, the rainbow trout was fed for 50 days and the pike-perch for 63 days. Trials were performed at the Institute of Inland Fisheries in Potsdam-Sacrow (IfB) from December 2013–August 2014. With regard to stocking density, oxygen provision, and rearing water, parameters were controlled and adjusted to levels in accordance with the demands of the reared species. All feed ingredients used were of food or feed grade, wherefore no special requirements were needed. The fish harvesting is based on the codes of good practice for food producing fish.

The rainbow trouts were approx. 11 months and were obtained by a culture from Saxony-Anhalt (Germany). Pike-perch fingerlings were descended from the IfB's own

cultures. The fingerlings were approx. 6 months and were dry feed adapted.

13 fishes ($90 \text{ g} \pm 8\%$ for both rainbow trout feeding runs, $145 \text{ g} \pm 15\%$ for the first pike-perch feeding run and $108 \text{ g} \pm 8\%$ for the second feeding run) were initially put into three 150 L glass aquaria integrated in recirculation aquaculture systems and acclimated for 2 weeks before the populations were automatically fed every 4 h for the whole trial period.

The water temperature was maintained at 16 °C for rainbow trout and 22 °C for pike-perch. Lighting was reduced to 12 h/day to avoid stress.

The typical marketing weight of rainbow trout and pike-perch is approx. 1 kg after 12 months of farming. As this feeding study was only 1.5–2 months, the final weight for the market was not focused.

Fish samples

At the beginning (day 0), on day 28, and at the end of the trial, the fishes of each tank were weighed and their length was noted. Finally, fish were removed from the tanks, anaesthetized and killed in accordance with the German Animal Welfare Act. Organs were removed and the fish were filleted. Livers and intestinal fat were collected for further analysis. All samples were collected in plastic bags and stored at -20 °C until analysis.

Fish health parameters and indices

The following parameters were calculated for all diets: specific growth rate was calculated according to Busacker [27]. The feed conversion ratio (FCR) describes the amount of feed (in kg) needed to produce 1 kg fish. Feeding intensity is defined as the weight of the applied feed without any feed remains as the percentage of the actual fish biomass. Fulton [28] described the so-called condition factor (*k*-factor) as the ratio between the weight and length to the cube and multiplied with 100. The hepatosomatic index (HSI) indicates the ratio of liver weight to fish mass, whereas the intestinal fat somatic index (IFSI) is the ratio of intestinal fat weight to fish mass. The color of the liver and the filets was characterized by the CIE 1931 color space, originally described by [29–31]. This study describes a color difference (dE) as the distance to the value of the tissue if the fishes fed with I1 and I2. If the dE value is more than 1, it is defined as a visible change in color.

Chemical-analytical methods

For the analysis of the metabolic compounds, fish filets from each aquarium were pooled and analyzed.

Table 2 Experiment design of the feeding study

Diet feed	Feeding batch name	
	<i>S. lucioperca</i>	<i>O. mykiss</i>
First feeding run		
Control 1	PP-C1	RT-C1
Mix 1	PP-M1	RT-M1
Mix 2	PP-M2	RT-M2
Industry 1	PP-I1	RT-I1
Second feeding run		
Control 2	PP-C2	RT-C2
Mix 3	PP-M3	RT-M3
Mix 4	PP-M4	RT-M4
Industry 2	PP-I2	RT-I2

Chemicals

2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), disodium hydrogen phosphate, Supelco® 37 Component FAME Mix, Fremy's salt (Potassium nitrosodisulfonate), gallic acid, lysozyme (70,000 U mg⁻¹), menhaden fish oil, methanol, monobasic potassium phosphate, potassium persulfate, sodium sulfate, and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany). Acetyl chloride, Folin-Ciocalteu's reagent (FC-reagent), and *n*-heptane were obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ethanol and trichloroacetic acid were provided from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany) and sodium carbonate was purchased from Grüssing GmbH (Filsum, Germany). Acetone, Hydrochloric Acid (37%), and petrol ether (boiling range 40–60 °C) were purchased from Chemsolute, TH Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Germany). All chemicals used in the experiments were of analytical grade and all aqueous solutions were prepared with ultrapure deionized water.

Determination of fat content and the fatty acid profile

The fat content and the fatty acid profiles were analyzed by a set of methods according to methods of § 64 of the German Food and Feed Code (LFGB) [32]. The fat content of the feed mixes and the fish filets was analyzed according to § 64 method LFGB L17.00-4. The results were expressed as g fat 100 g⁻¹ biomass.

Determination of the fatty acid profile The fatty acid profile of the feed mixes and the fish filets was determined as fatty acid methyl esters (FAME) according to the methods of the German Society for Fat Science e.V. (DFG) in DGF C VI 10a and 11b with slight modifications [33]. 10–15 mg extracted fat was mixed with 2 mL methanolic acetyl chloride solution (95:5, v/v) and refluxed for 60 min at 80 °C. The extract was mixed with 10–15 mL saturated NaCl solution in a separating funnel. After cooling, the extract was mixed with 1 mL demineralized water and 2 mL *n*-heptane and then shaken for 30 s. The upper phase was collected, dried over Na₂SO₄, and injected into the GC or stored at –20 °C until GC analysis.

The fatty acid composition was determined by GC-FID on a DB WAX capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) installed on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) equipped with FID, a Hewlett-Packard 7673 controller, and a PC. The initial oven temperature was 100 °C, held for 1 min, increased to 190 °C at a rate of 5 °C min⁻¹ and held for 14 min and

increased to 250 °C at a rate of 5 °C min⁻¹, and held for 30 min. The carrier gas was nitrogen with a flow rate of 0.95 mL min⁻¹ with constant pressure of 155 kPa. The injector was set at 270 °C and the detector was set at 300 °C. The split was 50 mL min⁻¹ and the split ratio was 30:1.

Fatty acids, respectively, the FAME were identified by comparing their retention times with a the fatty acid methyl ester standard ('FAME 37') and with menhaden fish oil as standard for determining omega-3 and omega-6 fatty acids. Each fatty acid was expressed as % of total fat content.

Determination of fat-associated compounds/pigments

The pooled fish filet samples were lyophilized and 1.2 g lyophilized filets were milled with a swing mill MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Germany) with steel balls. These samples were used for the determination of the chlorophyll and carotenoid content as well as for the estimation of the color values (*L***a***b**, yellowness index, whitening index).

Chlorophylls Chlorophyll *a* (Chl *a*) and *b* (Chl *b*) contents were determined after solid–liquid extraction and calculated according to Jeffrey and Humphrey [34]. The samples were extracted four times with 5 mL aqueous acetone (90%). The collected phases were combined and concentrated in vacuo. The residue was re-suspended and analyzed. For the determination, the extinctions at 450, 664, 647, and 750 nm were monitored. The limit of detection (LOD) was 0.01 mg 100 g⁻¹ weight and the limit of quantification (LOQ) was 0.05 mg 100 g⁻¹ weight. The content was expressed as the sum of Chl *a* and Chl *b* in mg total chlorophyll 100 g⁻¹ dry weight (DW).

Carotenoids For the determination of the carotenoid content, the filets were extracted according to Jaspars and Arnon [35, 36] with slight modifications. The samples were extracted four times in 90% acetone, centrifuged at 3900×*g* for 5 min at 4 °C and extracts combined. All steps were carried out at dim light and incubated on ice to avoid carotenoid degradation. The extinction at the wavelengths 450 and 750 nm was monitored and the content was expressed in mg *b*-carotene equivalent 100 g⁻¹ DW. The LOD was 0.01 mg 100 g⁻¹ weight and the LOQ was 0.05 mg 100 g⁻¹ weight.

Determination of antioxidant activity

For the analysis of the antioxidant activity, samples were prepared with a two-step extraction. The extraction based on a method described by Li [24] was used with the following modifications.

Approximately, 5 g defrosted filets were weighed into a tube containing 10 mL enzyme solution (0.4 mg lysozyme mL⁻¹ Sørensen buffer; pH 7.4) and mixed for 45 min at 37 °C. The tube was centrifuged at 3226 × g for 15 min at 15 °C. The residue was re-suspended with 80% ethanol (v/v), stirred for a minute, and centrifuged under the same conditions as before. Both supernatants were analyzed for total phenolic content (TPC), being also a well-known indication for antioxidant activity, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) as well as radical scavenging activity with the electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR). The total amount was calculated as the sum of both extracts.

Determination of total phenolic content TPC was determined using the Folin–Ciocalteu methodology for 96-well plate readers [37]. To avoid a residue that results from a reaction between the proteins from the fish filet and the FC reagent, the remaining proteins in the first extract fraction were precipitated. The first fraction of the two-step extraction was diluted 1:2 with trichloroacetic acid (200 g L⁻¹), incubated on ice for 30 min, and centrifuged at 11,000×g for 10 min at 5 °C. For the determination, the supernatants were diluted with buffer 1:10. The fraction resulting from the ethanolic extract was analyzed undiluted.

Into every well, 100 µL of tenfold diluted FC-reagent was added to 20 µL sample. After 4 min, 80 µL sodium carbonate (75 g L⁻¹) was added and incubated for 2 h in the dark at ambient temperature. The absorbance was measured at 760 nm with a plate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Germany). The results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) g⁻¹ biomass.

TEAC assay The antioxidant capacity was evaluated using the methods described by Al-Duais and Li [24, 37] with slight modifications. For the ABTS solution, an aqueous solutions of ABTS (1.1 g L⁻¹) and K₂S₂O₈ (0.38 g L⁻¹) were mixed one-to-one, shaken thoroughly, and incubated in the dark for at least 14 h at room temperature before analysis. Then, the solution was diluted with water to obtain an absorbance of 0.7 ± 0.1 at 734 nm. Into every well, 200 µL ABTS working solution was pipetted and 20 µL sample solution was added. After 6 min, the absorbance was monitored at 734 nm with a plate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Germany). The results were expressed as mg Trolox equivalents (TE) g⁻¹ biomass.

Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy EPR analysis was performed on a Miniscope MS 200 (Magnettech GmbH, Berlin, Germany), based on a method described by Fiol [38]. Fremy's salt (0.27 mg L⁻¹) was prepared with Sørensen buffer and mixed one-to-one

with the sample in a reaction tube and measured. The period of kinetic analysis took 30 min to reach a constant minimum level of the signal. The radical reduction was calculated as the signal area difference between $t = 0$ min and $t = 30$ min. The results were expressed as mg Fremy's salt equivalents (FE) g⁻¹ biomass.

Statistical analysis

Except SGR and FCR, which were determined on the basis of aquaria, data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) using IBM® SPSS Statistic version 22 to identify significant differences between the new feed mixes and the commercially industrial standard feed. Levene's test was used to check for homogeneity of variance within all treatments (Scheffé), and for the comparison of the two feeding runs, a two-tailed t test was applied for testing the significance. The significance level was set at $P < 0.05$ and the values are expressed as the mean ± standard deviation (SD). All analyses were done in triplicate.

Results and discussion

Already, there are an impressive number of studies, wherein it was tried to substitute parts or the complete amount of fishmeal and oil in different feeds for selected aquatic and terrestrial organisms. However, the feed mixes tested herein were the first feeds that combine several innovative raw materials with their specific advantages.

Rainbow trout was used as test organism, as it represents a well-defined farmed fish, which has a high stress tolerance and shows a low tendency for diseases. In addition, pike-perch represents a high value food fish, on the base of its bright white, quite boneless filets with a delicate flavor. Both species are predatory fish. Furthermore, pike-perch is comparatively more carnivoric than rainbow trout and not at all used to a vegetarian diet. Therefore, it is hypothesized that adopting pike-perch to plant-based feeds is more ambitious. The culture conditions for pike-perch farming are also more complex, as pike-perch is more sensitive and not as robust as rainbow trout. This intense care and the slow growth often result in a comparatively expensive price.

Growth and feed performance

The successful feeding trial is described by the growth and feed performances in combination with post mortem parameters such as the liver mass, or the HSI. All these parameters are presented in Tables 3, 4, 5, and 6.

Table 3 Growth and feed performance of rainbow trout (*O. mykiss*)

Feeding batch	RT-C1 ^a	RT-M1 ^a	RT-M2 ^a	RT-I1	RT-C2 ^b	RT-M3 ^b	RT-M4 ^b	RT-I2
Weight (g)	190.03 ± 23.81	174.23 ± 53.50	226.03 ± 18.16	248.93 ± 40.21	153.67 ± 28.04	155.67 ± 39.63	134.67 ± 18.34	132.00 ± 34.39
Weight gain (g)	105.62 ± 10.39	110.77 ± 17.62	121.97 ± 5.52	138.40 ± 12.27	52.33 ± 9.37	62.09 ± 13.61	60.34 ± 4.17	64.06 ± 0.64
Lengths (cm)	24.83 ± 0.76	24.83 ± 1.04	26.33 ± 1.44	26.67 ± 1.53	24.00 ± 1.32	23.67 ± 2.08	23.50 ± 1.32	23.00 ± 1.80
Liver mass (g)	2.40 ± 0.26	2.13 ± 1.07	2.87 ± 0.47	2.27 ± 0.49	1.67 ± 0.12	1.90 ± 0.52	2.03 ± 0.38	1.40 ± 0.35
<i>k</i> -factor	1.24 ± 0.09	1.12 ± 0.29	1.24 ± 0.15	1.31 ± 0.07	1.10 ± 0.05	1.16 ± 0.08	1.03 ± 0.03	1.07 ± 0.04
Average FI (%)	–	1.46	1.45	1.45	1.53	1.53	1.53	1.53
FI _{max} (%)	–	>2.1	>2.1	>2.1	>2.1	>2.1	>2.1	>2.1
SGR (%·day ⁻¹)	0.91 ± 0.79	1.51 ± 0.17	1.53 ± 0.13	1.79 ± 0.28	0.94 ± 0.11	1.08 ± 0.18	1.05 ± 0.04	1.12 ± 0.12
FCR	–	1.02	0.98	0.86	1.26	1.24	1.26	1.26
HSI (%)	1.27 ± 0.06	1.17 ± 0.32	1.27 ± 0.15	0.90 ± 0.10	1.13 ± 0.12	1.20 ± 0.17	1.57 ± 0.45	1.10 ± 0.20
IFSI (%)	1.80 ± 0.36	2.13 ± 0.72	2.63 ± 0.15	2.70 ± 0.79	2.00 ± 0.70	1.70 ± 0.40	1.83 ± 0.83	2.17 ± 1.27

Significant levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Compared with fishes fed with feed mix I1

^b Compared with fishes fed with feed mix I2

Table 4 Growth and feed performance of pike-perch (*S. lucioperca*)

Feeding batch	PP-C1 ^a	PP-M1 ^a	PP-M2 ^a	PP-I1	PP-C2 ^b	PP-M3 ^b	PP-M4 ^b	PP-I2
Weight (g)	198.30 ± 22.18	208.50 ± 44.53	213.53 ± 3.57	239.63 ± 61.71	234.23 ± 37.08	169.97 ± 30.69	185.07 ± 15.49	190.83 ± 34.05
Weight gain (g)	27.14 ± 11.22**	47.37 ± 19.33	52.63 ± 9.74	84.21 ± 16.83	99.33 ± 14.24	52.16 ± 5.57	78.36 ± 2.97	96.16 ± 11.62
Lengths (cm)	29.67 ± 0.76	29.50 ± 1.32	28.83 ± 0.29	29.83 ± 1.61	29.50 ± 1.80	27.00 ± 1.73	27.67 ± 0.76	27.67 ± 1.26
Liver mass (g)	1.50 ± 0.10	2.27 ± 1.27	2.63 ± 0.15	2.17 ± 0.47	2.60 ± 1.47	1.67 ± 0.55	2.40 ± 1.14	1.43 ± 0.15
<i>k</i> -factor	0.76 ± 0.03	0.80 ± 0.07	0.89 ± 0.02	0.89 ± 0.10	0.91 ± 0.03	0.86 ± 0.04	0.88 ± 0.04	0.90 ± 0.14
Average FI (%)	–	1.06	1.14	1.11	–	1.06	1.16	1.24
FI _{max} (%)	–	1.15	1.25	1.20	–	1.25	1.45	1.60
SGR (%·day ⁻¹)	0.29 ± 0.11*	0.50 ± 0.21	0.55 ± 0.08	0.80 ± 0.10	1.04 ± 0.14	0.64 ± 0.08	0.86 ± 0.01	1.00 ± 0.10
FCR	–	4.85	2.59	1.47	–	1.62	1.48	1.16
HSI (%)	0.77 ± 0.12	1.16 ± 0.25	1.31 ± 0.21	0.87 ± 0.12	1.08 ± 0.40	0.88 ± 0.19	1.16 ± 0.39	0.77 ± 0.11
IFSI (%)	4.34 ± 1.35	5.15 ± 1.53	4.87 ± 1.10	6.42 ± 1.29	4.97 ± 1.07	3.97 ± 0.77	5.22 ± 0.87	5.43 ± 1.08

Significant levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Compared with fishes fed with feed mix I1

^b Compared with fishes fed with feed mix I2

Table 5 Liver and filet color of rainbow trout (*O. mykiss*)

Feeding batch	RT-C1 ^a	RT-M1 ^a	RT-M2 ^a	RT-I1	RT-C2 ^b	RT-M3 ^b	RT-M4 ^b	RT-I2
Liver color								
L	19.11 ± 2.89***	18.90 ± 2.70***	18.80 ± 1.98***	24.12 ± 4.15	28.18 ± 3.33	26.33 ± 3.27	28.18 ± 4.37	26.95 ± 2.54
a	15.72 ± 1.11***	15.74 ± 1.65***	15.35 ± 1.70***	17.87 ± 1.69	15.93 ± 2.28***	16.63 ± 1.87	16.01 ± 2.36***	17.55 ± 1.55
b	-4.64 ± 1.98***	-4.73 ± 2.01***	-4.83 ± 1.84***	0.27 ± 3.43	2.16 ± 2.55	3.96 ± 3.92	6.41 ± 2.95***	2.48 ± 2.11
dE	7.34	7.54	7.79		2.06	1.85	4.40	
Chroma	24.80 ± 2.60***	24.65 ± 2.71***	24.29 ± 2.42***	30.19 ± 3.15	32.54 ± 2.27	31.30 ± 2.03	32.47 ± 4.54	32.24 ± 1.94
Hue angle	39.73 ± 3.76	39.97 ± 3.66	39.22 ± 2.30	37.04 ± 5.98	29.77 ± 5.86*	32.59 ± 5.82	29.28 ± 5.18***	33.22 ± 4.06
Filet color								
L	72.89	72.28	79.27	76.62	69.75	68.06	68.43	72.04
a	0.43	0.42	-0.11	0.4	0.2	1.46	1.58	0.06
b	15.15	15.07	12.85	14.58	14.89	17.36	17.53	14.4
dE	3.77	4.37	3.21		2.35	5.15	5.01	
Chroma	15.16	15.08	12.85	14.59	14.89	17.42	17.6	14.4
Hue angle	88.37	88.4	-89.51	88.43	89.23	85.19	84.85	89.76
White Index	-14.13	-12.3	-6.39	-12.67	-15.02	-17.04	-16.92	-17.26
Yellow Index	42.76	40.37	35.26	40.20	44.70	47.00	46.78	45.77

Significant levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ^a Compared with fishes fed with feed mix I1^b Compared with fishes fed with feed mix I2

Table 6 Liver and filet color of pike-perch (*S. lucioperca*)

Feeding batch	PP-C1 ^a	PP-M1 ^a	PP-M2 ^a	PP-I1	PP-C2 ^b	PP-M3 ^b	PP-M4 ^b	PP-I2
Liver color								
L	39.35 ± 5.70**	52.36 ± 4.90***	52.97 ± 7.40***	43.96 ± 5.97	49.52 ± 6.48*	53.28 ± 5.41***	52.36 ± 6.58***	45.43 ± 3.74
a	19.07 ± 2.47	16.07 ± 3.11**	15.79 ± 2.96***	18.62 ± 2.95	15.71 ± 4.25	13.69 ± 2.95**	13.68 ± 3.61**	16.20 ± 2.30
b	5.87 ± 2.66**	10.99 ± 3.58***	11.37 ± 3.11***	8.30 ± 2.62	11.70 ± 3.13	16.31 ± 2.76***	15.70 ± 2.62***	10.57 ± 2.76
dE	7.36	10.45	10.77	–	8.63	14.18	12.43	–
Chroma	43.96 ± 4.20***	55.08 ± 5.08***	55.43 ± 4.49***	48.04 ± 5.87	52.16 ± 3.98**	55.25 ± 5.41***	54.20 ± 3.17***	48.46 ± 4.70
Hue angle	26.38 ± 6.02	17.59 ± 6.07***	16.92 ± 4.37***	23.70 ± 6.57	17.86 ± 4.69	14.92 ± 5.58***	14.79 ± 3.24***	20.12 ± 5.85
Filet color								
L	85.07	88.21	85.25	85.13	79.58	81.75	79.79	79.75
a	–0.52	–0.67	–0.71	–0.69	–0.29	–0.56	–0.36	–0.24
b	10.14	8.21	9.59	9.13	11.48	9.31	10.88	11.56
dE	1.03	3.21	0.48	–	0.19	3.03	0.69	–
Chroma	10.15	8.24	9.62	9.16	11.48	9.33	10.89	11.56
Hue angle	–87.06	–85.33	–85.77	–85.68	–88.55	–86.56	–88.1	–88.81
White index	8.61	22.35	12.21	11.36	6.62	18.95	7.85	8.81
Yellow index	26.64	23.11	25.33	25.33	27.19	20.5	26.36	26.23

Significant levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Compared with fishes fed with feed mix I1

^b Compared with fishes fed with feed mix I2

Rainbow trout

In general, rainbow trout tends to excessive feed consumption. However, the levels of the average feeding intensity (FI) and maximum feeding intensity (FI_{max}) had to be restricted. Therefore, FI was limited to 1.5% and the FI_{max} to 2.1%. The rainbow trout feeding batches did not show significant parameter differences within each feeding run, but between the two feeding runs (Table 3). Overall, the differences between the first and second feeding runs were smaller than for pike-perch (Table 4). The trend illustrates that fish from feeding batches RT-C1 and RT-C2 showed the lowest weight gain and specific growth rate (SGR). A comparatively better growth performance of rainbow trout was induced by the feed mix M3 closely followed by M4. Both diets led to organisms with a similar weight gain (~61 g), length (~23 cm), k -factor (~1.10), SGR (~1.07% day⁻¹), and FCR (~1.25) with no significant differences compared to the commercially available standard diet (RT-I2).

When talking a look at the post mortem parameters of rainbow trout, it was apparent that the average hepatosomatic indices of the rainbow trout were higher than the HSI of all pike-perch feeding batches (Tables 3, 4). The liver mass of fishes from the first rainbow trout feeding run was higher (~2.41 g) than in the second feeding run (~1.75 g) (Table 5). In the first feeding run, liver color of RT-M2 differed the most compared to RT-I1. RT-M2 showed the highest liver mass (2.87 g) accompanied by a low lightness, redness, and yellowness value. These parameters showed that the liver accumulated more adipose tissue. The filet color was comparatively brighter (due to lightness and Chroma) and not as yellow as fish filets from feeding batch RT-I1.

The second feeding run did not show significant differences in the fishes' liver color regarding lightness, redness, yellowness, hue, and ΔE (Table 5). The liver masses of the fishes from feeding batches RT-M3 and RT-M4 were slightly higher than RT-I2 and RT-M4 also showed higher yellowness values. The higher yellowness and lightness of fish livers from the second feeding run indicated a possible accumulation of fat in the liver. When characterizing the filets from the first feeding run, no significant color variations were visible, even though the ΔE was higher than 1. In the second feeding run, the filet color from feeding batches RT-M3 and RT-M4 showed a higher redness and yellowness, but a lower lightness correspondingly resulting in lower ΔE because of the lower lightness difference towards RT-I2. However, this color variation of RT-M3 and RT-M4 led to the visual impression of an orange touch.

Pike-perch

With regard to the pike-perch groups of the first feeding run, the control diet (C1) led to the lowest fish performance

(Table 4). The fishes of the feeding batches PP-M1 and PP-M2 also showed a very low weight gain (~24%) and SGR (~0.53% day⁻¹) compared to the fishes of feeding batch PP-I1.

However, in the second feeding run, fish resulting from the feed mix M4 showed the second highest k -factor besides the standard diets and had the highest SGR of all feed mixes (Table 4). The SGR trend correlated with the weight gain results (~42%) of feeding batch PP-M4.

Furthermore, feeding batch PP-M4 showed an FCR that came quite close to the standard diet. Pike-perch has discerning consumption habits compared to rainbow trout, and thus, the FI and the FI_{max} were not restricted. With regard to metabolic consequences in those fishes, all four test diet mixes illustrated a lower IFSI than the standard diets I1 and I2. In general, these parameters represented that only the feed conversion of the innovative feed mix M4 led to healthy organisms.

The liver masses of the innovative test diet mixes tended to higher liver masses. These values are still in a normal range and do no hint at pathological livers. The lightness and the yellowness of the livers resulting from the feeding batches PP-M1 to PP-M4 were higher than for the feeding batches PP-I1 and PP-I2, whereas redness was comparatively lower (Table 6). In addition, the livers from PP-M3 showed significantly higher values. Overall, the livers of feeding batch PP-M3 were brighter than those from the other feeding batches, suggesting a slightly higher accumulation of fat. All pike-perch filets had negative redness values, correspondingly indicating a lightly green impression, which was also visible (to the naked eye). There were no differences in the yellowness and the yellow index.

When only considering the feed and growth performance, feed mix C1 revealed the lowest performance for both species in all feeding batches (Tables 3, 4). In contrast, feed mix M4 led to the best performance for pike-perch (PP-M4) and rainbow trout (RT-M4). This mix was characterized by similar amounts of *Arthrospira* sp. and *R. glutinis* (9.7%) and a high content of *C. cohnii* (6.5%) (Table 2).

In 2014, Hauptmann [9] described that the substitution with grain distillers dried yeast for rainbow trout created a reduced fish performance because of amino acid limitation. In addition to the yeast (*R. glutinis*), the expected amino acid deficiency could be circumvented by the innovative organisms mix represented in M4. In the present study, the color variation of rainbow trout and pike-perch liver was only slightly affected being no evidence for a feed induced health problem. A reason, why consumers tend to buy rainbow trout, is for its colorful, well tasting filets, as well as for the low fat content and the comparatively cheap price. For example, the pigmentation of salmonids contributes to the purchase decision of the consumers. The pigmentation in farmed salmonid fish is

Table 7 Analytical parameter of rainbow trout (*O. mykiss*) filets

Feeding batch	RT-C1 ^a	RT-M1 ^a	RT-M2 ^a	RT-I1	RT-C2 ^b	RT-M3 ^b	RT-M4 ^b	RT-I2
Mineral content (g 100 g biomass ⁻¹)	1.31 ± 0.01	1.34 ± 0.01	1.36 ± 0.01	1.30 ± 0.03	1.32 ± 0.01	1.26 ± 0.03	1.35 ± 0.03	1.34 ± 0.01
Protein content (g 100 g biomass ⁻¹)	20.20 ± 0.17	20.38 ± 0.29	20.07 ± 0.03	20.42 ± 0.06	20.22 ± 0.23	20.01 ± 0.22	19.89 ± 0.20	19.89 ± 0.13
Dry weight (g 100 g biomass ⁻¹)	26.0	25.6	27.0	26.4	27.1	26.5	26.4	26.2
Total fat content (g 100 g biomass ⁻¹)	6.81 ± 0.23	5.48 ± 0.33	6.54 ± 0.16	6.33 ± 0.58	6.77 ± 0.40	6.50 ± 0.23*	6.36 ± 0.24	6.25 ± 0.21
Total chlorophyll content (mg Chl 100 g DW ⁻¹)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Total carotenoid content (mg bCE 100 g DW ⁻¹)	<LOQ	0.051 ± 0.004	0.051 ± 0.004	0.055 ± 0.004	<LOQ	0.250 ± 0.020	0.371 ± 0.030	<LOQ
TPC (mg GA g biomass ⁻¹)	0.17 ± 0.08	0.19 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.19 ± 0.07	0.18 ± 0.13
TEAC (mg TE g biomass ⁻¹)	0.29 ± 0.10	0.34 ± 0.08	0.32 ± 0.12	0.31 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.41 ± 0.05	0.33 ± 0.07	0.33 ± 0.09
Radical scavenging activity (mg FE g biomass ⁻¹)	0.76 ± 0.30	0.82 ± 0.15	0.82 ± 0.16	0.88 ± 0.17	0.72 ± 0.24	0.62 ± 0.22	0.76 ± 0.30	0.66 ± 0.19

LOD limit of detection, LOQ limit of quantification, DW dry weight, bCE β-carotene, GA gallic acid, TE trolox equivalent, FE Fremy's salt equivalent

Significant levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Compared with fishes fed with feed mix I1

^b Compared with fishes fed with feed mix I2

manipulated for many years. A lot of different feed additives are available to create deeper color saturation in the filet for making them look like wild growing fish. Such an accumulation can be provoked with a carotenoid-enriched diet that improves the fish filet quality [39, 40]. The consumer's expectations regarding rainbow trout are bride pink to orange filets, and the expectations regarding pike-perch are a clean, bright white filet without any pigmentation. The lightness and the white index revealed a brighter color for the pike-perch filets than for the filets from rainbow trout (Tables 5, 6). Regarding the marketability, the rainbow trout filets of RT-M3 and RT-M4 showed a lightly orange color which might lead to confusion with fresh brown trout (*Salmo trutta*), which is normally not so colored as a rainbow trout filet. Besides the yellow/orange impression of filets from feeding batches RT-M3 and RT-M4, the high chlorophyll content led to an enhanced light green pigmentation and a dull filet color for PP-M4.

Fish filet quality with regard to nutrient composition

The fish filet is the most relevant part for the consumers. A characterization of the fish filets is important for the estimation of the consumer's acceptance, what also include claims on packagings. When the quality parameters differ too much from fishes fed with the commercially available standard diets, the probability is high that the consumer would not buy the product. Tables 7, 8, 9, and 10 list the fish filet quality parameters. For an evaluation of possible antioxidant compounds, being very important for human health as well as product stability, the TPC, the antioxidant capacity, and the radical scavenging activity were analyzed.

General nutrient composition

The analysis of rainbow trout (Table 7) and pike-perch (Table 8) filets showed that all innovative feed mixes led to nearly the same mineral, protein, and lipid content. The mineral and protein contents of the rainbow trout filets were slightly higher than in the pike-perch filets. However, the dry weight of the latter was slightly lower, what resulted from the lower biomass (Table 8).

In all four innovative feed mixes, 50% of fishmeal and oil were replaced with different ratios of an algae-yeast mix, except the control and the standard diet. Therefore, the focus of the present study was more on finding an appropriate ratio of the three microorganisms for guarantying the presence of essential nutrients with a special focus on essential fatty acids. When considering the fat content of the feeds, the control feed and the innovative feed mixes varied slightly in their total fat content (7–12%) and were lower in fat than the commercially available standard feed (16%). The two main fatty acids in M1–M4 and C1 and C2

Table 8 Analytical parameter of pike-perch (*S. lucioperca*) filets

Feeding batch	PP-C1 ^a	PP-M1 ^a	PP-M2 ^a	PP-I1	PP-C2 ^b	PP-M3 ^b	PP-M4 ^b	PP-I2
Mineral content (g 100 g biomass ⁻¹)	1.25 ± 0.06	1.22 ± 0.04	1.24 ± 0.01	1.24 ± 0.02	1.23 ± 0.01	1.25 ± 0.01	1.24 ± 0.02	1.21 ± 0.01
Protein content (g 100 g biomass ⁻¹)	21.21 ± 0.00	21.34 ± 0.06	21.19 ± 0.09	21.37 ± 0.07	21.01 ± 0.24	21.31 ± 0.43	21.09 ± 0.39	21.27 ± 0.35
Dry weight (g 100 g biomass ⁻¹)	22.9	24.8	23.3	23.4	21.2	22.2	22.3	22.5
Total fat content (g 100 g biomass ⁻¹)	0.74 ± 0.07	0.83 ± 0.17	0.82 ± 0.14	1.17 ± 0.21	1.07 ± 0.07	0.64 ± 0.04	0.75 ± 0.08	0.52 ± 0.06
Total chlorophyll content (mg Chl 100 g DW ⁻¹)	<LOD	<LOQ	<LOQ	0.066 ± 0.007	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Total carotenoid content (mg bCE 100 g DW ⁻¹)	<LOD	<LOQ	<LOD	0.059 ± 0.005	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
TCP (mg GA g biomass ⁻¹)	0.19 ± 0.06	0.19 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.13 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.12 ± 0.05	0.14 ± 0.07
TEAC (mg TE g biomass ⁻¹)	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.08	0.32 ± 0.12	0.31 ± 0.03	0.43 ± 0.06*	0.43 ± 0.07*	0.41 ± 0.07**	0.53 ± 0.07
Radical scavenging activity (mg FE g biomass ⁻¹)	0.83 ± 0.21	0.82 ± 0.15	0.82 ± 0.16	0.88 ± 0.17	0.58 ± 0.10	0.44 ± 0.05	0.45 ± 0.25	0.53 ± 0.14

LOD limit of detection, LOQ limit of quantification, DW dry weight, bCE β-carotene, GA gallic acid, TE trolox equivalent, FE Fremy's salt equivalent

Significant levels: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

^a Compared with fishes fed with feed mix I1

^b Compared with fishes fed with feed mix I2

were oleic acid and palmitic acid (Table 9). The third-to-fifth most occurring fatty acids varied between α-linolenic (ALA), myristic, and stearic acid. The standard diets showed a greater variety in the order of the fatty acids but the same substances.

The five main fatty acids present in all feeds as well as in all fish filets represented more than 80% of the total fatty acid content. As expected, rainbow trout filets (Table 10) showed a five-to-ten times higher total fat content than pike-perch filets (Table 11). When comparing the fatty acid profile of each species, all fish filet samples had oleic acid as the main compound. Its content in the fish was slightly lower than in the feeds, but with a smaller.

In rainbow trout, the main fatty acids following oleic and palmitic acid were LA, stearic, palmitoleic, and myristic acid (Table 10). The filets of feeding batch RT-I1 and all batches of the second feeding run showed the same order of fatty acids.

The pike-perch filets showed a better fatty acid distribution than the rainbow trout filets. The three main fatty acids in descending order were oleic acid, palmitic acid, and stearic acid. The fourth most intense fatty acid was either palmitoleic acid.

The high palmitic acid content indicates its importance for being the source of the biosynthesis of further long-chained and polyunsaturated fatty acids. As Lee [41] highlighted, palmitic acid is converted to palmitoleic acid (16:1n-7) or into 16:1n10 fatty acid. The high content of stearic and palmitoleic acids underlines the presence of the Δ⁹-desaturase pathway in the organisms applied. LA and ALA contents in the fish filets derive from the enrichment by the feed mixes. Through the elongation pathway (*n*-3 metabolic pathway), the presence of eicosatetraenoic (ETA), eicosapentaenoic (EPA), docosapentaenoic (DPA), and docosahexaenoic acid (DHA) can be explained easily (Tables 10, 11) [42]. The presence of arachidonic acid (ARA) was based on the innovative mix of microorganisms, which convert LA to ARA via the *n*-6 metabolic pathway [41, 43].

It is postulated that the ratio of ω6 to ω3 fatty acids in the human diet can affect the pathogenesis of several degenerative diseases such as cancer, diabetes, or cardiovascular diseases. The targeted ratio in human nutrition is 1, whereas in Western diets, the actual ratio is approx. 15/1. Simopoulos [44] explained that by balancing the ratio of ω6–ω3 fatty acids, the risk for coronary heart disease could be suppressed. The mortality and risk of diseases regarding the effect of the diet are more or less well studied, e.g., an ω6/ω3 ratio of 4/1 was associated with a 70% decrease in mortality. EPA and DHA have anti-inflammatory properties. Therefore, the enrichment of PUFA in fish for human consumption is desirable for preventing the diseases mentioned [44, 45]. Taking

Table 9 Fat quality parameter of the feed mixes

Diets	C1	M1	M2	C2	M3	M4	I1 and 2
Lipid class							
Saturated FA (sFA % fat)	34.47	29.91	30.06	38.65	30.90	41.50	21.18
Monounsaturated FA (MUFA % fat)	57.67	45.80	44.68	54.17	41.44	45.38	52.98
Polyunsaturated FA (PUFA % fat)	7.85	24.30	25.24	7.20	27.68	13.10	25.85
ω 3-FA (FA % fat)	1.32	6.57	6.73	1.80	9.80	3.93	7.49
ω 6-FA (FA % fat)	6.53	17.73	18.51	5.40	17.88	9.17	18.35
ω 6/ ω 3	4.95	2.70	2.75	3.00	1.82	2.33	2.45
Fatty acid (FA % fat)							
C14:0 myristic acid	4.39	3.18	2.95	4.82	2.81	3.77	1.87
C16:0 palmitic acid	20.61	18.10	19.11	23.08	20.86	27.82	14.22
C16:1 palmitoleic acid	3.43	2.54	2.74	3.43	2.49	2.31	1.95
C18:0 stearic acid	6.61	5.06	4.94	7.50	4.91	6.82	3.75
C18:1 oleic acid	46.52	37.71	36.75	45.32	34.42	39.71	48.25
C18:2 linoleic acid (LA)	5.78	15.58	16.49	5.04	15.16	8.50	16.90
C18:3 α -linolenic acid (ALA)	0.87	5.62	5.61	1.26	7.8	3.14	4.21
C20:1 eicosensäure	3.63	2.34	2.20	3.51	2.02	1.88	1.75
C20:3 eicosatetraenoic acid (ETE)	<LOD	0.2	0.13	<LOD	0.16	<LOD	0.1
C20:4 arachidonic acid (ARA)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.24	<LOD	0.39
C20:5 eicosapentaenoic acid (EPA)	0.45	0.95	1.12	<LOD	1.34	0.64	1.22
C22:1 erucid acid	2.43	1.42	1.21	0.88	0.41	0.48	0.48
C22:5 docosapentaenoic acid (DPA)	<LOD	<LOD	<LOD	0.20	0.28	0.15	0.62
C22:6 docosahexaenoic acid (DHA)	<LOD	<LOD	<LOD	0.34	<LOD	<LOD	1.16
C24:0 lignoceric acid	0.45	0.55	0.62	0.45	0.37	0.67	<LOD
C24:1 tetracosenoic acid	1.66	1.79	1.78	1.03	2.10	1.00	0.55

LOD limit of detection, LOQ limit of quantification, FA fatty acids

those aspects into account, the ratio in the filets of rainbow trout resulting from the feeding batches RT-C1 and RT-C2 as well as RT-M1 to M4 was higher than in the filets from fishes fed with the standard diets (RT-I1 and RT-I2). The ratio in pike-perch filets was higher than in rainbow trout filets (0.60–1.20/1). Only in the second feeding run, the filets provided higher ratios than from the standard diet (PP-I2). Even though the pike-perch samples had lower total fat contents, the ω 6/ ω 3 ratio was much more pronounced.

Lipid-soluble components/pigments

The accumulation of fat-associated components such as chlorophylls (Chls), carotenoids, and other pigments in different tissues and species is well documented over decades, for example, the effect of diatoms on oysters, carotenoids on goldfish skin pigmentation, the use of *Chlorella* sp. in starlet, or microalgae in wels catfish [46–50]. Accumulations of bioactive compounds can be very different depending on metabolism. Rainbow trout tends to accumulate more lipids than pike-perch. Typical fat depots in fish are the liver and the filet. Correspondingly,

in the present study, rainbow trout enriched higher amounts of carotenoids and more red color components in the filet than pike-perch. The composition of the diets reflected the metabolism and accumulation in the organisms. Innovative mixes M1 and M2 differed in their amount of *R. glutinis* and *C. cohnii*, but had the same *Arthrospira* sp. content (Table 2): both feed mixes led to a low carotenoid and chlorophyll content in rainbow trout and pike-perch filets (Tables 7, 8). The lipid-soluble components in the fish filets tended to be present in very low amounts, close to the LOD. The pike-perch filets showed a trend to slightly higher chlorophyll contents than the rainbow trout samples and also a higher ratio when calculated on a fat basis. The lightly green filets of feeding batch PP-M4 illustrated that pike-perch accumulated the chlorophyll and corresponding degradation products in its tissues. However, the fat content and the chlorophyll content did not increase proportionally with regard to the *Arthrospira* sp. content. This result is in contrast to Teimouri [8], who showed that the carotenoid content in the filets of rainbow trout increased when the content of *S. platensis* was increased. The difference between these two studies, Teimouri [8] used a cyanobacteria

Table 10 Fat quality parameter of rainbow trout (*O. mykiss*)

Feeding batch	RT-C1	RT-M1	RT-M2	RT-I1	RT-C2	RT-M3	RT-M4	RT-I2
Lipid class								
Saturated FA (sFA % fat)	42.98	45.35	40.46	40.00	34.11	34.61	32.72	32.17
Monounsaturated FA (MUFA % fat)	51.71	49.97	50.53	47.49	46.68	50.58	49.52	50.64
Polyunsaturated FA (PUFA % fat)	5.30	4.69	9.01	12.51	17.19	14.79	17.74	17.20
ω 3-FA (FA % fat)	1.85	1.66	2.51	3.21	5.42	4.02	5.23	4.84
ω 6-FA (FA % fat)	3.45	3.03	6.50	9.30	11.77	10.77	12.51	12.36
ω 6/ ω 3	1.86	1.82	2.59	2.90	2.17	2.68	2.39	2.55
Fatty acid (FA % fat)								
C14:0 myristic acid	4.81	4.50	4.05	4.83	3.30	3.05	3.10	3.89
C16:0 palmitic acid	28.44	30.45	27.55	26.51	22.31	23.42	22.21	21.10
C16:1 palmitoleic acid	6.14	6.44	6.91	5.79	4.86	5.54	5.68	5.98
C18:0 stearic acid	7.72	8.03	6.71	6.68	6.86	6.39	5.97	5.69
C18:1 oleic acid	41.85	39.94	40.09	37.13	40.66	42.17	41.29	40.93
C18:2 linoleic acid (LA)	2.92	2.67	5.86	7.73	10.08	9.38	10.48	10.53
C18:3 α -linolenic acid (ALA)	0.56	0.35	1.41	2.08	4.57	2.79	3.91	3.01
C20:1 eicosensäure	2.50	2.41	2.45	3.16	2.25	2.18	2.10	3.36
C20:3 eicosatetraenoic acid (ETE)	0.19	0.11	0.26	0.33	0.31	0.37	0.47	0.34
C20:4 arachidonic acid (ARA)	<LOD	<LOD	<LOD	0.32	0.37	0.17	0.26	0.36
C20:5 eicosapentaenoic acid (EPA)	0.41	0.65	0.25	0.40	0.23	0.26	0.26	0.23
C22:1 erucid acid	0.38	0.42	0.38	0.40	0.31	0.35	0.31	0.37
C22:5 docosapentaenoic acid (DPA)	0.48	0.30	0.25	0.29	0.26	0.16	0.16	0.38
C22:6 docosahexaenoic acid (DHA)	0.14	0.15	0.42	<LOD	<LOD	0.56	0.49	0.68
C24:0 lignoceric acid	0.11	0.24	0.21	0.22	0.28	0.24	0.14	0.13
C24:1 tetracosenoic acid	0.84	0.76	0.70	1.01	0.60	0.34	0.14	<LOD

LOD limit of detection, LOQ limit of quantification, FA fatty acids

concentration of 42%, and in this study, it was 9–19%. The effect of the other varied components seemed to have a higher impact as expected.

The rainbow trout filets tended also to very low amounts of chlorophyll and carotenoids in the feeding batches resulting from the control diet (RT-C1 and RT-C2) and the standard diet of the second feeding run (RT-I2). However, the other feeding batches of the first feeding run tended to comparatively higher amounts of carotenoids. Noteworthy, filets of the feeding batch RT-M3 had four times higher carotenoid concentrations (0.25 ± 0.02 mg bCE 100 g^{-1} dry matter) and the feeding batch RT-M4 even more than a seven times higher concentration (0.37 ± 0.03 mg bCE 100 g^{-1} dry matter). Similarly, filets resulting from the feeding batches RT-M3 and RT-M4 also showed higher chlorophyll contents than the average. The carotenoid accumulation was also reflected by its visible appearance (of the filets). An orange rainbow trout filet color is an important aspect for the consumers buying behavior [8].

Although the detection of the carotenoids and chlorophylls is near the detection limit, their accumulation showed a certain trend. Their accumulation in the innovative feed mixes M1–M4 showed that not the diet mix with

the highest initial chlorophyll and carotenoid content (M3) led to the highest content in the pike-perch filets but the diets M4 and I1. That left the hypothesis that the bioavailability of carotenoids became more pronounced when feeding a ratio with higher *R. glutinis* and *C. cohnii* contents and a significantly reduced content of *Arthrospira* sp. The feed M3 was also characterized by the highest chlorophyll content, due to the highest *Arthrospira* sp. concentration of all diet mixes. Therefore, the bioavailability of chlorophyll in the fish tissue was enhanced by a high concentration in the feed. The ratio of carotenoids to total fat content or rather chlorophylls as fat-associated components were different in the species. Pike-perch accumulated much more of both compound groups in relation to fat content than rainbow trout did.

Antioxidant activity

The presence of antioxidant compounds is very important for the organisms to fight reactive oxygen species (ROS). ROS production typically results from physiological, biochemical reaction such as oxidative stress, certain diseases, and immune defence [5, 51]. Antioxidants stabilize ROS,

Table 11 Fat quality parameter of pike-perch (*S. lucioperca*)

Feeding batch	PP-C1	PP-M1	PP-M2	PP-I1	PP-C2	PP-M3	PP-M4	PP-I2
Lipid class								
Saturated FA (sFA % fat)	45.59	44.30	48.43	42.40	43.61	47.72	44.93	46.65
Monounsaturated FA (MUFA % fat)	49.55	50.24	45.89	50.48	42.57	40.83	45.25	44.81
Polyunsaturated FA (PUFA % fat)	4.88	5.45	5.68	7.12	13.80	9.43	9.83	8.56
ω 3-FA (FA % fat)	1.35	1.22	2.01	1.47	6.81	3.22	4.33	3.85
ω 6-FA (FA % fat)	3.53	4.23	3.67	5.65	6.99	6.21	5.50	4.71
ω 6/ ω 3	2.61	3.47	1.83	3.84	1.03	1.93	1.27	1.22
Fatty acid (FA % fat)								
C14:0 myristic acid	3.79	3.86	3.76	3.42	2.32	2.72	3.14	2.56
C16:0 palmitic acid	29.89	30.59	32.98	28.72	28.09	32.50	30.89	31.97
C16:1 palmitoleic acid	5.49	6.15	5.36	5.31	3.71	4.36	5.21	3.96
C18:0 stearic acid	9.45	7.51	9.12	8.07	10.57	9.68	8.43	9.28
C18:1 oleic acid	39.66	39.58	35.89	38.52	35.72	33.64	37.11	37.90
C18:2 linoleic acid (LA)	3.00	6.54	2.93	4.96	5.99	5.36	4.98	4.16
C18:3 α -linolenic acid (ALA)	0.27	0.41	0.58	<LOD	2.12	1.29	1.42	0.59
C20:1 eicosensäure	3.01	2.65	2.36	3.00	2.55	2.2	2.11	1.99
C20:3 eicosatetraenoic acid (ETE)	0.21	0.22	0.35	0.23	0.22	0.26	0.14	0.13
C20:4 arachidonic acid (ARA)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.30	0.25	0.15	0.21
C20:5 eicosapentaenoic acid (EPA)	1.08	0.81	1.43	0.75	2.04	1.51	0.81	0.91
C22:1 erucid acid	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.31	0.28	0.32	0.38
C22:5 docosapentaenoic acid (DPA)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.24	0.18	0.13	0.10
C22:6 docosahexaenoic acid (DHA)	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	2.23	0.07	1.72	2.08
C24:0 lignoceric acid	0.60	0.47	0.42	0.57	0.47	0.48	0.39	0.48
C24:1 tetracosenoic acid	2.39	1.86	2.28	3.65	0.28	0.25	0.50	0.58

LOD limit of detection, LOQ limit of quantification, FA fatty acids

which allows fish lipids to be protected from oxidation during fish growth and after slaughter. These effects support the improvement of fish quality.

The antioxidant activity is described here by results of three different assays (TPC, TEAC, and EPR). The antioxidant compounds in rainbow trout and pike-perch filets differed in their contents and activity depending on the test system (Tables 7, 8).

In the rainbow trout, the highest values for the antioxidant capacity were in the filets from the feeding batches RT-C2 and RT-M3 (Table 7). The total phenolic content in the rainbow trout filets was not significant, but when also considering the highest radical scavenging activity, the highest antioxidant activity was found for the filets from feeding batches RT-M1 and RT-I1. The rainbow trout feeding batches that provided a high TEAC value showed a TPC and the radical scavenging activity lower than the average. In contrast, the feed mixes with a high TPC had a very low TEAC value and radical scavenging activity, while filets resulting from feeding batches with a high radical scavenging activity showed average values in TEAC and EPR analysis (Table 7).

In the pike-perch filets, the highest TEAC values were provided by feeding batch PP-I2 followed by feeding

batches PP-C2 and PP-M3. The highest TPC was reached by feeding batch PP-M3, but those filets had the lowest radical scavenging activity. Similarly, to the rainbow trout filets, the pike-perch samples showed the same effect when comparing the assays. Samples with high TEAC values also had a TPC and radical scavenging below the average and vice versa in the first feeding run. Apparently, there were no correlations between each antioxidant assay and the fat-associated components. As Al-Duais [37] reported, the TEAC and TPC of *C. digitatum* did not correlate. The same effect was seen in the results of the fish filets. This confirms that the reducing polar compounds are marginal responsible for the antioxidant capacity in the filets. Following Al-Duais [37] and Guedes [52], the extracted antioxidant compounds depend on the polarity of the extraction solvent. In this study, the antioxidant compounds were extracted with an aqueous and an ethanolic solution. Regarding to the containing antioxidant compounds in the filets, the major antioxidants could be more soluble in non-polar solvents, e.g., carotenoids or PUFA, than the expected phenolic compounds. In addition, the respective reagent, here the FC-reagent and the ABTS working solution, can affect the values of the antioxidant activity because of their

affinity to polar compounds [37, 52]. For proving the high antioxidant activity in the fish filets, the extraction solvents (e.g., *n*-hexane or *t*BME) have to be changed, so that the PUFA and carotenoids are extracted.

Conclusion

In this study, innovative algae/yeast–fish feed mixes were characterized and tested for their acceptance using pike-perch and rainbow trout as test organisms. It was revealed that, despite the reduction of fishmeal and oil in the feed, the acceptance by the fishes was satisfyingly for rainbow trout. The use of the cyanobacterium *Arthrospira* sp., the yeast *R. glutinis*, and the red algae *C. cohnii* as a replacement mix led to healthy fishes. These had a comparable outward appearance and life performance similar to the individuals fed with a commercially available standard feed. In addition, a positive effect on the filet composition was detected. This was due to an enrichment of the fish filets with bioactive compounds and fatty acids. By increasing the amount of ω 3 fatty acids in human nutrition, the fish could become a part of the prevention of degenerative diseases. The use of these innovative feed mixes led to a reduced growth and feed performance in pike-perch. As expected, the innovative feed mixes were not appropriate for pike-perch, as discerning carnivores. Only feed mix M3 showed a minimum level of an acceptable performance. For the use in pike-perch farming, the feed composition has still to be optimized. Further investigation is required to reveal the fish performance after a longer feeding duration. This test should also require an extended sensory test for the comprehensive evaluation of the consumer's acceptance. For the replacement of fishmeal, the ingredient mixes were a good approach to exhaust the (full) nutritive potential. Therefore, further investigations should focus on more substances on the basis of ingredient mixes, rather than rely on only one substance for substitution. The various substitutes should be chosen so as to provoke synergistic effects and achieve enhanced stability.

Acknowledgements We would like to express our appreciation to Claudia Oestreich for the chlorophyll and carotenoid analysis, Yvonne Otto for the fat and FAME analysis, and Gertrud Schramm for the extrusion of the feed pellets.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

Funding This work was supported by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) and the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under the Grant Number FKZ 2817303010.

Compliance with ethics requirements All institutional and national guidelines for care and use for laboratory animals were followed.

References

1. IBRD. (2013) FISH TO 2030: prospects for fisheries and aquaculture, (Agriculture and Environmental Service Discussion Paper 03, World Bank Report Number 83177-GLB). Washington: International Bank for Reconstruction and Development/ International Development Association or The World Bank. <http://www.fao.org/docrep/019/i3640e/i3640e.pdf>. Accessed 30 Jun 2016
2. Miles RD, Chapman FA (2005) The benefits of fish meal in aquaculture diets. Publication FA122, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/FA122>. Accessed 30 Jun 2016
3. Lund I, Dalsgaard J, Rasmussen HT, Holm J, Jokumsen A (2011) Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance. *Aquaculture* 321(3–4):259–266
4. Øverland M, Sørensen M, Storebakken T, Penn M, Krogdahl Å, Skrede A (2009) Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture* 288(3–4):305–311
5. Radhakrishnan S, Saravana Bhavan P, Seenivasan C, Shanthi R, Muralisankar T (2014) Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *JOBAS* 67(2):25–33
6. Barrows FT, Frost JB (2014) Evaluation of the nutritional quality of co-products from the nut industry, algae and an invertebrate meal for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 434:315–324
7. Teimouri M, Amirkolaie AK, Yeganeh S (2013) The effects of dietary supplement of *Spirulina platensis* on blood carotenoid concentration and fillet color stability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 414–415(2013):224–228
8. Teimouri M, Amirkolaie AK, Yeganeh S (2013) The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396–399:14–19
9. Hauptman BS, Barrows FT, Block SS, Gibson Gaylord T, Paterson JA, Rawles SD, Sealey WM (2014) Evaluation of grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 432:7–14
10. Lunger AN, Craig SR, McLean E (2006) Replacement of fish meal in cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. *Aquaculture* 257:393–399
11. Lunger AN, McLean E, Craig SR (2007) The effects of organic protein supplementation upon growth, feed conversion and texture quality parameter of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 264:342–352
12. Nakano T, Kanmuri T, Sato M, Takeuchi M (1999) Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochem Biophys Acta* 1426:119–125

13. Bell M (2003) In vivo assays of docosahexaenoic acid biosynthesis in fish. In: The big fish bang; 26th annual larval fish conference
14. Selvaraj V, Sampath K, Sekar V (2005) Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish Shellfish Immunol 19(4):293–306
15. Abbas CA (2006) Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. In: Querol A, Fleet GH (eds) Yeast in food and beverages. Springer, Berlin, pp 285–334
16. Kot AM, Błażej S, Kurcz A, Gientka I, Kieliszek M (2016) *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. Appl Microbiol Biotechnol 100:6103–6117
17. de Swaaf ME et al (2003) High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptocodinium cohnii*. Biotechnol Bioeng 81:667–672
18. de Swaaf ME et al (2003) Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptocodinium cohnii* on ethanol. Appl Microbiol Biotechnol 61:40–43
19. Hillig F, Junne S, Neubauer P (2011) Docosahexaenoic acid (DHA) production in the heterotrophic marine microalgae *Cryptocodinium cohnii*. Speech, Dechema Bundesalgenstammtisch, Bremen, Germany
20. Hillig F (2014) Impact of cultivation conditions and bioreactor design on docosahexaenoic acid production by a heterotrophic marine microalga. Dissertation Technische Universität Berlin, Fakultät III—Prozesswissenschaften
21. Mühlhling M (2000) Characterization of *Arthrospira (Spirulina)* Strains. Doctoral thesis, University of Durham
22. Reitan (2010) Microalgae can partly replace fish meal and fish oil in fish feed. In 8th European Workshop Biotechnology of Microalgae, Nuthetal
23. Benemann (2010) Microalgae aquaculture feeds. In: 8th European Workshop Biotechnology of Microalgae, Nuthetal
24. Li H-B, Cheng K-W, Wong C-C, Fan K-W, Chen F (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. Food Chem 102:771–776
25. Pinero Estrada JE, Bermejo Bescós P, Villar des Fresno AM (2001) Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. Farmaco Sci 56:497–500
26. El-Baky HHA, El Baz FK, El-Baroty GS (2009) Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects. Afr J Biotechnol 8(24):7059–7067
27. Busacker GP, Adelman IR, Goolish EM (1990) In: Schreck CB, Moyle PB (eds) Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, pp 363–384
28. Fulton TW (1904) The rate of growth of fishes. In: 22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland 1904(3):141–241
29. Guild J (1932) The colorimetric properties of the spectrum. Philos Trans R Soc Lond Ser Contain Papers Math Phys Character 230:149–187
30. Smith T, Guild J (1931) The C.I.E. colorimetric standards and their use. Trans Opt Soc 33(3):73–134
31. Wright WD (1928) A re-determination of the trichromatic coefficients of the spectral colours. Trans Opt Soc 30(4):141–164
32. LFGB, Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (German Food and Feed Code) (2013) Bundesgesetzblatt, I, Nr. 27. IAW: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren (2015) (62. Ergänzungslieferung) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Berlin: Beuth Verlag GmbH. ISBN:978-3-410-11220-4, pp 1426–1470
33. DGF (2002) Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften e.V., Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen (2. Auflage einschließl. 8. Aktualisierungslieferung). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. ISBN:3-8047-1937-6
34. Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton Biochemie und Physiologie der Pflanzen (BPP) 167:191–194
35. Jaspars EMJ (1965) Pigmentation of tobacco crown-gall tissues cultured in vitro in dependence of the composition of the medium. Physiol Plant 18:933–940
36. Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24:1–15
37. Al-Duais M, Müller L, Böhm V, Jetschke G (2009) Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. Eur Food Res Technol 228(5):813–821
38. Fiol M, Weckmüller A, Neugart S, Schreiner M, Rohn S, Krumbein A, Kroh LW (2013) Thermal-induced changes of kale's antioxidant activity analyzed by HPLC-UV/Vis-online-TEAC detection. Food Chem 138(2–3):857–865
39. Choubert G, Mendes-Pinto MM, Morais R (2006) Pigmenting efficacy of astaxanthin fed to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: effect of dietary astaxanthin and lipid sources. Aquaculture 257(1–4):429–436
40. Soler-Vila A, Coughlan S, Guiry MD, Kraan S (2008) The red alga *Porphyra dioica* as a fish-feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on growth, feed efficiency, and carcass composition. J Appl Phycol 21(5):617–624
41. Lee JM, Lee H, Kang S, Park WJ (2016) Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. Nutrients 8(1):23
42. Tocher DR (2015) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. Aquaculture 449:94–107
43. Davis BC, Kris-Etherton PM (2003) Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: current knowledge and practical implications. Am J Clin Nutr 78(3):640S–646S
44. Simopoulos AP (2008) The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. Asia Pac J Clin Nutr. 17(1):131–134
45. Agbor GA, Vinson JA, Patel S, Patel K, Scarpati J, Shiner D, Wardrop F, Tompkins TA (2007) Effect of selenium- and glutathione-enriched yeast supplementation on a combined atherosclerosis and diabetes hamster model. J Agric Food Chem 55(21):8731–8736
46. Muller-Feuga A (2000) The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. J Appl Phycol 12:527–534
47. Pouvreau JB, Moranc M, Taran F, Rosa P, Dufossé L, Guérard F, Pin S, Fleurence J, Pondaven P (2008) Antioxidant and free radical scavenging properties of marennine, a blue-green polyphenolic pigment from the diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) simonsen responsible for the natural greening of cultured oysters. J Agric Food Chem 56:6278–6286
48. Gouveia L, Rema P (2005) Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. Aquac Nutr 11:19–23
49. Sergejevová M, Masojádek J (2012) Chlorella biomass as feed supplement for freshwater fish: sterlet, *Acipenser ruthenus*. Aquac Res 44(1):157–159
50. Začková I, Sergejevová M, Urban J, Vachta R, Štys D, Masojádek J (2011) Carotenoid-enriched microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: albinic form of wels catfish (*Silurus glanis*). Aquacult Nutr 17(3):278–286
51. Dirks RC, Faiman MD, Huyser ES (1982) The role of lipid, free radical initiator, and oxygen on the kinetics of lipid peroxidation. Toxicol Appl Pharm 63(1):21–28
52. Guedes AC, Gíao MS, Seabra R, Ferreira AC, Tamagnini P, Moradas-Ferreira P, Malcata FX (2013) Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. Mar Drugs 11(4):1256–1270

6.2. Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Publikation II)

Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)

Michaela Schafberg, Karin Loest, Andreas Müller-Belecke, Sascha Rohn

Aquaculture **2020**, 518, 734633

Impact Factor: 4.24 (2020)

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734633

Synopse

Die Erkenntnisse der vorangegangenen Arbeiten zeigten, dass sowohl Zander als auch Regenbogenforellen die Testfutter annahmen, jedoch bedarf es noch Optimierungen. Die hier vorliegende Studie hatte daher zum Ziel den Einfluss der Verarbeitung auf die antioxidative Aktivität zu untersuchen. Hierfür wurde die Futtermittelrezeptur angepasst und ein fünftes Testfutter entwickelt. Die antioxidative Aktivität wurde von den Rohstoffen über die Futtermittelproduktion bis zur Akkumulation im Fischfilet zu untersucht. Die antioxidative Aktivität wurde hier als möglicher Marker in Betracht gezogen, um einen potentiell gesundheitsfördernden Effekt im späteren Filet der Regenbogenforellen aufzuzeigen.

Zu diesem Zweck beschreibt der Artikel die Futtermittelherstellung zum einen und zum anderen die Beurteilung der Fischfilets nach der Fütterung mit diesem neuen, optimierten Futtermittel. In beiden Teilen dienten dieselben Tests zur Bewertung der antioxidativen Aktivität. Die Ergebnisse der Futtermittelherstellung ließen Rückschlüsse hinsichtlich des Abbaus von Antioxidantien während der Verarbeitung ziehen.

In dieser Pilotstudie wurde das Testfutter mit einem Kontrollfutter und einem kommerziellen Standardfutter über eine Dauer von vier Monaten an Regenbogenforellen getestet. Die Verwendung des Testfutters im Pilotversuch zeigte Korrelationen zwischen den Mikroorganismen und den Fischfilets in Bezug auf die antioxidativen Aktivitäten verglichen mit den Fischfilets der Kontrollgruppen. Neben der Veränderung der antioxidativen Aktivität im Fischfilet wurden weitere Aspekte als mögliche Qualitätsmarker untersucht. So wurde zusätzlich ein Fokus auf die Veränderung der Filetfarbe über den Studienzeitraum untersucht und ob es signifikante Veränderungen im Fettsäureprofil der Fischfilets nach vier Monaten Fütterung gab.

Die Arbeiten dieser Publikation wurden in Kooperation mit verschiedenen Einrichtungen durchgeführt: Das Institut für Getreideverarbeitung GmbH (IGV) kultivierte die Cyanobakterien „*Arthrospira* sp.“. Am Institut für Angewandte und Molekulare Mikrobiologie der Technischen Universität Berlin wurde die Fettheife „*Rhodotorula glutinis*“ kultiviert. Das Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Berlin kultivierte

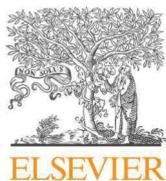
die Rotalge „*Cryptocodinium cohnii*“. Das Testfutter Nr. 5 und das Vergleichsfutter wurden am IGV hergestellt. Die Fütterungsstudie inklusive der Aufnahme der Wachstums- und Schlachtkörperparameter wurden am Institut für Binnenfischerei Potsdam-Sacrow (IfB) durchgeführt.

Die Analytik und die statistische Auswertung wurden an der Universität Hamburg am Institut für Lebensmittelchemie in Hamburg durchgeführt. Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 40% angegeben.

This article was originally published in *Aquaculture*, 518 by Schafberg, M., Loest, K., Müller-Belecke, A. & Rohn, S., Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on filets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 734633, 2020, Copyright 2019 Elsevier B.V. All rights reserved (2019),

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848619309597?via%3Dihub>

Die ergänzenden Informationen (*Supplemental Material*) befinden sich im Anhang 10.1.1.



Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)



Michaela Schafberg^a, Karin Loest^b, Andreas Müller-Belecke^c, Sascha Rohn^{a,d,*}

^a Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146, Hamburg, Germany

^b IGV GmbH, Arthur-Scheunert-Allee 40/41, 14558, Nuthetal, Germany

^c Institute of Inland Fisheries Potsdam-Sacrow (IfB), Im Königswald 2, 14469, Potsdam, Germany

^d Institute for Food and Environmental Research e.V. (ILU), Arthur-Scheunert-Allee 40/41, 14558, Nuthetal, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Fishmeal substitution
Rainbow trout
Arthrospira sp.
Cryptocodinium cohnii
Rhodotorula glutinis
Antioxidant activity and potential

ABSTRACT

A broad range of compounds/ingredients for the substitution of fishmeal and fish oil in feeds for aquaculture was suggested over the last decades. This study aimed at characterizing changes in antioxidant activity from the raw materials over the fish feed production to the accumulation of potential health-beneficial antioxidants in the fish fillets of *Oncorhynchus mykiss*, when being fed with an innovative microorganism-based fish feed. The feed used consisted of a mix of the cyanobacterium *Arthrospira* sp., the microalgae *Cryptocodinium cohnii*, and the yeast *Rhodotorula glutinis*. These ingredients formed a balanced feed to demonstrate no limitations in fishmeal and oil substitution with regard to lipids, proteins, and antioxidants. The enrichment with bioactive compounds stabilizing the feed as well as enhancing bioactivity in the fish was successful. Also, radical scavenging activity was documented from the raw materials over the extrusion process to the accumulation in the fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) over the whole fish production period of 16 weeks. As an additional quality parameter, the accumulation of pigments in the fish fillets was determined. The study revealed changes in the antioxidant profile over the whole value chain, which resulted in healthy organisms of higher quality compared to conventionally fed organisms.

1. Introduction

Fishmeal and oil are of high impact for fish production, especially for marine species (Bell et al., 2003). However, for ensuring sustainable aquaculture and diminishing overfishing of the seas, these traditional components continuously gain a negative image and must be substituted. So far, most studies focused on the enrichment of fatty or amino acids (Miles and Chapman, 2005). Some ingredients such as soy extracts and pea proteins (Øverland et al., 2009) became important ingredients during the last two decades. These substitutions were the first step towards sustainable aquacultures by replacing a huge part of fishmeal and oil with plant-based ingredients. However, the substitution with a single component often leads to a nutrient deficiency or undesirable side effects in the final products such as color or flavor changes (Teimouri et al., 2013; Hauptman et al., 2014; Barrows and Frost, 2014). Some studies showed that the substitution with a mixture of ingredients is a more desirable way to create healthier individuals (Lund et al., 2011; Radhakrishnan et al., 2014; Schafberg et al., 2018).

In a recent study, Schafberg et al. (2018) showed that a mix of the cyanobacterium *Arthrospira* sp., the microalgae *Cryptocodinium cohnii*, and the yeast *Rhodotorula glutinis* led to healthy rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) individuals. But there is still more potential in the efficiency of this kind of feeds. Therefore, in the present study an only slightly optimized feed mixture was used to improve the growth and feed performance as well as the fish health. Another aspect was to further increase the bioactive and especially antioxidant compounds in rainbow trout fillets.

Initially, those microorganisms were selected due to their nutritional characteristics, enabling fish health improvement. *Arthrospira* sp. is a well-known microorganism and cultivated in large scales for decades (Habib et al., 2008). Cyanobacteria like *Arthrospira* sp. are rich in chlorophyll and are a well protein source. Further positive nutritional aspect of *Arthrospira* sp. are their vitamin composition, including especially β -carotene, B vitamins, vitamin E, and their significant amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). At the same time *Arthrospira* is hypothesized to improve the immune system and activity of

* Corresponding author. Hamburg School of Food Science, Institute of Food Chemistry, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146, Hamburg, Germany.
E-mail address: rohn@chemie.uni-hamburg.de (S. Rohn).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734633>

Received 22 April 2019; Received in revised form 22 October 2019; Accepted 22 October 2019

Available online 31 October 2019

0044-8486/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

higher organisms (Habib et al., 2008). By adding *Arthrospira* sp., possible protein and amino acid lacks can be compensated. In this case, *R. glutinis* represents the oil/lipid component and is used to improve the linoleic acid content in the feed. After feeding, rainbow trout can transform this fatty acid into PUFAs. Furthermore, *R. glutinis* has also a high content of β -glucans, several B vitamins, and antioxidants, all being hypothesized for resulting in a positive effect on fish health (Bell et al., 2003; Selvaraj et al., 2005; Abbas, 2006). *C. cohnii* produces carotenoids, high amounts of docosahexaenoic acid (DHA) and has thus a potential added value for the feed mix (Hillig, 2014). DHA as one of the most prominent PUFAs is important for the growth of healthy fish, especially rainbow trout (Bell et al., 2003). The production of *C. cohnii* and *R. glutinis* is not cheap, but regarding the environmental aspects and cultivating them in bulk reactors, the price will continuously decrease. The recent and the present approach are proof-of-concept studies, leading to innovative future applications and further reduction of environmental drawbacks and limitations.

This new feed mix contains two very color intensive microorganisms. During accumulation of carotenoids and chlorophyll in the fish fillets, these substances influence the fish fillet appearance, subsequently. When varying the ratio of these three ingredients, the accumulation of the algal pigments in the fish fillets could be verified and improved in a preceding study (Schafberg et al., 2018). As a conclusion, the good adaption of the fatty acids and healthy metabolism in those fishes showed that there are promising aspects for further optimization. However, when such a beneficial fish feed is produced, several technological preparation processes need to be implemented, meaning that the stability of some, but very important ingredients might be influenced and need to be evaluated, as well.

Therefore, the present study focused on evaluating process effects and changes on the antioxidant profile in detail during the whole value-added chain from raw materials over the feed into the fish fillets. The critical production should identify process points that are also valid for other fish feed processes.

The fish feed pellets were manufactured by using extrusion. During this process, several aspects influence the ingredients and the substances within. There are changes that are resulting from e.g. shear forces, heating, and/or compression. Proteins are often deactivated or denatured during extrusion due to the prevailing temperatures. The occurring pressure alone is usually not enough to denature proteins but supports the thermal decomposition. The deactivation of enzymes has advantages and disadvantages. Whereas the inactivation of lipases, peroxidases, lipoxygenases is desirable to protect lipids from degradation and oxidation, the inactivation of amylases and phytases might inhibit or slow down the digestion of either nutrients or anti-nutritive substances (Cheftel, 1986; Camire et al., 1990; Killeit, 1994).

Under heat conditions, carbohydrates react with free amino acids and transform to MAILLARD-products, resulting from the temperature, pH-value, and moisture. For example, lysine is very reactive due to its two functional amino groups. The transformation decreases the bioavailability of the amino acids. Other polysaccharides such as starch degrade into smaller sugar molecules, because of the temperature and pH value. Depending on the moisture, starch can also melt or gelatinize in the extruder. The degradation and formation of modified starch increase the digestibility of carbohydrates (Cheftel, 1986; Camire et al., 1990; Killeit, 1994; Qu and Wang, 1994).

The extrusion process has also positive and negative effects on lipids. The high temperatures and pressure favor the degradation of PUFAs and increase the rancidity. The hydrolysis or lipolysis of diacylglycerides due to lipases, moisture, and heat form free fatty acids. On account of these effects and to avoid the degradation of labile and/or lipophilic compounds, it is important to apply the oil right after the extrusion (Killeit, 1994). The released short-chain fatty acids and short alkanes create a rancid flavor because of a promoted autoxidation. On the other hand, the free fatty acids provide lubrication during the process like emulsifiers and serve as a complexing agent with starchy

components (Ilo et al., 2000).

High temperatures, high pressure, and shear forces enhance the destruction of vitamins and other antioxidant compounds (Killeit, 1994). Bioactive compounds like carotenoids or chlorophylls are sensitive to heat and oxygen and these components isomerize or break down to e.g., apocarotenoids, pheophytins, pyropheophytins, or ionones (Canjura et al., 1991; Breitmaier, 2006). Losses of carotenoids during thermal treatments of vegetables such as broccoli and spinach are described in the literature (e.g., Paciulli et al., 2017). Pyropheophytin can be formed as a result of intense heat treatment from pheophytin by the loss of the carbomethoxy group at the C10 position (Canjura et al., 1991). However, pheophytin and pyropheophytin are hypothesized to have health-beneficial properties such as anti-inflammatory and antioxidant effects (Pangestuti and Kim, 2011; Park et al., 2014).

The diminishing effects on polyphenols depend on the degradation into aglycones or, in contrast, a polymerization, based on the heat and/or oxidative influences (Camire et al., 1990; Özer et al., 2006). Those effects are strongly depending on chemical structure, temperature, and moisture (Moussa-Ayoub et al., 2015). Şensoy et al. (2006) showed that the extrusion had no negative effect on the antioxidant activity and polyphenolic content of buckwheat flour. Furthermore, Şensoy et al. (2006) showed the importance and different behavior of free and bound polyphenols in the extrusion process. As a consequence of all the effects mentioned, it seems to be obviously important to evaluate the whole process with regard to antioxidant profiles.

The enrichment of antioxidants in the final fish products to avoid negative effects on quality parameters and to consequently improve their content in human is desirable. Every organism must maintain a balance of reactive oxygen species (ROS) needed and excessive ROS ('oxidative stress'), so the presence or intake of antioxidants can prevent the ensuing consequences. The production of ROS is elevated by several biochemical reactions in the organism such as immune defense, oxidative stress, or degenerative diseases (Dirks et al., 1982; Radhakrishnan et al., 2014). Exogenous antioxidants are important to support the endogenous radical scavenger. For that reason, exogenous antioxidants have a significant physiological impact as radical scavengers or as radical scavenging promoter (Kurutas, 2016). Typical antioxidant substances consumed with the daily diet are vitamins (e.g., ascorbic acid or tocopherol), phenolic compounds (e.g., flavonoids), or pigments such as carotenoids or chlorophylls (Lanfer-Marquez et al., 2005).

The accumulation of carotenoids in fish fillets is desirable in the flesh of rainbow trout. For example, the enhancement of "red" flesh of salmonids with astaxanthin or other carotenoid pigments is a common feeding procedure (Teimouri et al., 2013). On the other hand, consumers expect white fish fillets originating for example from pike perch, without any other color impression (Sergejevová and Masojádek, 2012; Teimouri et al., 2013; Schafberg et al., 2018). Besides color improvement, the accumulation of carotenoids in the form of provitamin A can additionally lead to a relevant nutritional added value for human consumption (Preedy, 2012).

Continuous feeding of high chlorophyll-containing diets tends also to certain accumulations of (green) chlorophylls in the fillet (Teimouri et al., 2013; Schafberg et al., 2018). Consequently, higher chlorophyll contents can lead to a pale or greenish/blueish impression of the fish fillet. However, consumers associate healthy rainbow trout with a red to pink fillet color (Brown et al., 2016). With the accumulation of green or blue pigments in the fillets, the color impression changes and the redness level loses its impact. Consumers may associate the loss of redness or, in general, the change in appearance with a dry fillet or other negative fillet characteristics (Anderson, 2001).

The effect of highly pigmented diets has been a recurring topic in recent decades such as in goldfish skin pigmentation studies (Gouveia and Rema, 2005), in microalgae feeding for catfish breeding (Zafková et al., 2011), or in the use of *Chlorella* sp. as a starlet feed (Sergejevová

and Masojádek, 2012). Depending on the specific metabolism of every species, the accumulation of pigments takes place in different tissues (Anderson, 2001), like the skin (Gouveia and Rema, 2005) or muscles (Nakano et al., 1999).

Taking all aspects into account, an aim of the present study was the evaluation of a slightly modified feed mixture (used in a preceding study Schafberg et al., 2018) with increased amounts of bioactive compounds in the final food product – rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets and to characterize the stability of the single ingredients during the feed production process. Main aim of the present study was to evaluate product quality parameters such as antioxidant activity and radical scavenging activity throughout the feed production process. Accumulations of chlorophylls and carotenoids was also analyzed to evaluate the changes in characteristics of the feeds and final fish fillets. Therefore, the workflow for the evaluation was separated in the following process stages: raw materials, extrusion (premix, post-extrusion, post-drying), final feeds after coating, and the rainbow trout fillets. The fillets were evaluated after a feeding study which took place over 16 weeks with samples taken every 4 weeks.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials and feed processing

2.1.1. Raw materials

Cyanobacteria *Arthrospira* sp. were produced by the IGV GmbH, Nuthetal, Germany. They were cultivated photoautotrophically in a 1500 L tubular photobioreactor *PBR 2000* in a modified zarrouk's medium with a pH value of 9.5. The cultivation was under outdoor conditions (light cycle) and at a temperature maintained over 25 °C. *Cryptocodinium cohnii* were cultivated by the Department Bioprocess Engineering of the Technical University of Berlin. The culture (CCMP 316) was originally obtained from the *Provasoli-Guillard National Center of Marine Phytoplankton*, Maine, USA. *C. cohnii* was grown heterotrophically in a 200 L single-use bioreactor *Celltainer* (CELLution Biotech BV, Winterswijk Brinkheurne, The Netherlands) (Hillig, 2014). The substrates in this fed-batch cultivation were glucose and acetate. *Rhodotorula glutinis* were fermented in a bioreactor with sucrose as main substrate, carbon excess, nitrogen limitation, and continuous stirring. The cultivation took place at the Department of Applied and Molecular Microbiology of the Technical University of Berlin, Germany. The microbial biomasses were dried for better handling in the extrusion processes.

2.1.2. Feed processing

The control diet (C) and the test feed mix (FM) were produced in cooperation with IGV GmbH and *vitafeed* Spezialfuttermittelwerk Beeskow GmbH (Sfw), Beeskow, Germany. Both diets based on a traditional, well-established recipe provided by *vitafeed* Spezialfuttermittelwerk Beeskow GmbH (Beeskow, Germany), C consisted of 37.5% fishmeal and 13.6% fish oil. For FM, 50% fishmeal and fish oil were reduced and substituted with *Arthrospira* sp., *Rhodotorula glutinis*, and *Cryptocodinium cohnii* (Fig. 1, Supplementary Table S1). Four specific processing steps (I – IV) for both feed mixes were selected, where samples were taken to determine the impact of the extrusion process on the different components and the product quality parameters (Fig. 2).

For C and FM each raw material was ground to a fine powder, mixed (I), and extruded (II). The extrusion was performed on a single screw lab extruder *20DN* from Brabender GmbH & Co. KG (Duisburg, Germany) linked to a universal food processing machine *UMC5* from Stephan Machinery GmbH (Hamel, Germany). After drying (III; 35–40 °C for 16–18 h), the pellets were coated with oil in a drum mixer. The final pellets had a diameter of 4 mm and have been optimized (in 'trial-and-error' pre-tests) for slowly sinking in the fish tanks. After a second drying process (IV), the pellets were stored in light and air

shielded plastic bags at room temperature until the feeding study.

2.2. Fish feed

Besides the two produced feed mixes (C & FM), a standard diet (S) was evaluated as well. S was a commercially available, industrial feed (ALLER METABOLICA, 4.5 mm; Prod. No. 41400342) and purchased from Aller Aqua GmbH, Golssen, Germany.

2.3. Fish feeding trials

2.3.1. Experimental set-up

Three diets (C, FM, and S) were tested with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under aquaculture conditions of semi-industrial scale. The fish feeding experiments took four months and were performed at the Institute of Inland Fisheries Potsdam-Sacrow (IfB), Germany from August 2015–November 2015 in a recirculation aquaculture system including six rearing tanks of each 1.4 m³. Regarding the stocking density, oxygen provision, and rearing water quality, parameters were controlled and adjusted to levels in accordance with the demands of the reared species. All FM ingredients were of food or feed grade, wherefore no specific requirements were needed. The fish harvesting based on the codes of good practice for food-producing fish for human consumption.

The rainbow trout population was approx. 15 months old and obtained from a culture from Saxony-Anhalt (Germany). Between 64 and 66 fishes (138 g ± 32 g) were initially stocked into six glass fiber round tanks (two replicates per feed) and acclimated for two weeks before the populations were automatically fed every 4 h for the whole trial period. The water temperature was maintained between 11 and 16 °C. The light regime was set to 12 h of light and 12 h of darkness. The feeding study was conducted for four months, during which the fish triplicated their body weights and reached a marketable size of around 0.5 kg.

2.3.2. Fish samples

At the beginning (day 0, August 2015) and every four weeks for four months, the fishes of each tank were weighed, and their length was noted. Finally, fishes were removed from the tanks, anesthetized and killed in accordance with the *German Animal Welfare Act*. Organs were removed, and the fish was filleted. All samples were collected in plastic bags and stored at -20 °C until analysis. For the analysis of the metabolites, fish fillets from each tank were pooled and analyzed.

2.4. Chemical-analytical methods

2.4.1. Chemicals

2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), disodium hydrogen phosphate, FRÉMY'S salt (potassium nitrosodisulfonate), gallic acid, lysozyme (70,000 U mg⁻¹), methanol, monobasic potassium phosphate, potassium persulfate, sodium sulfate and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany). FOLIN-CIOCALTEU'S reagent was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ethanol and trichloroacetic acid were obtained from Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Germany) and sodium carbonate were purchased from Grüssing GmbH (Filsun, Germany). All chemicals used in the experiments were of analytical grade and all aqueous solutions were prepared with ultrapure deionized water.

2.4.2. Determination of fat associated compounds/pigments

The pooled fish fillet samples were lyophilized and milled with a swing mill MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Germany) with steel balls and liquid nitrogen. These samples were used for the determination of the chlorophyll and carotenoid content as well as for the estimation of the color values (L*a*b*).

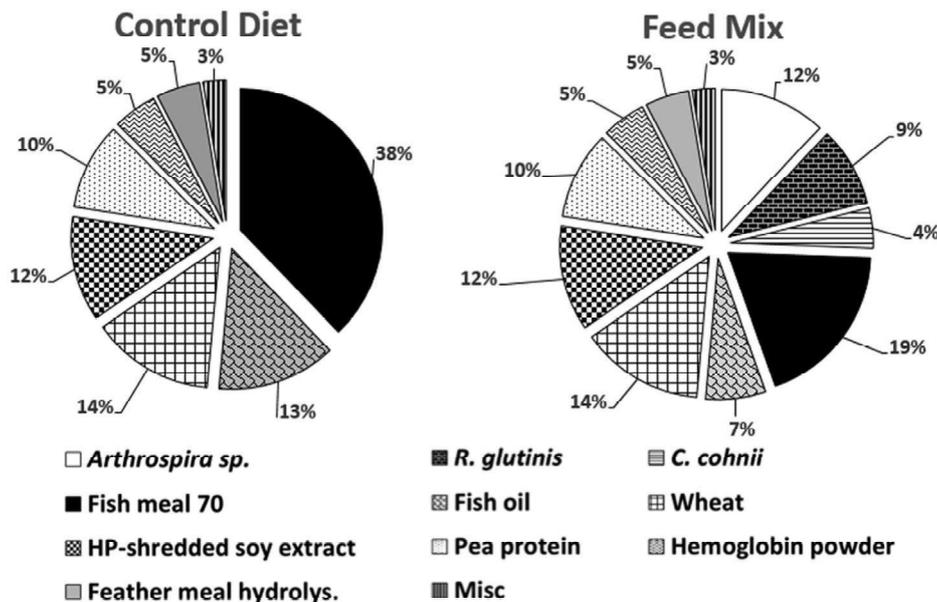


Fig. 1. Percentage ingredients composition of the control diet and feed mix.

2.4.2.1. *Chlorophylls and carotenoids.* Chlorophyll *a* (Chl *a*), *b* (Chl *b*), and carotenoid contents were determined after solid-liquid extraction according to Jeffrey and Humphrey (1975), Jaspars (1965), and Arnon (1949) with slight modifications. 0.05–0.5 g lyophilized sample (raw material, feed or fillets) were extracted two times with 2 mL 95% EtOH for 5 min (30 Hz) with a swing mill MM 301 (Retsch GmbH, Haan, Germany). After centrifugation (3900 × *g* for 5 min at 4 °C) the combined solvents were evaporated and re-suspended in 0.5 mL 95% EtOH. 200 μL of the resuspension was used for analysis and the absorbance was measured at 450 nm, 649 nm, and 664 nm with a plate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Germany). The quantification followed an approach according to Lichtenthaler and Buschmann (2001). The content was expressed as the sum of Chl *a* and Chl *b* in mg total chlorophyll content (tChl) 100 g⁻¹ dry weight (DW). The carotenoid content was expressed in mg total-carotenoid content (tCar) g⁻¹ DW. The limits of quantification were for Chl *a*, Chl *b*, and tCar 0.05 mg 100 g⁻¹ DW.

2.4.2.2. *Fillet color.* For the determination of the fillet color, the milled

fish fillets were analyzed with a photometer CM5 (Konica Minolta Inc., Tokyo, Japan). The extinction of each sample was measured ten-times in a wavelength range of 200 nm–800 nm. For the determination of the fillet coloration, the color values were described by CIE-Lab and compared with the natural color system (NCS) (Guild, 1932; Smith & Guild, 1931–1932). Those studies describe a color difference (dE) of a value more than 1 as distinguishable to the practiced eye. The color difference between the first and each measuring point is described by dE1 and the difference between one point and its previous point is marked by dEp.

2.4.3. *Determination of antioxidant activity*

For the analysis of the antioxidant activity, samples were prepared according to Li et al. (2007) and Schafberg et al. (2018). For the indication of the antioxidant activity, the total phenolic content (TPC), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) as well as radical scavenging activity (EPR) was analyzed. The total amount was calculated as the sum of both extracts from the two-step extraction (Schafberg et al., 2018).

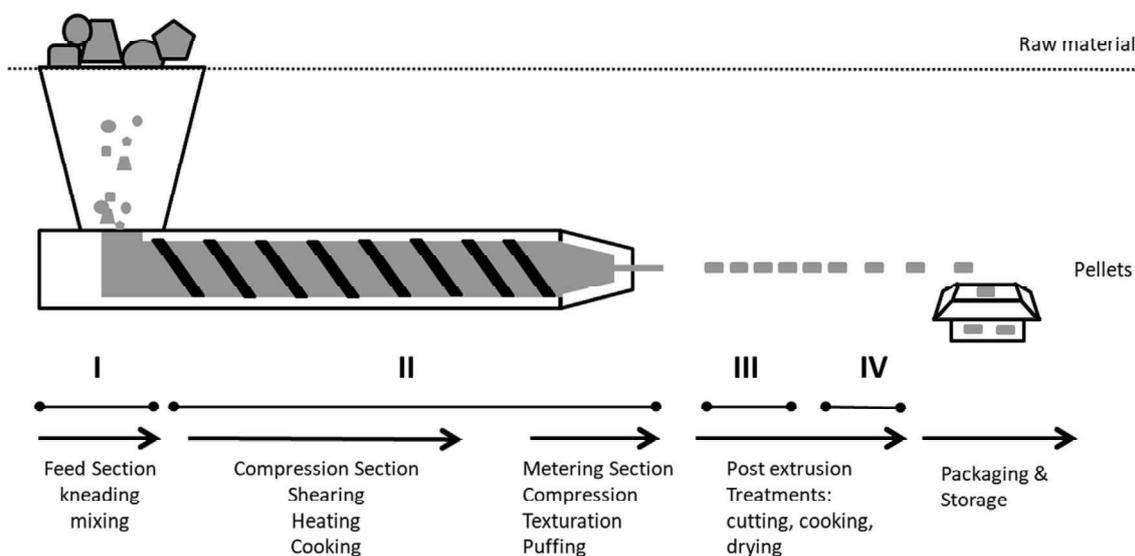


Fig. 2. Scheme of the process zones in an extruder (adapted from Harper and Jansen, 1985).

Table 1
Changes of bioactive components during the manufacturing process.

Ingredient or manufacturing step	TPC (mg GA g ⁻¹ DW)		TEAC (mg TE g ⁻¹ DW)		Radical scavenging activity (mg FE g ⁻¹ DW)		Total chlorophyll content (mg tChl g ⁻¹ DW)		Total carotenoid content (mg tCar g ⁻¹ DW)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	12.76	± 3.73	2.81	± 1.26 ^b	35.17	± 0.06 ^b	< LOQ		0.347	± 0.260
<i>Arthrospira sp.</i>	10.31	± 3.68	48.25	± 20.00	12.75	± 6.90	26.49	± 0.99 ^b	4.225	± 0.170 ^b
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1.68	± 0.15 ^b	41.46	± 0.09 ^a	4.63	± 4.32	< LOQ		0.115	± 0.006 ^a
FM-I	4.04	± 0.11	5.31	± 0.37	5.21	± 0.33	3.22	± 0.22	0.544	± 0.033
C-I	2.71	± 0.04	3.12	± 0.09	2.33	± 0.06	0.07	± 0.06	0.028	± 0.004

FM = Feed Mix; C = Control Diet; LOQ: Limit of quantification; DW: Dry weight; GA: Gallic Acid; TE: Trolox Equivalent; FE: Fremy's salt Equivalent; I = Premix; Compared with feed mix I Significant levels.

^a $p < 0.01$.

^b $p < 0.001$.

2.4.3.1. Determination of total phenolic content. The TPC was evaluated according to Al-Duais et al. (2009) and Schafberg et al. (2018). The absorbance was measured at 760 nm with a plate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Germany). The results were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) g⁻¹ weight. The limit of quantification (LOQ) was 0.026 mg GAE g⁻¹ weight.

2.4.3.2. TEAC assay. The total antioxidant capacity (TAC) was determined using the methods described by Al-Duais et al. (2009), Li et al. (2007) with the slight modifications of Schafberg et al. (2018). The absorbance was monitored at 734 nm with a plate reader (Synergy HT, BioTek Instruments Inc., Germany). The results were expressed as mg trolox equivalents (TE) g⁻¹ weight. The LOQ was 0.037 mg TE g⁻¹ weight.

2.4.3.3. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Based on a method described by Fiol et al. (2013) and the modifications described in Schafberg et al. (2018), EPR analysis was performed on a Miniscope MS 200 (Magnetech GmbH, Berlin, Germany). The results were expressed as mg Fremy's Salt Equivalent (FE) g⁻¹ weight. The LOQ was 0.04 mg Fremy's Salt g⁻¹ weight.

2.4.4. Determination of the fatty acid profile

The fatty acid (FA) profiles of the diets and the fish fillets were determined as fatty acid methyl esters according to Schafberg et al. (2018). The results were expressed as g FA 100 g⁻¹ weight. The LOQ was 0.005 g FA 100 g⁻¹ weight.

2.4.5. Determination of dry mass, ash and protein content

The following feed quality parameter were analyzed according to methods of § 64 of the German Food and Feed Code (LFGB, 2015). The dry mass was analyzed according to ASU-F 0001 (EG) 2010-09, the protein content according to ASU-F 0003 (EG) 2010-09, and the ash content according to ASU-F 0014 (EG) 2010-09. The results were expressed as g 100 g⁻¹ BM. The LOQ for all three methods were 0.01 g 100 g⁻¹ BM.

The following fish fillets parameter were analyzed according to methods of § 64 of the German Food and Feed Code (LFGB, 2015) with slight modifications. The dry mass was analyzed according to ASU-L 06.00-3 (EG) 2014-08, the protein content according to ASU-L 06.00-7 (EG) 2014-08, and the ash content according to ASU-L 06.00-4 (EG) 2007-04. The results were expressed as g 100 g⁻¹ BM. The LOQ for all three methods were 0.01 as g 100 g⁻¹ BM.

2.5. Statistical analysis

For the identification of significant differences between the groups C, FM, and S during the production process and the feeding trial, all data except the fillets colors were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA) using IBM® SPSS Statistic version 22. LEVENE'S test was used to check for homogeneity of variance, within all treatments SCHEFFÉ

and Post-hoc GAMES-HOWELL were applied for testing the significance. The significance level was set at $p < 0.05$ and the values are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). All analyses were done in triplicates.

3. Results and discussion

3.1. Raw materials (initial values)

Bortoluzzi et al. (2016) described that the quality of raw materials, which are used for feed formulations are strictly related to the quality of the final products. This statement explains and emphasizes the essential principle "From farm to fork" for every food producer. Moreover, traceability documentation is an important duty for food manufacturers. The present study describes the antioxidant changes from the feed to the final fish fillets, based on raw materials, feed processing steps, the feed, and several sampling points during the feeding trial.

The idea of reducing fishmeal and oil with a microorganism mix based on the positive attributes of *Rhodotorula glutinis*, *Cryptocodinium cohnii*, and *Arthrospira sp.*, as evaluated in a preceding study (Schafberg et al., 2018). However, the fate of some of the valuable compounds in pelleted feed has not been analyzed yet. The changes of the polar antioxidant activity were monitored by using traditional analytical methods such as the FOLIN-CIOCALTEU or the TEAC assay. Antioxidant compounds can stabilize the feed or even improve the health of the fish. For this reason, the microorganism-based feed mix was compared with a (traditional) control feed mix (Table 1; Fig. 3, Suppl. Table S2).

With regard to the single raw materials, the use of a mix of microorganism was the key difference between the recipes of C and FM. A closer look at the microorganisms showed that *Arthrospira sp.* had significantly higher total phenolic content (TPC), total antioxidant capacity (TAC), radical scavenging activity, total chlorophyll, and carotenoid content (Table 1) compared to the premixes C-I and FM-I. In addition, *C. cohnii* showed the highest TPC and a high radical scavenging activity compared to C-I and FM-I. On the other hand, *R. glutinis* showed only a high TAC compared to C-I and FM-I. Comparing both premixes, FM-I showed also higher TPC, TAC, radical scavenging activity, total chlorophyll and carotenoid content than C-I due to its microorganism content.

3.2. Influence of feed processing

The extrusion is a typical process in the food and feed industry to manufacture products such as pasta or feed pellets (Ilo et al., 2000; De Paula et al., 2017). As expected, TPC, TAC, radical scavenging activity, total chlorophyll and carotenoid content of FM decreased over the four process steps from FM-I to FM-IV (Fig. 3). All these results were explainable by the processes during the extrusion: The first step is the initial pre-preparation of the raw materials. All ingredients of C and FM were ground to a fine powder and mixed, resulting in the premixes FM-I and C-I. For FM, 50% of fishmeal and oil contents were substituted with

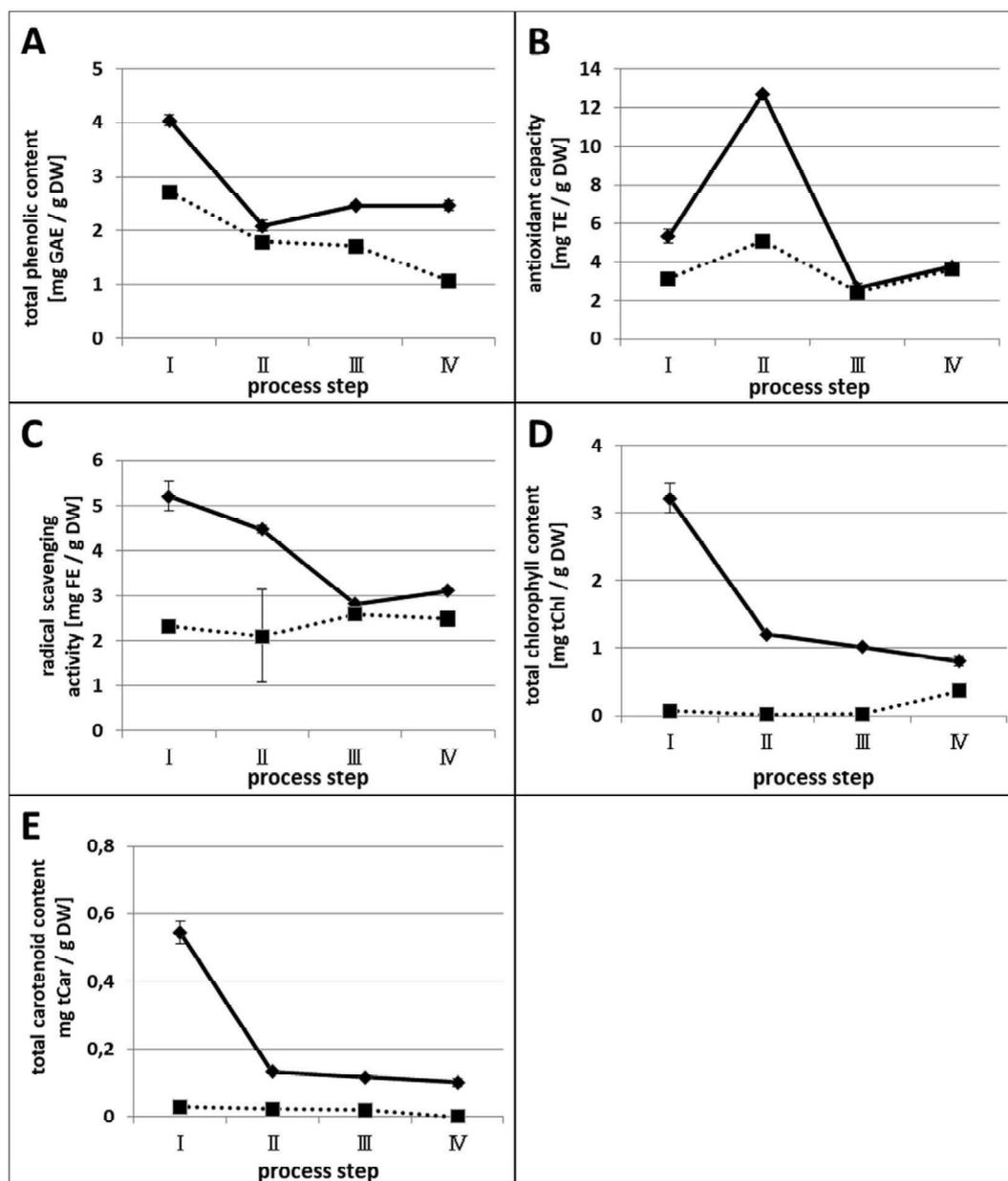


Fig. 3. Changes of bioactive compounds during the manufacturing process of feed mix (black) and control diet (dotted). The five plots (A–E) show the changes of the feed mix (black lines) and the control diet (dotted lines) in the extrusion process from the premix (I) to the feed pellet (VI) A: Total phenolic content B: Trolox equivalent antioxidant capacity C: Radical scavenging activity D: Total chlorophyll content E: total carotenoid content Process steps: I = Premix II = after extrusion III = after drying IV = after the oil application and drying BM: Biomass DW: Dry weight GAE: Gallic Acid Equivalent TE: Trolox Equivalent FE: Fremys Salt Equivalent tCar: total Carotenoid content tChl: total Chlorophyll content.

a mix of the three microorganisms (Fig. 1). To verify any mixing or grounding effects, all measurable antioxidant parameters for the pre-mixes FM-I and C-I were compared to their theoretical amount. The theoretical amounts were calculated from the individual values of each of the raw materials (Table 1). Therefore, the values of C-I were the base for the calculation. The values of the microorganisms were added to C-I, without subtracting 50% of the fish meal and oil content. The extraction of the TPC, TEAC and radical scavenging activity were implemented in an aqueous media to verify the polar activities. Consequently, the subtraction of the fishmeal and oil had no significant impact here. The calculated values do not consider any positive, synergistic, or even negative effects. In fact, the theoretical, calculated FM-I values of the TPC ($2.1 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$), TAC ($9.3 \text{ mg TE g}^{-1} \text{ DW}$), radical scavenging activity ($3.9 \text{ mg FE g}^{-1} \text{ DW}$), total chlorophyll ($3.2 \text{ mg tChl g}^{-1} \text{ DW}$) and total carotenoid content ($0.545 \text{ mg tCar g}^{-1}$

DW) describe significantly higher values compared to the calculated values of C-I. In contrast to the calculated values, the analyzed values of FM-I and C-I were significantly lower. The significant differences between the theoretical and measured TAC and TPC value pairs (Table 1) led to the hypothesis that intra- and intermolecular reactions occurred during mixing, milling, or storage. Possible reactions may be initiated by light, temperature, residual moisture or autoxidation. These reactions led to lower TAC and TPC. The next process step is the extrusion itself (FM-II & C-II). The pre-mixes are moved forward under definite conditions, reaching the die, where they are formed into pellets (Cheftel, 1986; Camire et al., 1990; Ilo et al., 2000). Then a drying step followed the extrusion (FM-III & C-III). At the last step (IV), the pellets were coated with oil and gently dried again. The coating increased the oil content and thus the calorific content and energy of the pellets. Another positive aspect of applying the oil following the extrusion process

is that there are no temperature effects on the lipids. In addition, coating does not affect the solidness of the pellets (Treier, 1991; Killeit, 1994; Oduntan et al., 2018).

The very low contents of chlorophyll and carotenoids in diet C resulted from the used ingredients: The only sources of chlorophyll and carotenoids in C were the soy extract and the pea protein. These two components had not a comparable amount of chlorophyll and carotenoids like the high pigmented organism *Arthrospira sp* or even *C. cohnii*. The decreasing trend of the bioactive compounds in both feed compositions (I > II > III > IV) based on several chemical and structural transformations during the manufacturing process (Fig. 2). The extrusion can have different effects on each nutrient class as already explained (Camire et al., 1990; Ilo et al., 2000; Killeit, 1994).

In addition, further quality parameters were determined to prove the comparability of the nutritional composition of the diets. All three diets showed no significant differences with regard to dry matter, ash, or protein content. The lipid content of S and C-IV showed no significant differences. In contrast, FM-IV revealed a significant lower lipid content, which was only 70% of S (67.5%) and C-IV (71.1%) content.

Unsaturated fatty acids were not monitored during the process (I-III), but analyzed afterwards in the final products FM-IV and C-IV (Table 2). The three dominant fatty acids regarding biomass in all three diets were – in ranking order – oleic acid, linoleic acid, and palmitic acid. The content of unsaturated fatty acids (PUFA) in S and C-IV were about 25% of the lipid content whereas the contents in FM-IV were about 30% of the lipid content. From this point, the new feed mix was an excellent basis to produce PUFA-enriched organisms.

Regarding the fatty acid profile within the lipid fraction, S showed significant higher contents of palmitoleic acid, oleic acid and α -linolenic acid than FM-IV. In contrast, FM-IV had significant higher contents of PUFAs (α -linolenic acid, γ -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid), than S. The reason why C-IV showed higher contents of the mentioned PUFAs as compared to FM-IV and S could be that the fish oil or meal used for FM-IV and C-IV was better for metabolism or had a better bioavailability. The significant differences between C-IV and FM-IV were that FM-I showed higher contents of palmitic acid and linoleic acid, whereas C-IV showed higher eicosapentaenoic acid contents than FM-IV. Some PUFAs cannot be synthesized *de novo* by the human organism but are part of the lipid metabolism and important for membranes (Simopoulos, 2008; Nagy &

Tiuca, 2017). Consequently, PUFAs like $\omega 6$ to $\omega 3$ fatty acids are very important for human nutrition. Simopoulos (2008) explains that the ratio of $\omega 6$ to $\omega 3$ fatty acids is too low in Western diets and it is the main risk factor for developing several diseases such as diabetes or cardiovascular disease. EPA and DHA have also shown to provide anti-inflammatory effects and are great antioxidants (Simopoulos, 2008; Calder, 2012; Lee et al., 2016). Therefore, the enrichment of human diets is desirable (Vérice et al., 2003; Simopoulos, 2008).

3.3. Feeding study

3.3.1. Growth performance and feed conversion of the fish

The study reported by Schafberg et al. (2018) introduced for the first time diet formulations with this combination of microorganisms and the preceding feeding experiment led to healthy individuals. Those had a comparable feed performance like conventionally fed organisms. The new diet composition FM in the present study was optimized to improve the feed performance to a more balanced and efficient feed.

With mean specific growth rates of 1.08% per day (Busacker et al., 1990), mean feed conversion rates of 1.03 kg administered feed per kg weight gain and mean survival rates of 94% the fish fed with diet FM, including *Arthrospira sp.*, *Rhodotorula glutinis*, and *Cryptocodium cohnii* performed as usual in practice and similar if compared with the control diet C. Another difference in this feeding study is the evaluation period of four month, which is more the double than the initial study reported in Schafberg et al. (2018). Consequently, the organisms in the present study are bigger and heavier. The new feed mix led to organisms with a length of 32.4 (± 2.5) cm, which was similar to the control (33.8 ± 2.5 cm) and the industry standard fed groups (34.9 ± 2.2 cm). The weight gain of the group fed with FM was a bit less (340 g) than the control group (390 g), but not significantly. The standard group was between those values (360 g). The results show that the new feed mix led to organisms with a similar growth performance than conventionally fed rainbow trouts.

3.3.2. Antioxidant activity in the fish

For the consumers, the fish fillet is the most important part of consumption. Skin and giblets are in most cases discarded. Consequently, the effects of changes in TAC were monitored solely in the fillets over four months of feeding. As mentioned, phenolic

Table 2
Nutritional parameters and lipid quality parameters of Rainbow Trout (*O. mykiss*) after 16 weeks of feeding.

Parameter [g 100 g ⁻¹ weight]	Feed			Fillets after fed with followed diet		
	S	FM-IV	C-IV	S	FM	C
Dry Mass	91.33 \pm 2.28	88.9 \pm 2.21	92.31 \pm 2.30	27.63 \pm 0.69	28.01 \pm 0.69	28.14 \pm 0.68
Ash	8.8 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2	9.4 \pm 0.2 ^b	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
Proteins	45.8 \pm 1.2	46.3 \pm 1.1	45.8 \pm 1.1	19.4 \pm 0.5	19.1 \pm 0.5	19.4 \pm 0.5
Fat	14.8 \pm 0.4 ^c	10.0 \pm 0.3	14.0 \pm 0.4 ^c	8.2 \pm 0.2 ^c	7.5 \pm 0.2	7.8 \pm 0.2 ^c
Selected Fatty Acids [g fatty acid 100 g ⁻¹ weight]						
C16:0 Palmitic acid	2.22 \pm 0.06 ^a	1.58 \pm 0.04	1.88 \pm 0.05 ^a	1.42 \pm 0.04	1.46 \pm 0.04	1.39 \pm 0.3
C16:1 Palmitoleic acid	0.30 \pm 0.01 ^c	0.03 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
C18:0 Stearic acid	0.59 \pm 0.01 ^a	0.36 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01 ^a	0.42 \pm 0.01	0.43 \pm 0.40	0.40 \pm 0.01
C18:1 Oleic acid	7.53 \pm 0.19 ^a	3.05 \pm 0.08	4.52 \pm 0.11 ^a	0.30 \pm 0.01	0.25 \pm 0.29	0.29 \pm 0.01
C18:2 Linoleic acid	2.64 \pm 0.07 ^a	1.61 \pm 0.04	1.94 \pm 0.05 ^a	0.78 \pm 0.02	0.65 \pm 0.01	0.76 \pm 0.02
C18:3 γ -Linolenic acid	0.04 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	< LOQ	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01
C18:3 α -Linolenic acid	0.66 \pm 0.02 ^b	0.37 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01 ^b	0.14 \pm 0.01 ^b	0.10 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01 ^b
C20:4 Arachidonic acid	0.06 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
C20:5 Eicosapentaenoic acid	0.19 \pm 0.01	0.23 \pm 0.01	0.42 \pm 0.01 ^a	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01 ^c
C22:5 Docosapentaenoic acid	0.10 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
C22:6 Docosahexaenoic acid	0.18 \pm 0.01 ^a	0.45 \pm 0.01	0.66 \pm 0.11 ^a	0.11 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01 ^b

FM = Feed Mix; C = Control Diet; S = Industry Standard Diet; LOQ = 0.005% biomass; IV = Manufacturing step IV: end-product after the application of oil and drying; Feeds compared to FM-IV; Fillets compared to FM.

^a p < 0.05.

^b p < 0.01.

^c p < 0.001.

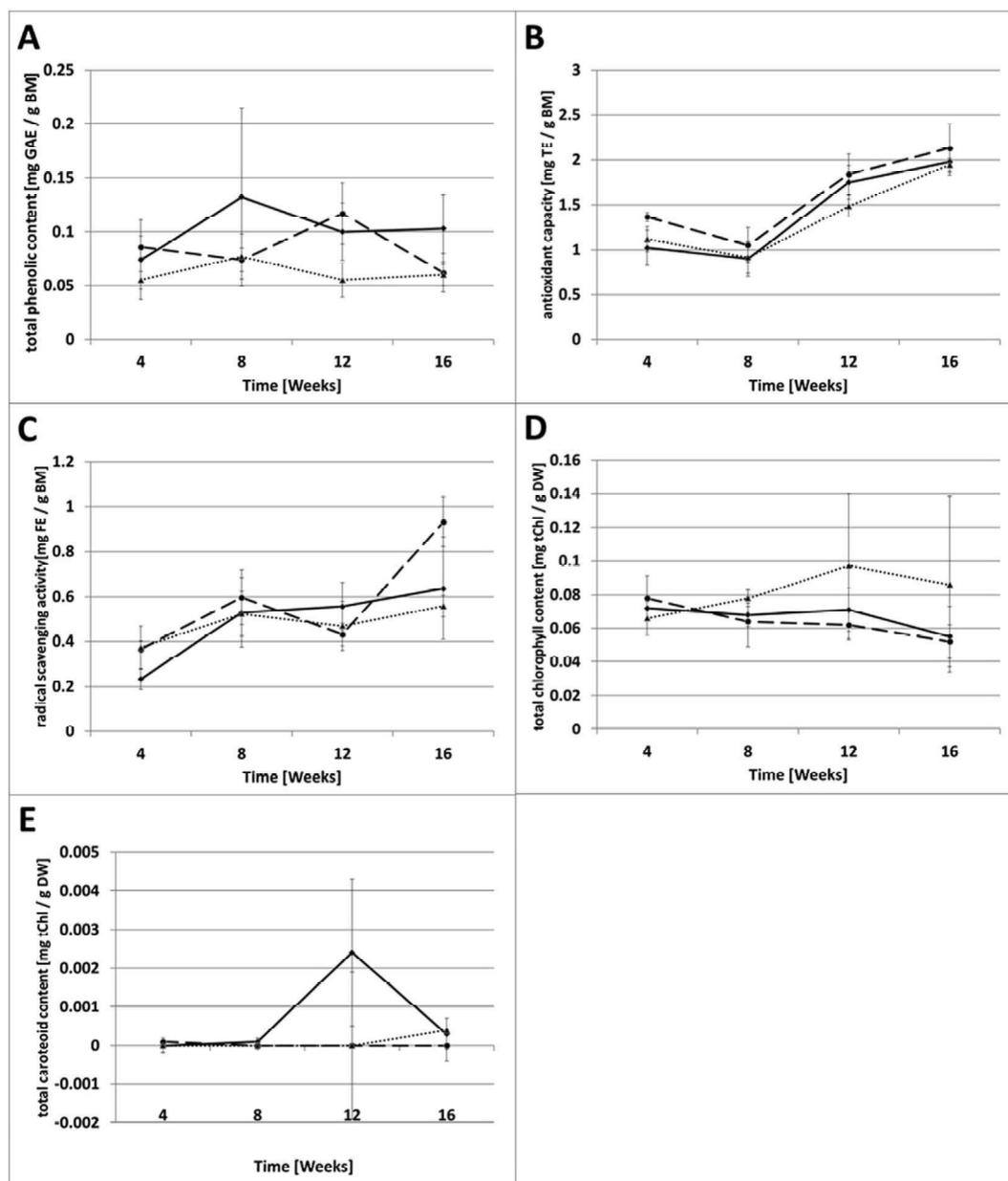


Fig. 4. Changes of bioactive compounds in the fish fillets during the feeding trial of rainbow trout fed with the feed mix (black), the control diet (dotted), and standard industrial diet (dashed). The five plots (A–E) show the changes in the bioactive profile of the fish fillets after being fed with the feed mix (black lines), the control diet (dotted lines), and the standard industrial diet (dashed lines) over the whole study period of 16 weeks. A: total phenolic content B: trolox equivalent antioxidant capacity C: radical scavenging activity D: Total chlorophyll content E: total carotenoid content BM: Biomass DW: Dry weight GAE: Gallic Acid Equivalent TE: Trolox Equivalent FE: Fremy's Salt Equivalent tCar: Total Carotenoid content tChl: Total Chlorophyll content.

compounds have high antioxidant potentials, especially those from algae are known as good radical scavengers, oxygen suppressors, and peroxide decompressors. The common assays are based on these characteristics and use electron transfer reactions (Teixeira et al., 2017; Taghavi Takyar et al., 2019).

As expected, the results of the TPC, radical scavenging activity, TAC, total chlorophyll and carotenoid content of the fillets were all significantly lower than the value of FM-IV or C-IV. Fig. 4 (Suppl. Table S3) illustrates that after four months there were no significant differences in the antioxidant activity of the fillets, regardless of the feed type. The polar antioxidants did not show any correlation between TAC and TPC (Al-Duais et al., 2009; Schafberg et al., 2018), but the radical scavenging activity and TAC showed the same increasing trend. Compared to the experiments described in Schafberg et al. (2018), the present study showed that the chlorophyll and carotenoid content

increased in the fillet over the longer feeding period (within 3–4 months instead of 50 days).

In addition, further quality parameters were determined in the fillets after 16 weeks (Table 2). There were no significant differences within the dry matter, ash, and protein content of all fillet types. The lipid content in the fillets differed only slightly (~1–2%) regarding the biomass. The same three preferred fatty acids were present in the fish fillets – in descending order – palmitic acid, linoleic acid (LA), and stearic acid. The differences in the fish fillets reflected the fatty acid variation in the fish feeds. The high contents of palmitic and stearic acid serve preferably as precursor molecules for the biosynthesis of PUFAs. The high LA content and the presence of the PUFAs originated from the microorganisms, as also described in the literature (Davis and Kristherton, 2003; Tocher, 2015; Lee et al., 2016). Regarding the fatty acid profile within the fat content, the fillets showed significant

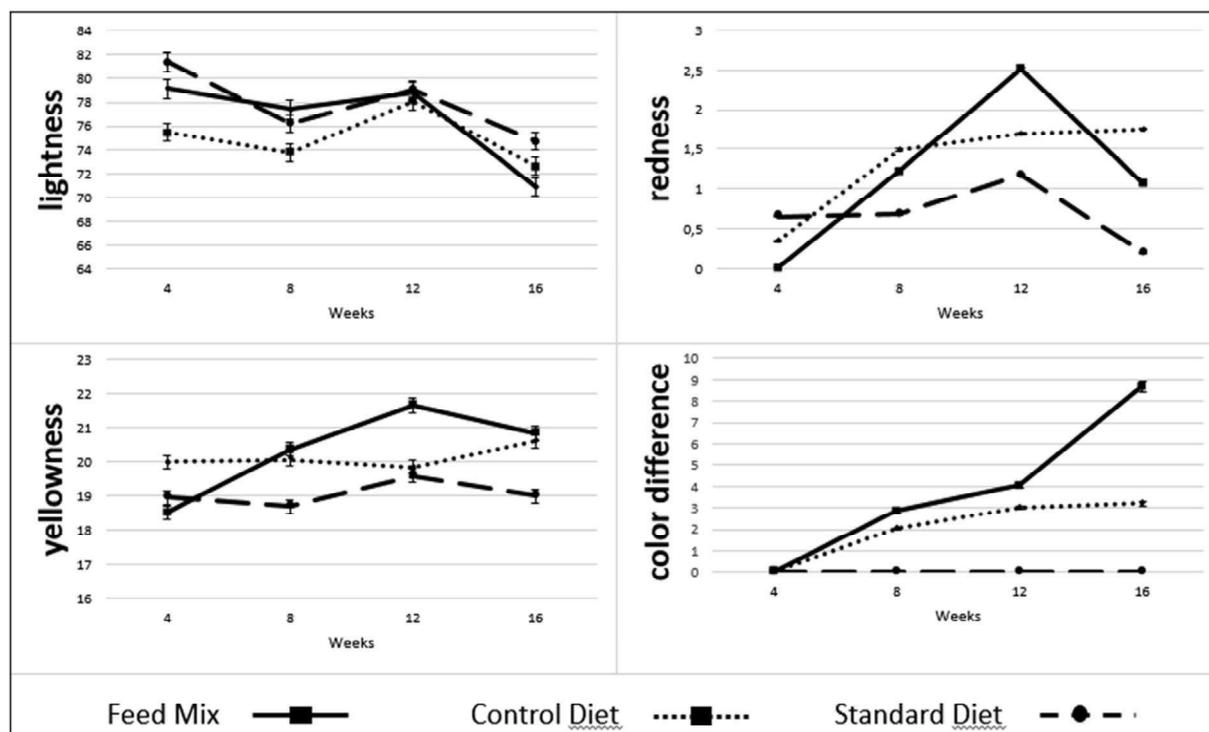


Fig. 5. Changes of the lyophilized fish fillet color. The color changes of the fish fillets over time (16 weeks) were evaluated by using the CIE-L*a*b* color space. In addition to the lightness (L), redness (a), and yellowness (b), the color difference supports the visualization of the color changes compared to week 4. Black lines represent the feed mix, dotted lines the control diet, and dashed lines the standard diet.

differences. Palmitic acid (19.5%) and stearic acid (5.7%) contents in FM fillet fat were significantly higher than in C or S fillet fat. Also, FM fillets showed a significant higher docosahexaenoic acid content (2.0% fat) than in S fillets (1.3%) but a lower content than in C fillets (3.3% fat). FM fillet fat showed a lower content of LA (8.7%) and α -linolenic acid (1.3%) than C and S fillets. The C fillets had a significantly higher content of PUFAs (17.4%) than FM fillets (13.2%) or S fillets (13.8%).

FM-IV had the highest content of PUFAs, but an accumulation in the fillets was not significantly higher than in the fillets of the standard feed. FM-IV also showed the highest γ -linolenic acid content (0.8%), being approximately three times higher than for S (0.27%). The resorption of γ -linoleic acid was not as high as expected and was only present in traces in all fillets. C-IV and FM-I had significantly higher docosahexaenoic acid contents (4.6%) than S (1.2%), the same effect showed the fillets of FM (2.0%) and C (3.3%) compared to S fillets (1.3%).

3.3.3. Fillet color

In the present feeding study, the fillet color was monitored every month throughout the whole study period to document the color accumulation over 16 weeks. Fig. 5 (Suppl. Table S4) shows the fillet color changes in lightness (L), redness level (a), yellowness level (b), and the color difference (dE) over time.

At the beginning, the color of the fillets (fresh and lyophilized) was reminiscent of creamy or light sand, with the color saturation slightly varying. Some parts showed shades of green or orange, but not all differences were visible to the trained eye.

Over the four months feeding period, the lightness of the fillets decreased and tended to fillets with higher grey levels. This trend was observed for all fillets, no matter which diet was fed.

In fact, feed C and FM led to higher red values in the fillets than feed S. The climax was achieved after 12 (FM) and 16 (C) weeks depending on the feed. The fillets of the standard diet showed the same trend in redness than the FM fillets after 16 weeks. In week 16, the FM fillets had a slightly decreased redness level compared to week 12. This could

be an indicator that the accumulation of chlorophylls started by compensating the redness or that the muscle production went up and the carotenoid content stagnated. The yellowness value presented the same trend as the redness level. After 8, 12 and 16 weeks the fillets of the FM and C fed fishes had higher yellow values than the fish fillets of the S diet. The practical eye noticed a slight pale, impression in the control group fillets after 16 weeks, whereas the fillets of FM showed a more orange impression after 16 weeks. The color differences (dE_1) of the fillets from the fishes fed with feed S showed no significant changes over the study period. The fillet color of the fish fed with S was white to grey with no visible color impression. The other two fillet types had visible differences, which increased over time. In the last four weeks, the color differences (dE_p) of FM fillets doubled compared to the level of the C fillets and even more, the FM fillets increased three-fold by comparing these over the whole study period (dE_1). Schafberg et al. (2018) documented the changes of the fillet color over 50 days, whereas the present study monitored the color changes over ~110 days. Compared to results described in Schafberg et al. (2018), the lightness values didn't show significant differences (L: 70–80) but the redness (0.0–2.5) and yellowness (18–22) levels were significantly higher in the present study. So, this present study is a proof that the feed mix led to higher amounts of bioactive compounds as requested. This raises the question of whether consumers accept the light-yellow appearance of the rainbow trout fillets.

4. Conclusion

This study underlines the importance of monitoring changes of ingredients in the feed production process and demonstrated a transformation occurring in the series from fish feed raw materials over fish feed production to the accumulation in the fish fillets of *Oncorhynchus mykiss*, when being fed with a new microorganism-based fish feed. The new feed is effective and comparable with common industrial feeds and led to healthy fishes, without deficiencies in the nutritional intake of lipids and proteins, or corresponding growth deficits. The concentration

of antioxidant substances decreased steadily during the whole process, but there was also a successful enrichment of bioactive substances in the fish fillets such as antioxidant pigments. The accumulation of pigments in the fillets were dominated by carotenoids over chlorophylls. Another positive aspect of the new feed mix was the improved antioxidant activity in the fillets. Beside those positive effects, there are still some challenges and questions remaining: Is a yellowish fillet color acceptable for the consumer? Is the carotenoid content related to (human) nutritional recommendations? Is it possible to use those changes in the context of market strategies and corresponding legal requirements such as health claim regulations? Those questions need to be answered in the future.

Funding

This work was supported by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) and the Federal Office for Agriculture and Food (BLE) under the grant number FKZ 2817303010.

Declaration of competing interest

Authors declare that there is no conflict of interest and have approved the final manuscript.

Acknowledgment

These results are from the project “FENA - fishmeal, and oil substitutes for a sustainable aquaculture” which as funded by the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) according to a decision of the German Bundestag. In addition, we would like to thank Prof. Dr. Riehn and her working group from the Hamburg University of Applied Sciences, Hamburg, Germany, for providing the color evaluation system.

Abbreviations

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
BM	biomass
C	control diet
Chl	Chlorophyll
DHA	docosahexaenoic acid
DW	dry weight
dE	color difference
EPR	Electron paramagnetic resonance
FM	feed mix
GAE	gallic acid equivalents
LA	linoleic acid
NCS	natural color system
PUFA	polyunsaturated fatty acids
ROS	reactive oxygen species
S	standard diet
TAC	total antioxidant capacity
TE	Trolox equivalents
TPC	total phenolic content

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734633>.

References

Abbas, C.A., 2006. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours, and vitamins by yeasts. In: Querol, A., Fleet, Graham, H. (Eds.), *Yeast in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 285–334. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_10.

- Al-Duais, M., Müller, L., Böhm, V., Jetschke, G., 2009. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. *Eur. Food Res. Technol.* 228 (5), 813–821. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0994-8>.
- Anderson, S., 2001. In: Johnston, Richard S., Shriver, Ann L. (Eds.), *Salmon Color and the Consumer. Microbehavior and Macroresults: Proceedings of the Tenth Biennial Conference of the International Institute of Fisheries Economics and Trade*, July 10–14, 2000, Corvallis, Oregon, USA. International Institute of Fisheries Economics and Trade (IIFET), Corvallis.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>.
- Barrows, F.T., Frost, J.B., 2014. Evaluation of the nutritional quality of co-products from the nut industry, algae and an invertebrate meal for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 434, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.037>.
- Bell, M., Dick, J.R., Porter, A.E.A., 2003. In vivo assays of docosahexaenoic acid biosynthesis in fish. In: *The Big Fish Bang; 26th Annual Larval Fish Conference*.
- Bortoluzzi, C., Schmidt, J.M., Bordignon, H.L.F., Fülber, L.M., Layter, J.R., Fernandes, J.I.M., 2016. Efficacy of yeast derived glucomannan or algae-based antioxidant or both as feed additives to ameliorate mycotoxicosis in heat stressed and unstressed broiler chickens. *Livest. Sci.* 193, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.09.005>.
- Breitmaier, E., 2006. Terpenes: importance, general structure, and biosynthesis. In: *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. <https://doi.org/10.1002/9783527609949.ch1>.
- Brown, K.R., Barnes, M.E., Parker, T.M., Fletcher, B., 2016. Retention of fillet coloration in rainbow trout after dietary astaxanthin cessation. *Fish. Aquac.* J. 7 (1). <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000163>.
- Busacker, G.P., Adelman, I.R., Goolish, E.M., 1990. Growth. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, pp. 363–387.
- Calder, P.C., 2012. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75 (3), 645–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04374.x>.
- Camire, M.E., Camire, A., Krumhar, K., 1990. Chemical and nutritional changes in foods during extrusion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29 (1), 35–57. <https://doi.org/10.1080/104083990095275139>.
- Canjura, F.L., Schwartz, S.J., Nunes, R.V., 1991. Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides. *J. Food Sci.* 56 (6), 1639–1643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08660.x>.
- Cheftel, J.C., 1986. Nutritional effects of extrusion-cooking. *Food Chem.* 20, 263–283. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(86\)90096-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(86)90096-8).
- Davis, B.C., Kris-Etherton, P.M., 2003. Achieving optimal essential fatty acid status in vegetarians: current knowledge and practical implications. *Am. J. Clin. Nutr.* 78 (3), 640S–646S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.640S>.
- De Paula, R., Rabalski, I., Messia, M.C., Abdel-Aal, E.-S.M., Marconi, E., 2017. Effect of processing on phenolic acids composition and radical scavenging capacity of barley pasta. *Food Res. Int.* 102, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.088>.
- Dirks, R.C., Faiman, M.D., Huyser, E.S., 1982. The role of lipid, free radical initiator, and oxygen on the kinetics of lipid peroxidation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63 (1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(82\)90022-9](https://doi.org/10.1016/0041-008X(82)90022-9).
- Fiol, M., Weckmüller, A., Neugart, S., Schreiner, M., Rohn, S., Krumbein, A., Kroh, L.W., 2013. Thermal-induced changes of kale's antioxidant activity analyzed by HPLC-UV/Vis-online-TEAC detection. *Food Chem.* 138 (2–3), 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.101>.
- Gouveia, L., Rema, P., 2005. Effect of microalgal biomass concentration and temperature on ornamental goldfish (*Carassius auratus*) skin pigmentation. *Aquacult. Nutr.* 11, 19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00319.x>.
- Guild, J., 1932. The colorimetric properties of the spectrum. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. - Ser. A Contain. Pap. a Math. or Phys. Character* 230, 149–187. <https://doi.org/10.1098/rsta.1932.0005>.
- Habib, Md A.B., Parvin, M., Huntington, T.C., Hasan, M.R., 2008. A Review on Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feed for Domestic Animals and Fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular; No. 1034*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Harper, J.M., Jansen, G.R., 1985. Production of nutritious precooked foods in developing countries by low-cost extrusion technology. *Food Rev. Int.* 1 (1), 27–97. <https://doi.org/10.1080/87559128509540766>.
- Hauptman, B.S., Barrows, F.T., Block, S.S., Gibson Gaylord, T., Paterson, J.A., Rawles, S.D., Sealey, W.M., 2014. Evaluation of grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 432, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.026>.
- Hillig, F., 2014. Impact of Cultivation Conditions and Bioreactor Design on Docosahexaenoic Acid Production by a Heterotrophic Marine Microalga. Dissertation Technische Universität Berlin, Fakultät III – Prozesswissenschaften <https://doi.org/10.14279/depositonce-4002>.
- Ilo, S., Schoenlechner, R., Berghofe, E., 2000. Role of lipids in the extrusion cooking processes. *Grasas Aceites* 51 (1–2), 97–110. <https://doi.org/10.3989/gya.2000.v51.i1-2.410>.
- Jaspars, E.M.J., 1965. Pigmentation of tobacco crown-gall tissues cultured *in vitro* in dependence of the composition of the medium. *Physiol. Plant.* 18, 933–940. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1965.tb06990.x>.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants. *Algae and Natural Phytoplankton Biochemistry and Physiology der Pflanzen (BPP)* 167, 191–194. [https://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](https://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3).

- Killeit, U., 1994. Vitamin retention in extrusion cooking. *Food Chem.* 49, 149–155. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90151-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90151-1).
- Kurutas, E.B., 2016. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal* 15 (71). <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>.
- Lanfer-Marquez, U.M., Barros, R.M.C., Sinnecker, P., 2005. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Res. Int.* 38, 885–891. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.012>.
- Lee, J.M., Lee, H., Kang, S.B., Park, W.J., 2016. Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients* 8 (1), 23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>.
- LFGB, Lebensmittel, 2015. *Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (German Food and Feed Code) (2016) Bundesgesetzblatt, I, Nr. 27. IAW: amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren. In: (62. Ergänzungslieferung) Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). Beuth Verlag GmbH, Berlin, 978-3-410-11220-4, pp. 1426–1470.*
- Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F., Jiang, Y., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem.* 102 (3), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1–F4.3.8. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>.
- Lund, I., Dalsgaard, J., Rasmussen, H., Holm, J., Jokumsen, A., 2011. Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance. *Aquaculture* 321 (3–4), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.028>.
- Miles, R.D., Chapman, F.A., 2005. *The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets. Publication FA122, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.* <http://edis.ifas.ufl.edu/FA122>.
- Moussa-Ayoub, T.E., Youssef, K., El-Samahy, S.K., Kroh, L.W., Rohn, S., 2015. Flavonol profile of cactus fruits (*Opuntia ficus-indica*) enriched cereal-based extrudates: authenticity and impact of extrusion. *Food Res. Int.* 78, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.019>.
- Nakano, T., Kanmuri, T., Sato, M., Takeuchi, M., 1999. Effect of astaxanthin rich red yeast (*Phaffia rhodozyma*) on oxidative stress in rainbow trout. *Biochem Biophys Acta* 1426, 119–125. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00145-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00145-7).
- Nagy, K., Tiuca, I.D., June 21st 2017. Importance of fatty acids in physiopathology of human body, fatty acids, angel catala. *Intech.* <https://doi.org/10.5772/67407>.
- Oduntan, O.B., Bamgboye, A.I., Ojekunle, E.I., 2018. Design of experiments optimisation study on the fat coating machine for extruded fish feed. *Horticulture International Journal* 2 (6), 338–342. <https://doi.org/10.15406/hij.2018.02.0073>.
- Øverland, M., Sørensen, M., Storebakken, T., Penn, M., Krogdahl, Å., Skrede, A., 2009. Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture* 288 (3–4), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.012>.
- Özer, E.A., Herken, E.N., Güzel, S., Ainsworth, P., Ibanoglu, S., 2006. Effect of extrusion process on the antioxidant activity and total phenolics in a nutritious snack food. *Int. J. Food Sci. Technol.* 41, 289–293. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01062.x>.
- Paciulli, M., Palermo, M., Chiavaro, E., Pellegrini, N., 2017. second ed. Chlorophylls and Colour Changes in Cooked Vegetables. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health, vol. 1.* pp. 703–719. <https://doi.org/10.1002/9781119158042.ch31>.
- Pangestuti, R., Kim, S.-K., 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods* 3 (4), 255–266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>.
- Park, S., Choi, J.J., Park, B.-K., Yoon, S.J., Choi, J.E., Jin, M.J., 2014. Pheophytin a and chlorophyll a suppress neuroinflammatory responses in lipopolysaccharide and interferon- γ -stimulated BV2 microglia. *Life Sci.* 103 (2), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.003>.
- Preedy, V.R., 2012. *Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects.* Royal Society of Chemistry <https://doi.org/10.1039/9781849735506>.
- Qu, D., Wang, S.S., 1994. Kinetics of the formations of gelatinized and melted starch at extrusion cooking conditions. *Starch* 46 (6), 225–229. <https://doi.org/10.1002/star.19940460605>.
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Shanthi, R., Muralisankar, T., 2014. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 67 (2), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.12.003>.
- Schafberg, M., Loest, K., Meister, U., Kurth, E., Müller-Belecke, A., Rohn, S., 2018. Partial fishmeal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*). *Eur. Food Res. Technol.* 244 (1), 127–143. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2939-6>.
- Selvaraj, V., Sampath, K., Sekar, V., 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 19 (4), 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.001>.
- Şensoy, I., Rosen, R.T., Ho, C.-T., Karwe, M.V., 2006. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. *Food Chem.* 99, 388–393. <http://doi:10.1016/j.foodchem.2005.08.007>.
- Sergejevová, M., Masojídek, J., 2012. Chlorella biomass as feed supplement for freshwater fish: sterlet, *Acipenser ruthenus*. *Aquacult. Res.* 44 (1), 157–159. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03011.x>.
- Simopoulos, A.P., 2008. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 (S1), 131–134 PMID: Pubmed/18296320.
- Smith, T., Guild, J., 1931-1932. The C.I.E. colorimetric standards and their use. *Trans. Opt. Soc.* 33 (3), 73–134. <https://doi.org/10.1088/1475-4878/33/3/301>.
- Taghavi Takyar, M.B., Khajavi, S.H., Safari, R., 2019. Evaluation of antioxidant properties of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. *LWT – Food Science and Technology* 100, 244–249. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.079>.
- Teimouri, M., Amirkolaie, A.K., Yeganeh, S., 2013. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 396–399, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.009>.
- Teixeira, T.S., Vale, R.C., Almeida, R.R., Ferreira, T.P.S., Guimaraes, L.G.L., 2017. Antioxidant potential and its correlation with the contents of phenolic compounds and flavonoids of methanolic extracts from different medicinal plants. *Revista Virtual de Quimica* 9 (4), 1546–1559. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170090>.
- Tocher, D.R., 2015. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>.
- Treier, R., 1991. *Coaten erleichtert einhalten von Garantiewerten. Kraftfutter* 74 (14), 16.
- Véricel, E., Polette, A., Bacot, S., Calzada, C., Lagarde, M., 2003. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J. Thromb. Haemost.* 1 (3), 566–572. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00076.x>.
- Zatková, I., Sergejevová, M., Urban, J., Vachta, R., Štys, D., Masojídek, J., 2011. Carotenoid-enriched microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: albinic form of wels catfish (*Silurus glanis*). *Aquacult. Nutr.* 17 (3), 278–286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2009.00751.x>.

6.3. Pike-Perch (*Sander lucioperca*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil - Fishes' Growth Performances and Quality Traits (Publikation III)

Pike-Perch (Sander lucioperca) and Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil – Fishes' Growth Performances and Quality Traits

Michaela Schafberg, Karin Loest, Andreas Müller-Belecke, Sascha Rohn

Foods **2021**, 10, 1799

Impact Factor: 5.56 (2021)

DOI: 10.1007/s00217-017-2939-6

Synopse

Die in diesem Kapitel aufgeführte Veröffentlichung knüpft an die Erkenntnisse der vorangegangenen Arbeiten an. Sie beschreibt ebenfalls einen Teil der Pilotstudie. Der Fokus lag zum einen auf der Verifizierung der gleichwertigen Wachstums- und Schlachtkörperparameter durch die Fütterung des neuen Fischfutters an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) und Zander (*Sander lucioperca*). Zum anderen lag der Fokus auf der Untersuchung der Filetqualität über den Studienzeitraum und der sensorischen Bewertung der Fischfilets am Ende des Studienzeitraums. Die abschließende Sensorik schloss auch die gustatorische Bewertung ein und diente zur Aufdeckung möglicher gravierender Abweichung von den vom Verbraucher bekannten sensorischen Eigenschaften.

Die Arbeiten dieser Publikation wurden in Kooperation mit verschiedenen Einrichtungen durchgeführt: Das Institut für Getreideverarbeitung GmbH (IGV) kultivierte die Cyanobakterien „*Arthrospira* sp.“. Am Institut für Angewandte und Molekulare Mikrobiologie der Technischen Universität Berlin wurde die Fettheife „*Rhodotorula glutinis*“ kultiviert. Das Institut für Bioverfahrenstechnik der Technischen Universität Berlin kultivierte die Rotalge „*Cryptocodinium cohnii*“. Das Testfutter Nr. 5 und das Vergleichsfutter wurden am IGV hergestellt. Die Fütterungsstudie inklusive der Aufnahme der Wachstums- und Schlachtkörperparameter sowie der Sensorik wurden am Institut für Binnenfischerei Potsdam-Sacrow (IfB) durchgeführt.

Die Analytik und die statistische Auswertung wurden an der Universität Hamburg am Institut für Lebensmittelchemie in Hamburg durchgeführt. Der eigene Anteil an dieser Veröffentlichung wird mit 40% angegeben.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Die ergänzenden Informationen (*Supplemental Material*) befinden sich im Anhang 10.1.2.

Article

Pike-Perch (*Sander lucioperca*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil—Fishes' Growth Performances and Quality Traits

Michaela Schafberg ¹ , Karin Loest ², Andreas Müller-Belecke ³ and Sascha Rohn ^{1,4,5,*} 

- ¹ Institute of Food Chemistry, Hamburg School of Food Science, University of Hamburg, Grindelallee 117, 20146 Hamburg, Germany; schafberg@chemie.uni-hamburg.de
- ² IGV Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Arthur-Scheunert-Allee 40/41, 14558 Nuthetal, Germany; karin.loest@igv-gmbh.de
- ³ Institute of Inland Fisheries Potsdam-Sacrow (IfB), Im Königswald 2, 14469 Potsdam, Germany; andreas.mueller-belecke@ifb-potsdam.de
- ⁴ Institute for Food and Environmental Research (ILU) e. V., Papendorfer Weg 3, 14806 Bad Belzig, Germany
- ⁵ Department of Food Chemistry and Analysis, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Technische Universität Berlin, TIB 4/3-1, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin, Germany
- * Correspondence: rohn@tu-berlin.de; Tel.: +49-303-1472-583



Citation: Schafberg, M.; Loest, K.; Müller-Belecke, A.; Rohn, S. Pike-Perch (*Sander lucioperca*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil—Fishes' Growth Performances and Quality Traits. *Foods* **2021**, *10*, 1799. <https://doi.org/10.3390/foods10081799>

Academic Editors:
Theodoros Varzakas and
Rogério Mendes

Received: 6 June 2021
Accepted: 2 August 2021
Published: 4 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In the last decades, several plant-based materials were used for the substitution of fish meal and oil in aquaculture. The present study evaluated the fish quality and the sensory differences of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*) from three different feeding groups, which were fed a commercially available industrial (standard) diet, a control diet, and a special microorganism-based feed mix. This feed mainly consisted of a mix made of *Rhodotorula glutinis*, *Cryptocodium cohnii*, and *Arthrospira* sp. and had 50% less fish meal and fish oil compared to typical control diets. At the beginning, the pike-perch population was six months old, and the rainbow trout population was 15 months old. The feeding study duration was 16 weeks and every four weeks the growth performance and several morphometric parameters were recorded. Afterwards, sensory evaluation took place to identify possible trends. Sensory evaluation revealed that the rainbow trout groups did not show any significant differences to the standard and control fish fillets with regard to odor, texture, and taste. The effects on rainbow trout growth performances and carcass parameters were similar to the standard group. The feed mix was not optimal for pike-perch farming, which was also reflected by significantly adversely affected growth performance and carcass parameters. The sensorial evaluation showed an opposite trend: here, only small differences in the fillets from the feed mix and standard/control diet were observed.

Keywords: fish meal substitution; rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); pike-perch (*Sander lucioperca*); *Arthrospira* sp.; *Cryptocodium cohnii*; *Rhodotorula glutinis*; sensory impression

1. Introduction

Fisheries, aquaculture, fish consumption, and their perception have already changed a lot in the last decades [1–3]. One of the consequences of oceans' overfishing was, in addition to the increasing aquaculture sector, the protection of livestock, regulated by EU guidelines [4–6]. Additionally, this was supported by the intensified medial spread of the health-beneficial aspects of fish consumption [2,7], as well as pressure from animal protection associations [8,9]. Fish is recommended as being an important part of a healthy diet for humans, because of its high-quality protein, its fatty acid profile, and its micronutrients. It is also low in carbohydrates, saturated fatty acids, and cholesterol [2,3,10,11].

Two important, but very controversially discussed fish feed ingredients are fish meal and fish oil. Fish meal and fish oil production is a huge industry that forces the exploitation

of local seas and, in most cases, it is not sustainable at all, although a quarter of the world's fish meal is made of fish processing waste as a raw material [3,11–15]. Another imported aspect is the price for fish meal and oil, which has significantly increased in the last decades [13].

Even when the content of fish meal and oil is continually reduced, both ingredients were regarded as the simplest source of proteins and polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as omega-3 or omega-6 fatty acids [16,17]. Moreover, as an additive or ingredient, fish oil has a huge impact on the taste and flavor of the final fish products [18,19]. However, this needs to be addressed and alternatives need to be developed. So far, fish meal and oil have been partially or completely substituted in many fish feeds by plant-based materials, but also more innovative biomasses such as microorganisms (algae/cyanobacteria) [20,21]. In addition, plant-based oils or concentrates made from, e.g., soy [22] and other vegetables, have been used [23–25]. The listing of these examples is not claiming to be complete, but it should illustrate the intense variation and efforts that have been conducted in the recent years.

When substituting fish oil, special attention has to be given to the PUFA content, as these are indispensable for humans. They are not or insufficiently biosynthesized in humans and should be supplied by eating marine fish. Consequently, PUFA content in fish should not be diminished by alternative feeds [26,27]. Zhu et al. (2021) compared the replacement of fish oil (0%, 50%, 100%) with microalgae (*Aurantiochytrium*) or astaxanthin in young rainbow trout and found that the replacement of 50% fish oil had no negative effects on fishes' growth performance [28]. For example, Øverland et al. (2009) substituted fish meal with pea protein in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*) [29], whereas Barrows and Frost [30] used co-products from the nut industry, algae, and invertebrate meals in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [30]. The sensory aspects such as the variation of the fillet color or the skin color are typical parameters that need to be considered, as well [13,31]. However, the variations of taste, flavor, and texture of the fillets, especially, of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*) were hardly taken into account and accordingly have not been described yet comprehensively.

In 2019, around 18,500 t of fish and fishery products were produced in German aquaculture, a third came from rainbow trout (~6200 t) and 57 t were pike-perch [32]. Furthermore, these two species represent typical edible fish in Germany. They are low-PUFA freshwater fishes and important for human nutrition. Schafberg et al. (2020) already showed in a recent study the effects of an innovative feed on antioxidant activity with regard to the course from raw materials over feed production into the fillets of rainbow trout [31]. In that study, three diets were compared: a commercially available industrial (standard) diet, a control diet, and a new feed mix. In that mix, fish meal and oil content were reduced by half (compared to the control diet). For preventing nutrient deficiency, a mixture of the microorganisms *Cryptocodinium cohnii*, *Arthrospira* sp., and *Rhodotorula glutinis* was used [13,31]. *R. glutinis* was chosen as the new lipid source. *C. cohnii* was used to increase the PUFA content, in particular the docosahexaenoic acid (DHA) content, because *C. cohnii* can contain up to 50% DHA per dry matter [18,33,34]. Instead of fish meal, *Arthrospira* sp. was used as the new additional source of proteins [13,18,31]. In order to ensure sustainable aquaculture, microorganisms were cultivated in biotechnological processes [18,33,34]. Schafberg et al. (2020) showed that the microorganism-based feed mix led to healthy fish, which were comparable to conventionally fed fishes and led to the accumulation of carotenoids and other antioxidants in the fish fillets [31].

The present study aimed at evaluating the growth and quality traits of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*). Both are fish being typically consumed in Germany. Further, they were chosen for comparing between a predatory and non-predatory species. It was hypothesized that predatory fishes cannot cope well with that new fish feed mix. As growth and health performance parameters, weight, length, specific growth rate, feed conversion ratio and k-factor were chosen. Liver color was used to reveal possible adverse effects in liver metabolism and lipid accumulation. Besides, carcass

parameters such as length, weight, and color are important for fish farmers, but these are also very important decision criteria for consumers. For them, the fillet of the fish is the most valuable part due to several factors, such as health benefits, taste, appearance, or growing conditions (conventional vs. (organic) sustainable aquaculture) [35–39]. Consequently, the sensory evaluation was regarded as a further important aspect, and the color, odor, texture, and taste of the fish fillet were also characterized in the present study. The accumulation of any substances with positive health benefits is irrelevant when the product does not meet consumers' expectations and acceptance.

2. Materials and Methods

2.1. Feeds

Feed mixes and their nutritional parameters were already described by Schafberg et al. [31]. The commercially available industrial (standard) feed (ALLER METABOLICA, 4.5 mm; Prod. No. 41400342) was purchased from Alleraqua GmbH, Golssen, Germany. IGV GmbH (Nuthetal, Germany). The control feed was created and produced by the very well-experienced industry partner *vitafeed* Spezialfuttermittelwerk Beeskow GmbH (Sfw; Beeskow; Germany), based on a well-established recipe with 37.9% fish meal and 13.6% fish oil. The new feed mix was based on the same recipe as the control diet, but the feed mix consisted only of half of fish meal and fish oil. The other half was replaced by a mix of *Arthrospira* sp. (12.1%), *Cryptocodinium cohnii* (4.5%), and *Rhodotorula glutinis* (9.0%). The pellets had a diameter of 4 mm and were stored at room temperature until feeding.

2.2. Fish Feeding Trials

2.2.1. Experimental Set-Up

The fish feeding trials took place at the Institute of Inland Fisheries Potsdam-Sacrow (IfB), Germany. The trials took 16 weeks (from the end of July 2015 to mid-November 2015) and three different diets (S: commercially available industrial (standard) diet; C: control diet; FM: feed mix) were tested with pike-perch (406 individuals in total) and rainbow trout (391 individuals in total) in duplicate. The trials were performed under aquaculture conditions of a semi-industrial scale. Pike-perch was kept in a recirculation aquaculture system including six rearing tanks of each 1.4 m³. The water temperature was 22 °C. Rainbow trout were kept in a recirculation system at 11 °C, using deep water of the adjacent Lake Sacrow (Potsdam-Sacrow, Germany) for cooling by heat exchangers. Six groups were kept per experiment (two groups per diet). Both species were initially stocked into the tanks for acclimation for two weeks. During the first four weeks of the feeding studies, the maximum daily amount of consumed feed (FI max.) was determined. In the further course, to achieve optimal feed conversion, the daily feed administration was set about 10% below the maximum feed amount. The percentage of these amounts was therefore based on the fish biomass of each group and the species available at the start of the experiment and was adjusted monthly after each weighing. The populations were automatically fed every four hours for the whole trial period. Consequently, slowly growing groups therefore received less feed in total. This approach is unavoidable, as non-consumed feed can lead to massive pollution of the water and the fish. The fish harvesting was based on the codes of good practice for food-producing fish for human consumption.

2.2.2. Fish Samples

The IfB cultivated their own pike-perch fingerlings, which were approx. 6 months old. The tested pike-perch population consisted of 66 to 70 individuals (average initial weight 174 g ± 44 g) per feeding group (S; C; FM) and tank (two tanks per diet). The rainbow trout population was obtained from a culture from Saxony-Anhalt (Germany) and the fish were approx. 15 months old. The tested rainbow trout population consisted of 64 to 66 individuals per diet (S; C; FM) and tank, with an approx. weight of 139 g ± 33 g.

The fish of each tank were weighed and measured once a month (pike-perch: day 0, 35, 63, 91, and 120; rainbow trout: day 0, 31, 59, 89, and 115). At the end of the trials, fish

were removed from the tanks, anesthetized, and killed in accordance with the German Animal Welfare Act. The morphometric traits, growth and other parameter were analyzed directly after the killing. Afterwards, the organs were removed, and the fish was filleted. All samples were collected in plastic bags and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The fish fillets were pooled for the analysis of the proximate composition and the metabolites.

2.2.3. Growth Performance and Carcass Parameter

The following growth performance and carcass parameters were estimated for all three diets at the end of the trial: Weight gain [%], total fish length [cm], fillet weight [g], liver weight [g], intestinal fat [g], and survival rate [%]. The specific growth rate (SGR) was calculated as $(\log_e \text{weight}_{\text{end}} [\text{g}] - \log_e \text{weight}_{\text{start}} [\text{g}]) / \text{days} \times 100$ according to Busacker et al. [40]. The condition factor (k-factor) was calculated as $\text{weight} [\text{g}] / \text{length}^3 [\text{cm}^3] \times 100$ according to Fulton (1904) and the feed conversion ratio (FCR) as the amount feed [kg]/increased weight [g] [41]. The intestinal fat somatic index (IFSI) is the ratio of intestinal fat weight [g] to fish weight [g], whereas the hepatosomatic index (HSI) describes the ratio of liver weight [g] to fish weight [g]. The survival rate was calculated over the whole study period. The colors of the fresh (as well as lyophilized) fillet and the fresh (as well as lyophilized) liver were described using CIE color space $L^*a^*b^*$ [42–44]; this is indicated by the luminosity (L), level of redness or the red–green axis (a), and yellowness level or the blue–yellow axis (b). The color difference (dE) is explained in more detail. On the one hand, the color difference of the liver (dE_{week4}) between Week 4 and Week 16 was compared and, on the other hand, the color difference (dE_{Feedmix}) between the liver color of the diet FM to S and C was compared after 16 weeks. When the dE value is more than 1, it is defined as distinguishable to the practiced eye.

2.3. Chemical Parameters

2.3.1. Chemicals

Acetyl chloride, n-heptane, disodium hydrogen phosphate, methanol, sodium chloride, and sodium sulfate were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany). Sodium carbonate was purchased from Grüssing GmbH (Filsum, Germany). All chemicals used in the experiments were of analytical grade and all aqueous solutions were prepared with ultrapure deionized water.

2.3.2. Fillet and Liver Color

The determination of the fillet and liver color was analyzed photometrically according to Schafberg et al. and the definite color was determined using the CIE-Lab color space [31].

2.3.3. Determination of the Fatty Acid Profile

According to Schafberg et al. (2018), the fatty acid (FA) profiles of the fish fillets were determined as fatty acid methyl esters [13]. The results were expressed as g fatty acid 100 g^{-1} biomass. The limit of quantification (LOQ) was $0.005\text{ g FA } 100\text{ g}^{-1}$ weight.

2.3.4. Determination of Ash, Dry Mass, and Protein Content

The ash, dry mass, and protein content of the fish fillets were analyzed according to Schafberg et al. [31]. The results were expressed as g 100 g^{-1} BM. The LOQ for all three methods was $0.01\text{ g } 100\text{ g}^{-1}$ BM.

2.3.5. Statistical Analysis

All analyses were done in triplicate for the statistical analysis. For the identification of significant differences between the groups C, FM, and S, all data were analyzed by descriptive statistics and paired sample *t*-tests using IBM[®] SPSS Statistic version 26. Levene's test was used to check for homogeneity of variance. The significance level was set at $p < 0.05$ and the values were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). In the corresponding tables, the letters "F" and "K" explain the significant difference. Moreover, as "C" is used

as an abbreviation for the control groups, it was tried to avoid misunderstandings. “F” is the significant difference between the standard (or the control) to the feed mix. “K” is the significant difference between the standard and the control.

2.4. Sensory Evaluation

2.4.1. Paired Comparison Test

The sensory evaluation took place at the partner site IfB from 11 to 22 December 2015. The tests were done in paired comparison tests according to ISO EN 5495. The thawed fillet samples were heated in the oven at 180 °C for 10 min and presented to the panelists. The sensory panel consisted of six experienced panelists and the study was divided in three parts (Test I: commercially available industrial (standard) diet vs. new feed mix, Test II: control diet vs. new feed mix, and Test III: standard industrial diet vs. control diet) per species. Each part was run four times to ensure the required sample number ($n = 24$). The paired comparison test focused on the intensity/expression and preference of the following characteristics: odor, color, texture, and taste. As an example, when comparing the two fillets (A vs. B), the panelists should decide whether the respective aspect (here: odor) of the two fillets differed. If there was a difference, it was checked which of the two fillets had a more intense odor and which the panelist would prefer. The possible answer options were ‘no difference’ (ND), A/B more intensive, A/B preferred. In addition to those aspects, experts were asked to write down characteristics that attracted their attention. The panelists were free to choose words for their impressions; no guidelines were given here.

2.4.2. Statistical Analysis

No-difference-decisions by the panelists were assigned to both products tested in equal parts. The default procedures for statistical analysis of the international ISO EN 5495 norm for both-sided tests were then followed. The significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

Over the last decades, many studies tested the effects of the substitution of fish meal and oil in fish feeds used in different kinds of aquaculture. For a partial substitution, several plant-based materials such as nut meal [30] or concentrates of pea protein, horse bean protein, and rapeseed protein [45] have been used. In addition, a wide variety of microorganisms, especially single-cell organisms, are used in the present aquaculture and their cultivation has been optimized accordingly over the last decades [27,46,47]. Further, microorganisms, e.g., up to 10% *Spirulina platensis*, have also been used for rainbow trout feeding [20,48,49]. However, only a few studies that used microorganisms in their feed mixes analyzed the sensory attributes [50], besides the quality traits and growth evaluation of the final fish or fish products. For instance, Schafberg et al. (2018) already described the positive effects of a microorganism mix (*Rhodotorula glutinis*, *Cryptocodium cohnii*, *Arthrospira* sp.) as a feed ingredient on the compatibility of rainbow trout and pike-perch [13]. Afterwards, Schafberg et al. (2020) used a different composition of the microorganism mix and described stabilizing effects on the antioxidant profile during the manufacturing process [31]. The present study used the same mix as described by Schafberg et al. [31], but focused on the growth performance, feed conversion, carcass parameters, and especially, the sensory description and evaluation of the fish fillets.

3.1. Fish Growth Performance and Morphometric Traits

3.1.1. Pike-Perch

The present study underlined the results described by Schafberg et al. (2018) for a pike-perch population [13]. Pike-perch as a predator was forced to cope with this new, comparatively more vegetarian diet, as 50% of the fish meal and oil were substituted. Pike-perch and rainbow trout are both carnivores, but the pike-perch farming is a bit more challenging, as rainbow trout can cope with a higher proportion of vegetarian ingredients. The growth performance and feed conversion in this study showed that the

FM acceptance and conversion was not adequate for pike-perch (Table 1). An important reason for this could be that the digestion of the microorganisms' biomass, especially their cell walls, is insufficient. Carnivores differ in the digestion/adsorption process of complex carbohydrates compared to herbivores and omnivores in the conversion rates. Carnivores have, e.g., lower pancreatic and intestinal enzyme activity towards complex carbohydrates. So, this can also lead to a slower and insufficient conversion of complex polysaccharides and following this also lower growth rates and weight gain [51–53].

Pike-perch showed significant differences in the final fish weight, but also already in the weight gain. The standard diet led to a weight gain of $278 \text{ g} \pm 102 \text{ g}$, compared to the initial weight. So, the fish had grown by about a factor of 2.6. Fish fed with Diet C had a weight of $217 \pm 67 \text{ g}$, which means that the fish initially gained weight by a factor of about 2.2. Fish fed with Diet FM gained “only” twice of their initial weight ($183 \text{ g} \pm 74 \text{ g}$).

The fillets resulting from group FM were significantly smaller (144 g) than the fillets of the feeding group S (185 g), but there were no differences to fillets from Group C (165 g). Generally, the fillet made up about approximately 40% of the total weight for each group.

The intestinal fat and the IFSI showed significant differences. Fish from Group S had 28 g fat (IFSI: 6.3%), whereas Diet FM led to less than half of the intestinal fat (12 g fat; IFSI: 3.4%), and Diet C led to 18 g fat (IFSI: 4.5%). The livers of the Diet S fish weighed significantly more (5.4 g) than the livers of the fish that were fed with Diets C (4.3 g) or FM (4.3 g). These values were expected due to the larger increase in the mass of the S-fish compared to the other diet groups.

The SGR of the fish fed with Diets FM or C ($0.6\% \text{ day}^{-1}$) were lower than those resulting from Diet S ($0.8\% \text{ day}^{-1}$). The same trend was shown at the hand of the k-factor (S: 1.0, FM: 0.8, and C: 0.9). The feed conversion ratio (FCR) of Diets S and C (both approx. 1.1) were significantly lower than of Diet FM (1.6). Regardless of the diet, the fish showed no significant differences in their survival rate (99%), total length (~35 cm), and HSI (~1.2%). On the one hand, the HSI values (~1.16%) in the present study were slightly higher than Lazo et al. (2017) reported for pike-perch (0.8%; $n = 10$). On the other hand, the sample size in the present study was also higher ($n = 66$ and 68). The present HSI results were still in a range that was comparable to values for farmed fish [54].

Liver color was used to reveal possible adverse effects in liver metabolism and fat accumulation (Table 2). A shift in luminosity (L) and/or an increase in the yellowness level (b) can indicate a possible fatty liver. Even though the liver color in Week 16 did not show any significant differences, the calculated color difference compared to Week 4 showed that all three parameters increased. The liver color resulting from Diet FM showed the lowest values overall (e.g., $L = 42.1$), which resulted in the high color differences compared to the liver color of Groups S and C. From this, it can be concluded that there was no increased lipid accumulation in the liver in FM-fed pike-perch, being a kind of evidence of healthy individuals. This is an important part of excluding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), because it is the most common cause of chronic liver disease for all species. It is a clinical syndrome characterized by predominant macrovesicular steatosis of the liver [55]. In the case of disturbed lipid digestion, changes in diet and lifestyle can lead to an improvement in health. Therefore, attention should be paid to the components contained in the food, as these have a direct impact on health or can promote diseases [55,56].

On the basis of the parameters mentioned so far, comparably healthy individuals of all diet groups were assumed, so the (quality) parameters of the fillets were then determined, since it is the most important part of the fish for the consumer. In addition to the fillet color (Table 2), the total lipid content as well as the protein content or the water content are important here (Table 3). The fillets of the FM group had significantly lower amounts of proteins (FM: 20.5%, C: 20.3%, S: 21.2%) and dry mass (FM: 23.6%, C: 24.4%, S: 23.9%) but no significant differences in their water content and total lipid content. With regard to the feeds, there were no significant differences in their dry mass, ash, and total lipid content, but the FM diet had lower amounts of these nutrients than the other diets [31]. Moreover, the protein contents in the diets did not show significant differences (FM: 46.3%,

C: 45.8%, S: 45.8%) [31]. The distribution of nutrients in the feed cannot be transferred 1:1 to the individuals, which shows how the metabolism varies due to the bioavailability of the ingredients.

The fillets of the FM group had the brightest color ($L = 44.7$), the lowest redness level ($a = 1.08$), and a higher yellowness level ($b = -1.58$) than fillets from Groups S and C (Table 2). The fillets of Groups S and C fish differed significantly from the FM fillets. Those parameters led to dE values >1 compared to FM, but it could be already determined visually that the FM fillets were slightly brighter. The lower redness level means a color shift into green compared to the C and S fillets. The reason for the “green shift” is the accumulation of chlorophylls from *Arthrospira* sp., whereas the higher yellowness level resulted from the increased carotenoid content of the microorganisms in the FM diet [13,20,31].

In the present study, all feeding groups showed no differences in the total lipid content between each of the pike-perch fillets, $\sim 1\%$ being a typical value for such a lean fish. In this context, Lazo et al. (2017) already showed similar values in the dry mass, ash, and protein content of pike-perch samples, but a comparatively lower total lipid content [54].

A closer look at the fatty acid profile showed that the fillets of the fish fed in Groups S and C had the following fatty acids predominantly in the fillets, in descending order: oleic acid (18:1), palmitic acid (16:0), linoleic acid (18:2n6, LA), stearic acid (18:0), and DHA (22:6n3). The FA profile in the FM fillets was slightly different, and oleic acid and palmitic acid were also the two dominant FA, but the oleic acid content ($30.0\% \text{ fat}^{-1}$) was significantly lower than in the S fillets ($34.6\% \text{ fat}^{-1}$), and the palmitic acid ($29.1\% \text{ fat}^{-1}$) was significantly higher in the FM fillets than in the S fillets ($23.6\% \text{ fat}^{-1}$). The following FA in the FM fillets were stearic acid ($7.27\% \text{ fat}^{-1}$), LA ($6.64\% \text{ fat}^{-1}$), and palmitoleic acid ($6.36\% \text{ fat}^{-1}$). All three diets showed the same three predominant fatty acids in descending order: oleic acid, LA, and palmitic acid [31]. The amount of oleic acid in the S diet ($50.1\% \text{ fat}^{-1}$) was significantly higher than in the FM ($30.5\% \text{ fat}^{-1}$) or C diet ($32.3\% \text{ fat}^{-1}$) [31]. Moreover, the FM and C diets showed significantly higher DHA ($\sim 4.6\%$) and EPA (FM: $2.3\% \text{ fat}^{-1}$, C: $3.0\% \text{ fat}^{-1}$) contents than S (DHA: $1.2\% \text{ fat}^{-1}$, EPA: $1.3\% \text{ fat}^{-1}$) [31]. The high content of oleic acid, palmitic acid, stearic acid, and LA in the fillets goes hand in hand with the high content of the same fatty acids in the diets [31]. Moreover, the high content of oleic acid and palmitic acid in all fillet groups is in agreement with the findings of previous studies about fatty acids in pike-perch, where oleic acid and palmitic acid were also reported as the dominant fatty acids in farmed and wild pike-perch [13,57,58].

PUFA content in pike-perch fillets consisted mainly of LA, DHA, and eicosapentaenoic acid (20:5n3; EPA). These were significantly higher in the S and C fillets than in the FM fillets.

The feeding period of the present study was twice as long as the previous study described by Schafberg et al. [13]. Consequently, the present individuals were also larger and heavier. This goes along with the higher total lipid content of the fish. In relation to the biomass, the present study showed higher PUFA and lower MUFA (monounsaturated FA) contents than described by Schafberg et al. [13].

Thus, the changes in the FM recipe led to a good PUFA enrichment in the pike-perch fillets in the present study. The accumulation of palmitoleic acid (16:1n7) in FM fillets ($6.36\% \text{ fat}^{-1}$) was significantly higher than in the fillets from Groups S ($0.91\% \text{ fat}^{-1}$) or C ($0.77\% \text{ fat}^{-1}$). Palmitoleic acid is metabolized from palmitic acid via the stearyl-CoA desaturase pathway [13,59–62], this pathway seems to be favored by the intake of the FM diet.

Table 1. Growth and feeding performance of pike-perch (*S. lucioperca*) and rainbow trout (*O. mykiss*).

Feeding Trial Parameter	Pike-Perch Standard Industrial		Pike-Perch FEED Mix		Pike-Perch Control		Rainbow Trout Standard Industrial		Rainbow Trout Feed Mix		Rainbow Trout Control	
	Weight initial (g)	186	± 41	171	± 42	169	± 48	126	± 26	144	± 38	148
Weight end (g)	452	± 103 ^{FK}	357	± 74	392	± 67 ^K	508	± 117 ^F	409	± 109	530	± 118 ^F
Weight gain (g)	278	± 103 ^{FK}	184	± 74	217	± 67 ^K	382	± 117 ^F	265	± 109	381	± 118 ^F
Weight gain (%)	243	± 243	209	± 209	232	± 232	403	± 403	243	± 243	358	± 358
Total length _{end} (cm)	35.5	± 1.14 ^F	35.0	± 2.0	35.3	± 1.8	33.8	± 2.5	32.4	± 2.5	34.9	± 2.2 ^F
FCR	0.78	± 0.21 ^F	0.58	± 0.17	0.66	± 0.14	1.18	± 0.26 ^F	0.88	± 1.03	1.09	± 0.20 ^F
SGR (% day ⁻¹)	1.00	± 99.3	0.83	± 99.2	0.88	± 98.6	1.29	± 94.7	1.18	± 93.8	1.23	± 92.3
Survival rate (%)	1.20	± 1.20	1.20	± 1.20	1.08	± 1.08	1.79	± 1.79	1.89	± 1.89	1.78	± 1.78
k-factor	6.26	± 0.97 ^{FK}	3.42	± 0.81	4.54	± 1.02 ^{KF}	2.70	± 0.86 ^F	1.96	± 0.70	2.29	± 0.58 ^K

Significance levels: *p* < 0.05; ^F compared with feed mix, ^K compared within control and standard; ^{HSI}: hepatosomatic index; ^{IFSI}: intestine fat somatic index; ^{SGR}: specific growth rate.

Table 2. Fresh fillet and fresh liver color of pike-perch (*S. lucioperca*) and rainbow trout (*O. mykiss*) after 16 weeks.

Feeding Trial Parameter	Pike-Perch Standard Industrial		Pike-Perch Feed Mix		Pike-Perch Control		Rainbow Trout Standard Industrial		Rainbow Trout Feed Mix		Rainbow Trout Control	
	Fillet color	42.4	± 2.1 ^F	44.7	± 1.5	43.6	± 1.6	42.9	± 2.0 ^F	41.2	± 1.6	42.9
L	1.32	± 0.45	1.08	± 0.38	1.35	± 0.62	2.03	± 0.96	2.55	± 1.18	1.47	± 1.17 ^F
a	-2.12	± 1.38	-1.58	± 0.87	-2.24	± 1.15	3.01	± 1.13 ^{FK}	6.94	± 1.18	0.63	± 0.73 ^{FK}
b	2.55	± 0.63 ^F	1.53	± 0.31 ^F	1.53	± 0.31 ^F	4.33	± 0.51 ^F	6.64	± 6.64	6.64	± 1.21 ^F
dE _{Feedmix}												
Liver color	47.1	± 5.0 ^F	42.1	± 5.5	44.4	± 5.6	29.8	± 4.0 ^K	28.7	± 3.6	26.4	± 4.5 ^K
L	18.7	± 2.5	18.6	± 3.2	18.7	± 2.6	15.2	± 2.1	15.7	± 2.0	15.4	± 1.8
a	8.58	± 2.60	6.78	± 2.47	7.60	± 2.68	1.71	± 3.34 ^K	1.30	± 3.17	-1.82	± 3.34 ^{FK}
b	7.45	± 2.42	5.81	± 3.81	6.75	± 3.90	4.78	± 2.97 ^K	4.69	± 2.20	6.79	± 3.34 ^{FK}
dE _{week4}	4.95	± 0.91 ^F	2.08	± 0.62 ^F	2.08	± 0.62 ^F	1.24	± 0.43 ^F	3.91	± 3.91	3.91	± 0.91 ^F
dE _{Feedmix}												

L = luminosity; a = redness level; b = yellowness level; dE_{week4} = color difference to feed mix week 16; Significance levels: *p* < 0.05; ^F compared with feed mix fillets, ^K compared within standard and control feed.

Table 3. Nutritional parameters and lipid quality parameters of rainbow trout (*O. mykiss*) [31] and pike-perch (*S. lucioperca*) after 16 weeks of feeding.

Feeding Trial/Parameter [% Biomass]	Pike-Perch Standard Industrial		Pike-Perch Feed Mix		Pike-Perch Control		Rainbow Trout Standard Industrial		Rainbow Trout Feed Mix		Rainbow Trout Control	
Dry Mass	23.9	± 0.6 ^F	23.6	± 0.6	24.4	± 0.6 ^F	27.63	± 0.69	28.01	± 0.69	28.14	± 0.68
Ash	1.2	± 0.03	1.2	± 0.03	1.2	± 0.03	1.3	± 0.1	1.3	± 0.1	1.3	± 0.1
Proteins	21.2	± 0.53 ^F	20.5	± 0.51	20.3	± 0.51 ^F	19.4	± 0.5	19.1	± 0.5	19.4	± 0.5
Fat	1.1	± 0.03	1.1	± 0.03	1.3	± 0.03	8.2	± 0.2 ^F	7.5	± 0.2	7.8	± 0.2 ^F
Selected Fatty Acids[g fatty acid 100 g ⁻¹ biomass]												
C16:0 palmitic acid	0.26	± 0.01	0.32	± 0.01	0.30	± 0.01	1.42	± 0.04	1.46	± 0.04	1.39	± 0.30
C16:1 palmitoleic acid	0.01	± 0.01 ^F	0.07	± 0.01	0.01	± 0.01 ^F	0.04	± 0.01	0.05	± 0.01	0.04	± 0.01
C18:0 stearic acid	0.08	± 0.01	0.08	± 0.01	0.08	± 0.01	0.42	± 0.01	0.43	± 0.4	0.40	± 0.01
C18:1 oleic acid	0.38	± 0.01	0.33	± 0.01	0.41	± 0.01	0.30	± 0.01	0.25	± 0.29	0.29	± 0.01
C18:2 linoleic acid (L/A)	0.10	± 0.01	0.10	± 0.01	0.10	± 0.01	0.78	± 0.01	0.65	± 0.01	0.76	± 0.02
C18:3 γ-linolenic acid	<0.005		<0.005		<0.005		0.01	± 0.01	0.01	± 0.01	0.02	± 0.01
C18:3 α-linolenic acid (ALA)	0.02	± 0.01 ^F	0.01	± 0.01	0.02	± 0.01 ^F	0.14	± 0.01 ^F	0.10	± 0.01	0.15	± 0.01 ^F
C20:4 arachidonic acid	0.01	± 0.01 ^F	<0.005		0.01	± 0.01	0.02	± 0.01	0.02	± 0.01	0.03	± 0.01
C20:5 eicosapentaenoic acid (EPA)	0.03	± 0.01 ^F	0.01	± 0.01	0.03	± 0.01 ^F	0.06	± 0.01	0.04	± 0.01	0.11	± 0.01 ^F
C22:5 docosapentaenoic acid	<0.005		<0.005		<0.005		0.01	± 0.01	0.02	± 0.01	0.03	± 0.01
C22:6 docosahexaenoic acid (DHA)	0.05	± 0.01 ^F	0.03	± 0.01	0.06	± 0.01 ^F	0.11	± 0.01	0.15	± 0.01	0.26	± 0.01 ^F

Significance levels: *p* < 0.05; ^F compared with feed mix fillets, ^K compared within standard and control feed; LOQ = 0.005% biomass.

Schafberg et al. [31] showed that the standard feed had a significantly higher palmitic (2.22 g FA 100 g⁻¹) and palmitoleic acid (0.30 g FA 100 g⁻¹) content than the FM diet (palmitic acid 1.58 g FA 100 g⁻¹, palmitoleic acid 0.03 g FA 100 g⁻¹) and the control feed (palmitic acid 1.88 g FA 100 g⁻¹, palmitoleic acid 0.03 g FA 100 g⁻¹). However, when these fatty acid contents were related to the total lipid content, there were no significant differences between the S (palmitic acid 23.6% fat⁻¹, palmitoleic acid 0.91% fat⁻¹) and FM diets (palmitic acid 29.1% fat⁻¹, palmitoleic acid 6.36% fat⁻¹), whereas Diet C showed a slightly lower content of those acids (palmitic acid 23.1% fat⁻¹, palmitoleic acid 0.77% fat⁻¹). Therefore, the significantly higher content of palmitoleic acid in the fat of the FM fillet must result from the microorganisms' content of the FM feed. So, the reaction between stearyl-CoA desaturase and palmitic acid to form palmitoleic acid seems to be favored by the content of microorganisms in the diet.

The FM fillets had significantly lower DHA, EPA, and arachidonic acid contents than the fillets of the S and C groups, although the FM diet had higher DHA and EPA contents than the S diet [31]. The FM diet seems to influence the fatty acid metabolism of the pike-perch in that the elongation of the fatty acids is reduced. As a freshwater fish, pike-perch tends to metabolize LA and α -linolenic acid (ALA). Thus, at the beginning of the elongation cascade, LA and ALA are competitive substrates for the existing desaturases and elongases in fish in order to form very-long-chain PUFA and to build them into lipids and membranes [60–62].

The significantly lower DHA content in the FM fillets underlined that a longer feeding trial was not necessarily an approach for a better accumulation. Another important point for the low DHA content is that the diets (FM, S, and C) were not optimized or adapted for pike-perch. This study was an attempt to see whether pike-perch would accept this new diet formulation or reject it in general. Similarly, as described by Schafberg et al. (2020), the rainbow trout fillets had higher DHA contents in their fillets than the pike-perch fillets [31]. Both species received the same feeds, so the low DHA content must result from their species-specific metabolism.

The discussion about the FA profile in the context of other pike-perch studies should be done carefully. The 'physiology' and the biosynthesis of specific metabolites such as fatty acids depend above all on the species, and study design (age, size, sex, season, marine or freshwater fish). In addition, geographical location and water temperature for fish are decisive for which FAs are metabolized [58].

3.1.2. Rainbow Trout

The innovative microorganism-based feed mix of the present study was especially optimized for the rainbow trout population, based on previous results [31]. Additionally, Pike-perch was chosen for comparing between a predatory and non-predatory species. It was hypothesized that the non-predatory rainbow trout will cope more easily with that new fish feed mix.

Table 1 shows the growth performance and feed conversion parameters. The fish did not show any significant differences in the initial weight (139 g \pm 33 g), but at the end of the study, FM led to a significantly lower weight (410 g) than the diets of the two other groups. The same trend was shown at the hand of the weight gain, the fillet weight, the total length, the liver weight, k-factor, SGR, as well as the intestinal fat, the IFSI, HSI and the FCR. The fish did not show significant differences depending on the diet. In the present study, only 50% of the fish meal and oil content were substituted. Previous studies showed that plant-based feeds show reduced growth performance (especially low weight gain and high FCR), when large portions of fish meal or oil were replaced [45,63–66]. In the present study, the control diet consisted of ~50% fish meal and oil. For FM, the half of these ingredients was substituted. In the present study, FCR was at the same level for all feeding groups, whereas the weight gain differed significantly. This result was also shown in previous studies [63,64]. The substituted part is therefore a decisive criterion. The aim of the present study was to create a feed that provides a similar growth performance to

commercially available feeds (with traditional portions of fish meal and oil). The SGR of the rainbow trout fed with FM was slightly lower than for fish of Groups C and S, but the difference was not significant.

Fingerlings gain more weight in a shorter time than older individuals, because of their developmental stage of growth. In the present study, older fish were used over a comparatively longer study period and showed, expectedly, a lower weight gain. However, the trend is the same; the ratio of FM to C was 0.73 in the study mentioned before [30], whereas in the present study, the ratio was 0.67 for FM to C and 0.60 for FM to S.

The survival rate was slightly lower compared to the previous study described by Schafberg et al. [13]. The growth performance and feed conversion confirmed that FM was well adapted by rainbow trout, but still bearing a potential in terms of weight gain and final market weight. The added value should be in the focus and sustainable practices should also be a priority, like in other sustainable agricultures.

After 16 weeks, the liver color of the fish of the feeding group C was generally darker than those of S and FM fish (Table 2). There were no differences in redness levels, but the yellowness levels of S and FM livers were higher than those of C livers. The high dE_{feedmix} of C livers resulted in a shift from yellow to blue. The color difference dE_{week4} resulted from various changes: the yellowness level in the S livers increased, while it was decreased in the C and FM livers. The decrease in lightness of the liver color also contributed to the increased dE value of the C livers. From the color of the liver, conclusions can be drawn about the accumulation of fat. The results show that the FM diet resulted in individuals that were as healthy as the individuals of the standard diet group, as the dE_{feedmix} of S-fed livers was relatively low and the dE_{feedmix} was about half compared with fish fed with feed C. This means that the liver of FM fish looks more like the liver of S fish than the liver of C fish.

Schafberg et al. (2020) already showed the results of the nutritional parameters of the fillets (Table 3) and the feeds, accordingly [31]. The dry mass, ash and protein content of the fillets did not show significant differences [31]. There were significant differences in the fat content (FM: 7.5%; C: 7.8%; S: 8.2%) and in the content of some PUFA in the fillets, more precisely ALA, EPA, and DHA (Table 3) [31]. The four predominant fatty acids (in descending order) in the fillets were: palmitic acid, LA, stearic acid, and oleic acid. These fatty acids were also dominant in the feeds, as described above (3.1.1.) [31].

Authors further described the color of the lyophilized fillets [31], whereas the present study focused on the color of fresh fillets. The fillet color of the fresh FM fish (Table 2) was significantly different ($L = 41$) and not as bright as the color of the fresh fish resulting from Diets S ($L = 43$) or C ($L = 43$). However, fresh FM fillets had the highest redness and yellowness level. These differences also explain the high dE values. The same trend was observed in the lyophilized samples [31]. The fresh and lyophilized samples of S and C fillets were slightly brighter than the FM fillets, with the lightness of fresh fillets ($L = 42$) being about half of the lyophilized samples ($L = 72$). The redness level of the fresh C ($a = 1.5$) and S fillets ($a = 2.0$) was significantly lower than in the FM fillets ($a = 2.6$), whereas the lyophilized fillets of C ($a = 1.8$) showed the highest redness level ($FM_{\text{lyo}}: 1.1; S_{\text{lyo}}: 0.2$). Moreover, as expected, the yellowness levels of the lyophilized samples were significantly higher ($b = 20.2$) than in the fresh samples ($b = 3.5$). The differences in the yellowness level can unexpectedly be observed more clearly in the fresh fillets (C: 0.63; FM: 6.94; S: 3.01). As already described for pike-perch, a lower redness level means a color shift towards a green color. The reason for such a “green shift” is the accumulation of chlorophylls from the ingredient *Arthrospira* sp., whereas a higher yellowness level results from increased carotenoid contents [13,20,31]. These results confirm outcomes of previous studies, where fish meal was substituted with *Spirulina platensis*. Teimouri et al. (2016) showed that all fillets that were fed with spirulina had a significantly lower luminosity, higher redness, and higher yellowness levels than the control fillets [20]. Even more, the increasing amounts of spirulina in the feeds correlated with an increasing redness and yellowness level and

the decreasing luminosity [20]. Therefore, the change in the FM fillet colors in the present study can be assigned to the spirulina content in the feed.

3.2. Sensory Evaluation

In order to perceive sensory differences more clearly, three comparison tests were carried out (Figure 1). Here, fillets from two different diets were compared with each other (Test I: FM vs. S; Test II: FM vs. C; Test III: C vs. S). In this study, the standard diet represented a typical, commercially available fish feed, which is used for conventional fish farming. Consequently, consumers are used to accepting the resulting fish fillets with regard to color, odor, taste, and texture. The control feed and the feed mix were based on an almost similar recipe: C consisted of ~50% fish meal and oil, whereas FM contained only half of that. All fish groups were farmed under the same conditions. Consequently, the sensorial changes can only refer to the feeds, but not environmental factors. Feed C differed from FM in the content of fish meal, fish oil, and the further constituents of the microorganism mix. Sensorial differences between the control fillets and the FM fillets can only be due to the microorganism mix. Other important aspects are the strength of the sensory attributes and how they affect potential consumers ('like or dislike'). Therefore, another aspect was that the panelists had to differentiate between more intense and preferred attributes.

3.2.1. Pike-Perch

The three paired comparison tests of pike-perch fillets (Figure 1, Table S1) showed that the FM fillets had differences in the intensities of the odor and the texture, but the preferences were more balanced. The only significant difference was the intense odor of the control fillets compared to the standard fillets (Test III), while there was no preference in the smell. However, panelists made the most comments on the odor (Table 4). The C and FM fillets were also described as 'with a foreign smell' or 'more intense' compared to the S fillets. Lazo et al. (2017) described pike-perch as 'earthy' or 'musty' in flavor. However, this impression was not the dominant attribute by any feeding group of the present study [54].

Fillets of lean fish have less fat and a higher moisture content, also resulting in different textures [67,68]. As described above, the total lipid contents showed no significant variations, but the moisture of FM fillets was significantly higher than for the S and C fillets. Panelists' comments on the texture were balanced and no group was preferred. Even though the colors of the fillets had no significant differences in the compared test, the panelists described the FM fillets as 'darker' than the other groups. Correspondingly, fillets of S and C were described as 'pale'. The color perception of the panelists is in contrast to the measured color values of the fresh fillets, where the FM fillets were the brightest. Moreover, the redness level of the FM fillets was lower, and the yellowness level was slightly higher than in the other groups. This suggests the impression that either the yellowness level had a larger influence on the perception of the panelists or that further processes during preparation led to a serious change in the fillet color. This is very interesting, because the dE value of the fresh filets is low and the panelists' description were not expected.

Lu et al. (2003) also showed that solely feeding spirulina to tilapia did not lead to sensorial differences [69]. Pike-perch and tilapia are both *Percormorphaceae* and seem to get along well with feeding on cyanobacteria regarding the sensory aspects of their fillets. However, it could be that in different countries, perception of fillet color is different. While some countries prefer more colored fillets, some prefer a more natural appearance.

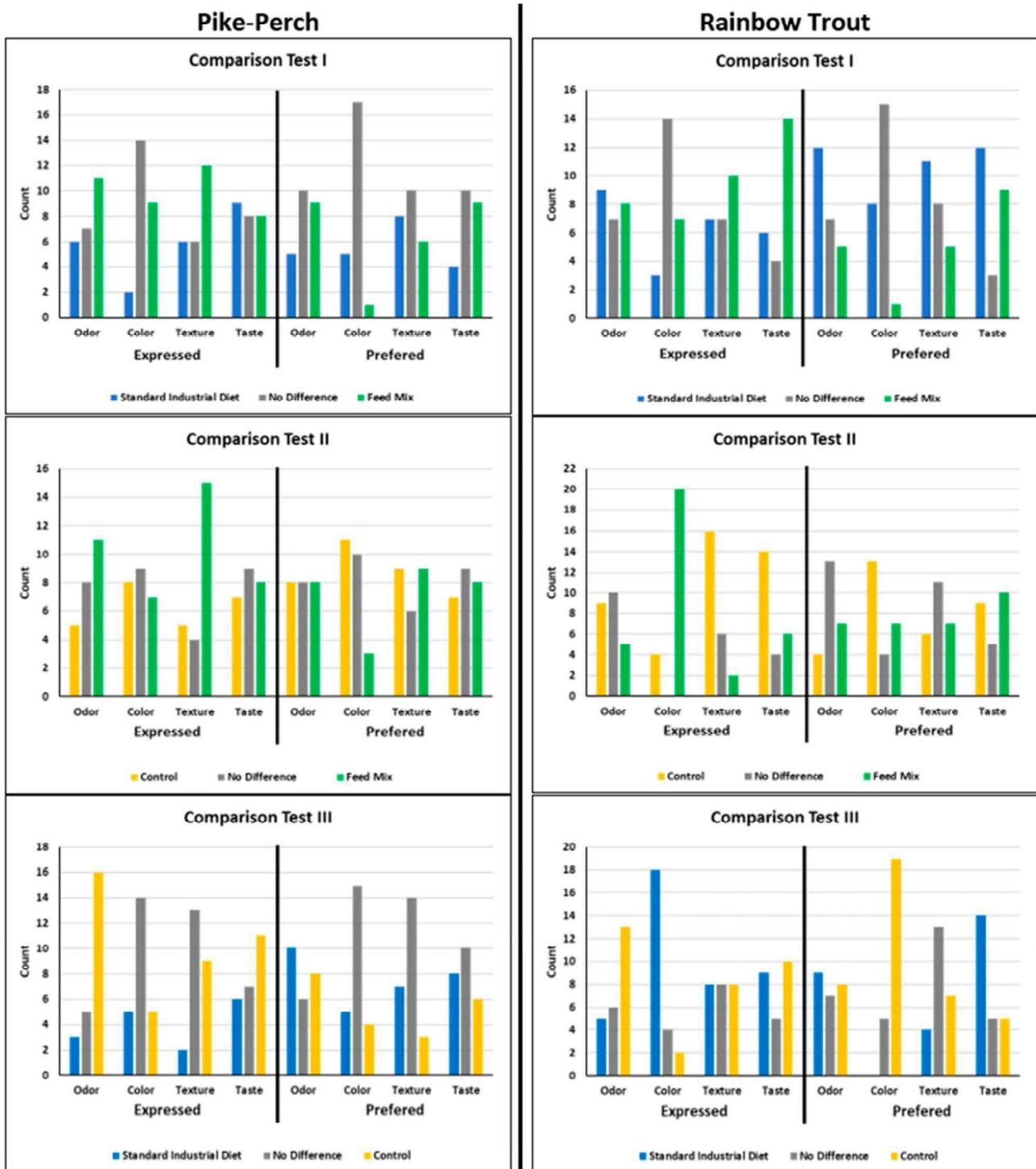


Figure 1. Comparison Test I-III of pike-perch (left) and rainbow trout (right). The left side of each sub-figure (I–III) shows the intensity distribution of the “expressed/distinct” attribute (taste, odor, texture, and color), and on the right side the “preferred” attributes of the sensory test are shown. Comparison Test I: comparison of the standard feed (S; blue) with the feed mix (FM; green), Comparison Test II: FM vs. the control feed (C; yellow), and Comparison Test III: S vs. C. When there was no significant difference between the respective aspects, ‘no difference’ (ND, grey) was noted accordingly.

Table 4. Panelists' commentary/impressions and frequency of occurrence regarding the paired comparison tests of pike-perch. The numbers describe how often the respective attribute is mentioned by the panelists.

Sensory Attribute	Test I				Test II				Test III			
	S		FM	C		FM	S		C			
Odor	foreign smell	3	foreign smell	2	soft	1	foreign smell	2	foreign smell	1	foreign smell	3
	herbal	1										
	intense	1	intense	3			intense	1				
					no aroma	3	no aroma	2				
							pungent	1	pungent	1	pungent	2
					musty	1	musty	1				
					fishy	1	not intense	1			not intense	2
								sweet	1	fishy	1	
Color			darker gray	1 4	darker	1	darker gray	1 5				
	pale	1			pale	6	pale	1	pale	3	pale	3
					dry	1						
				fibrous	1							
Texture	too soft	1			soft	2	too soft	1	too soft	2	too soft	1
	firm	1			firm	1	firm	3	too firm	1	too firm	5
					voluminous	1						
Taste	foreign taste	3	foreign taste	2	foreign taste	1			foreign taste	1	foreign taste	1
	raw potato	4	raw potato	2	raw potato	2	raw potato	1			raw potato	4
	bland	1			bland	3			bland	1	bland	2
	sweet	1			sweet	1			sweet	1		
					musty	1	musty	2			musty	1
									bitter	1	bitter	1
									not in-tense	1	not intense	2
										fishy	2	
										dry	1	

S = Standard Industrial Diet; FM = Feed Mix; C = Control.

3.2.2. Rainbow Trout

The paired comparison tests of rainbow trout fillets (Figure 1, Table S2) showed more significant differences than the sensory evaluation of pike-perch. The frequency of noted comments was almost the same for both species (Table 5). In this comparison (Tests I–III), the attribute 'too dark' was the most noted one. The FM fillets showed significant differences in the intensity of color (Test II, expressed aspects) and were described as 'too dark' or 'yellow to brown'. C fillets had the preferred color (Figure 1, Test II, Table S2), but were also described as 'pale' and 'light' compared to FM fillets and as 'too dark', 'red', 'white', and 'pale' compared to S fillets, whereas the S fillets' descriptions were more inconsistent ('yellow to red', 'pale', and 'brown', Test III). The fresh FM fillets had the highest redness and yellowness levels. In the sensory evaluation, the FM fillets were described as 'darker' than the S and C fillets. These observations match with the previously determined color values. In the sensory evaluation, C fillets were described as 'pale', but a significant majority of the panelists preferred them against the S fillets.

The color values of the fresh C fillets also had lower redness and yellowness levels compared to the S fillets. This trend was also stated by Teimouri et al. (2013), because with increasing spirulina content in the feed, luminosity decreased, and the redness and

yellowness levels increased [20]. Conversely, the control group also had the highest L value and the lowest redness and yellowness values here. The odors of all groups were balanced and did not show any significant differences concerning intensity and preference (Table 5). The most-noted attributes for the C fillets in Test III were from ‘no flavor’ to ‘too intense’ over ‘pungent’ or ‘musty’. There were no preferences for fillet texture. The C fillets showed a more intense texture in Test II but were not recognized in Test III. The FM fillets were described to be ‘too firm’ in Test I, but this trend was not identified in the other tests (Table 5).

Craft et al. (2016) explained that with a higher protein content, and therefore a lower fat content, fish fillets can become ‘too firm’ [65]. The significantly lower fat content of the FM fillets in the present study supports this statement, whereas the lower protein content contradicts this hypothesis. In Test I, FM fillets showed a more intense taste, but the preference in Test I was balanced. In Test II, control fillets had a more intense taste, but also here the preference was balanced. In Test III, the expressed tastes of S and C fillets were balanced, whereas the S fillets were preferred. Both fillet groups were described to have ‘a foreign taste’, but the C fillets were also described as ‘fishy’ and ‘too intense’. Typical off-flavors and odors such as ‘earthy’, ‘musty’, or ‘pungent’, also being noted in the present tests, can be assigned to metabolites that derive from microorganism-supplemented feeds [70,71] or can result from contaminations in the recirculation of the deep water system associated with possible accumulations of off-flavor compounds.

Table 5. Panelist’s commentary/impressions and frequency of occurrence regarding the paired comparison tests of rainbow trout. The numbers describe how often the respective attribute is mentioned by the panelists.

Sensory Attribute	Test I				Test II				Test III			
	S	FM	C	FM	S	C	S	C				
Odor	fishy	pungent	1	pungent	1	pungent	1	pungent	1	pungent	2	
		fishy	3	fishy	1	fishy	1	fishy	1	fishy	1	
		musty	1		musty	1	musty	1	musty	1		
							foreign smell	1	foreign smell	1		
							not aroma	4	not aroma	2		
									not intense	1		
									too intense	1		
	Color		yellow	1		yellow	1	yellow to red	2	red	2	
		too dark	3		too dark	4			too dark	5		
				pale light	1		pale	1	pale white	2		
					1					2		
						brown	1	brown	1			
Texture	too soft	1		too soft	1	too soft	1	too soft	2			
	too firm	2	too firm	4	too firm	1				too firm	1	
				dry	1	dry	1					

Table 5. Cont.

Sensory Attribute	Test I			Test II			Test III			
	S	FM	C	FM	S	C	FM	S	C	
Taste	juicy	1								
	bland	2	bland	5	bland	1				
	musty	1	musty	1					musty	1
	raw potato	1						raw potato	1	
	bitter	2	bitter	2						
	foreign taste	2	foreign taste	1	foreign taste	1	foreign taste	1	foreign taste	2
			fishy	2	fishy	4			fishy	3
			aquaous	1					aquaous	2
									balanced taste	2
									balanced taste	1
									smooth	1
									great taste	1
			not intense	1					not intense	1
		intense taste	1					too intense	2	
		fatty	1							

S = Standard Industrial; FM = Feed Mix; C = Control.

4. Conclusions

The present study showed that the substitution of fish meal and oil with a microorganism mix is not an optimal diet for pike-perch. Even though the present study period was longer than the one performed in a previous study [13], there was still not a well feed adaption of the pike-perch. The use of this new feed mix for pike-perch farming regarding the growth performance is not recommended at the moment. Promisingly, the sensorial differences between the fillets resulting from the standard and the feed mix were not significant. From this view, it can be a starting point to further optimize similar feed mixes for pike-perch farming.

Regarding the rainbow trout population, the present study showed that the growth performance and morphometric parameters of the feed mix groups reached a similar result as the conventionally fed groups. The growth of the FM groups was slightly reduced, but those deficits could be compensated, when the growing period is enlarged until reaching a marketable size. Consumers' attitudes towards growth duration and individual size in fish farming through more sustainable feed should also be generally reconsidered, all being similar aspects to those associated with other sustainably grown livestock. The sensory aspects of the feed mix in rainbow trout farming seem to be positive for the consumer and promising for future studies. The numerous comments regarding the sensory impression should not be interpreted too negatively, as the comparison tests hardly showed any significant differences in preferences of the fillets.

This can be a point for the start of a larger consumer acceptance study.

In general, these observations show that low dE values can have a large effect on the final products. In this context, it is questionable whether traditional customers are willing to pay for a (white) fish with a conspicuous fillet color or whether they can be encouraged to buy those by additional information or advertising. The most important attribute for customers overall is still the taste. In this context, panelists' statement of 'foreign taste' was balanced over all groups, and the panelists had no preference.

Further, it can be stated that in the present study, the partial substitution of fish meal and oil led to fish fillets without significant sensorial differences compared to fillets of fish that were fed with the standard diet. Occurrences of texture variants, color differences, off-flavors, and odors were minimal. Even when there were significant differences in

the intensity of attributes, it did not have a great impact on the preference choice of the panelists.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods10081799/s1>, Table S1. Paired comparison tests of pike-perch. The panelists decided which of the tested group has the more expressed attribute and which attributes of the groups they prefer. If the panelists had the impression there were no difference, the answer ND was given; Table S2. Paired comparison tests of rainbow trout. The panelists decided which of the tested group has the more expressed attribute and which attributes of the groups they prefer. If the panelists had the impression there were no difference, the answer ND was given.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.-B., K.L., and S.R.; methodology, M.S., A.M.-B.; formal analysis, M.S.; investigation, M.S.; data curation, M.S.; writing—original draft preparation, M.S.; writing—review and editing, M.S., S.R., A.M.-B., and K.L.; visualization, M.S.; supervision, S.R.; project administration, S.R., A.M.-B.; funding acquisition, S.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) and the Federal Office for Agriculture and Food (BLE), grant number FKZ 2817303010.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data sets presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: These results are from the project “FENA—fish meal and oil substitutes for a sustainable aquaculture” which as funded by the Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) according to a decision of the German Bundestag.

Conflicts of Interest: All authors declare that there is no conflict of interest and have approved the final manuscript.

References

1. Pauly, D.; Christensen, V.; Dalsgaard, J.; Froese, R.; Torres, F. Fishing down marine food webs. *Sci. New Ser.* **1998**, *179*, 860–863. [[CrossRef](#)]
2. Claret, A.; Guerrero, L.; Aguirre, E.; Rincón, L.; Hernández, M.D.; Martínez, I.; Peleteiro, J.B.; Grau, A.; Rodríguez-Rodríguez, C. Consumer preferences for sea fish using conjoint analysis: Exploratory study of the importance of country of origin, obtaining method, storage conditions and purchasing price. *Food Qual. Prefer.* **2012**, *26*, 259–266. [[CrossRef](#)]
3. IBRD. FISH TO 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture, (Agriculture and Environmental Service Discussion Paper 03, World Bank Report Number 83177-GLB). Washington: International Bank for Reconstruction and Development/International Development Association or The World Bank. 2013. Available online: <http://www.fao.org/docrep/019/i3640e/i3640e.pdf> (accessed on 20 October 2019).
4. Council Directive 98/58/EC of 20 July 1998 Concerning the Protection of Animals Kept for Farming Purposes. *Off. J. L* **1998**, *221*, 23–27.
5. Council Regulation (EC) No 1/2005 of 22 December 2004 on the Protection of Animals during Transport and Related Operations and Amending Directives 64/432/EEC and 93/119/EC and Regulation (EC) No 1255/97. *Off. J. Eur. Union* **2005**, *1*, 1–44.
6. Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the Protection of Animals at the Time of Killing (Text with EEA Relevance). *Off. J. Eur. Union* **2009**, *303*, 1–30.
7. Domingo, J.L.; Bocio, A.; Martín-Cid, R.; Llobet, J.M. Benefits and risks of fish consumption: Part II RIBEPEIX, a computer program to optimize the balance between the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminant. *Toxicology* **2007**, *230*, 227–233. [[CrossRef](#)]
8. WWF. Available online: <https://www.fishforward.eu> (accessed on 6 January 2020).
9. Greenpeace. 2020. Available online: www.greenpeace.de/themen/meere/fischerei/chronik-der-fischerei-kampagne (accessed on 6 January 2020).
10. Smith, K.M.; Sahyoun, N.R. Fish consumption: Recommendations versus advisories, can they be reconciled? *Nutr. Rev.* **2005**, *63*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Hasan, M.R.; Chakrabarti, R. *Use of Algae and Aquatic Macrophytes as Feed in Small-Scale Aquaculture: A Review*; FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No-531; FAO: Rome, Italy, 2009; 123p.

12. Miles, R.D.; Chapman, F.A. *The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets*, Publication FA122; Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida: Gainesville, FL, USA, 2005. Available online: <http://edis.ifas.ufl.edu/FA122> (accessed on 20 October 2019).
13. Schafberg, M.; Loest, K.; Meister, U.; Kurth, E.; Müller-Belecke, A.; Rohn, S. Partial fish meal and oil substitution with a microorganism mix as an innovative diet for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pike-perch (*Sander lucioperca*). *Eur. Food Res. Technol.* **2018**, *244*, 127–143. [[CrossRef](#)]
14. New, M.B.; Wijkström, U.N. *Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds: Further Thoughts on the Fishmeal Trap*, FAO Fisheries Circular No. 975; FAO: Rome, Italy, 2002; 61p.
15. FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018—Meeting the Sustainable Development Goals*; FAO: Rome, Italy, 2018.
16. Gill, I.; Valivety, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities, and applications. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 401–409. [[CrossRef](#)]
17. Certik, M.; Shimizu, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 1–14. [[CrossRef](#)]
18. Luiten, E.E.M.; Akkerman, I.; Koulman, A.; Kamermans, P.; Reith, H.; Barbosa, M.J.; Sipkema, D.; Wijffels, R.H. Realizing the promises of marine biotechnology. *Biomol. Eng.* **2003**, *20*, 429–439. [[CrossRef](#)]
19. Spolaore, P.; Joannis-Cassan, C.; Duran, E.; Isambert, A. Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 87–96. [[CrossRef](#)]
20. Teimouri, M.; Amirkolaie, A.K.; Yeganeh, S. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2013**, *396–399*, 14–19. [[CrossRef](#)]
21. Radhakrishnan, S.; Saravana Bhavan, P.; Seenivasan, C.; Shanthi, R.; Muralisankar, T. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on nonenzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Basic Appl. Zool.* **2014**, *67*, 25–33. [[CrossRef](#)]
22. Leandra, M.; Reyes, E.; Analleli, E.; Velázquez, R.; Héctor, L.; Alfredo, M.; Araiza, M.A. Effect of the Substitution of Fish Oil with a Mixture of Plant-Based Oils in Diets of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) Fingerlings on Growth, Phosphorus and Nitrogen Excretion. *Isr. J. Aquac. Bamidgeh* **2015**, *67*, 1–9. [[CrossRef](#)]
23. Turchini, G.M.; Trushenski, J.T.; Glencross, B.D. Thoughts for the Future of Aquaculture Nutrition: Realigning: Perspectives to Reflect Contemporary Issues Related to Judicious Use of Marine Resources in Aquafeeds. *New Am. J. Aquac.* **2019**, *81*, 13–39. [[CrossRef](#)]
24. Pettersson, A.; Johnsson, L.; Brännäs, E.; Pickova, J. Effects of rapeseed oil replacement in fish feed on lipid composition and self-selection by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac. Nutr.* **2009**, *15*, 577–586. [[CrossRef](#)]
25. Mourente, G.; Good, J.; Bell, J. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. *Aquac. Nutr.* **2005**, *11*, 25–40. [[CrossRef](#)]
26. Sprague, M.; Betancor, M.B.; Tocher, D.R. Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds. *Biotechnol. Lett.* **2017**, *39*, 1599–1609. [[CrossRef](#)]
27. Roy, S.S.; Pal, R. Microalgae in Aquaculture: A Review with Special References to Nutritional Value and Fish Dietetics. *Proc. Zool. Soc.* **2015**, *68*, 1–8. [[CrossRef](#)]
28. Zhu, S.; Portman, M.; Cleveland, B.M.; Magnuson, A.D.; Wu, K.; Sealey, W.; Lei, X.G. Replacing fish oil and astaxanthin by microalgal sources produced different metabolic responses in juvenile rainbow trout fed 2 types of practical diets. *J. Anim. Sci.* **2021**, *99*, skaa403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Øverland, M.; Sørensen, M.; Storebakken, T.; Penn, M.; Krogdahl, Å.; Skrede, A. Pea protein concentrate substituting fish meal or soybean meal in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*)—Effect on growth performance, nutrient digestibility, carcass composition, gut health, and physical feed quality. *Aquaculture* **2009**, *288*, 305–311. [[CrossRef](#)]
30. Barrows, F.T.; Frost, J.B. Evaluation of the nutritional quality of co-products from the nut industry, algae, and an invertebrate meal for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* **2014**, *434*, 315–324. [[CrossRef](#)]
31. Schafberg, M.; Loest, K.; Müller-Belecke, A.; Rohn, S. Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **2020**, *518*, 734633. [[CrossRef](#)]
32. German Federal Statistical Office. GENESIS-Online Database. (2021). Dataset: Aquaculture 41362-0003 Businesses with Aquaculture Production, Quantity Produced: Germany, Years, Types of Fish; for the Year 2019. Available online: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data> (accessed on 16 January 2021).
33. Hillig, F.; Junne, S.; Neubauer, P. *Docosahexaenoic Acid (DHA) Production in the Heterotrophic Marine Microalgae *Cryptocodinium cohnii**; 2011 Lecture; Dechema Bundesalgenstammtisch: Bremen, Germany, 2011.
34. Hillig, F. Impact of Cultivation Conditions and Bioreactor Design on Docosahexaenoic Acid Production by a Heterotrophic Marine Microalga. Ph.D. Thesis, Technische Universität Berlin, Fakultät III—Prozesswissenschaften, Berlin, Germany, 2014.
35. *European Union Special Eurobarometer 475: EU Consumer Habits Regarding Fishery and Aquaculture Products*; Kantar Public: Brussels, Belgium, 2018. [[CrossRef](#)]
36. Verbeke, W.; Sioen, I.; Brunso, K.; Van Camp, J.; De Henauw, S. Consumer perception versus scientific evidence of farmed versus wild fish: Exploratory insights from Belgium. *Aquac. Int.* **2007**, *15*, 121–136. [[CrossRef](#)]

37. Warm, K.; Nelsen, J.; Hyldig, G.; Martens, M. Sensory Quality Criteria for five fish species. *J. Food Qual.* **2000**, *23*, 583–601. [[CrossRef](#)]
38. Stubbe Solgaard, H.; Yang, Y. Consumers perception of farmed fish and willingness to pay for fish welfare. *Br. Food J.* **2012**, *113*, 997–1010. [[CrossRef](#)]
39. Feucht, Y.; Zander, K. What do German consumers expect from sustainable aquaculture? In Proceedings of the 8th International European Forum on System Dynamics and Innovation in Food Networks, Igls, Innsbruck, Kantar Public, Brussels, Belgium, 17–21 February 2014; Volume 2014. [[CrossRef](#)]
40. Busacker, G.P.; Adelman, I.R.; Goolish, E.M. *Methods for Fish Biology*; Schreck, C.B., Moyle, P.B., Eds.; American Fisheries Society: Bethesda, MD, USA, 1990; pp. 363–384.
41. Fulton, T.W. The rate of growth of fishes. *22nd Annu. Rep. Fish. Board Scotl.* **1904**, *3*, 141–241.
42. Guild, J. The colorimetric properties of the spectrum. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. A Contain. Pap. A Math. Or Phys. Character* **1932**, *230*, 149–187.
43. Smith, T.; Guild, J. The C.I.E. colorimetric standards and their use. *Trans. Opt. Soc.* **1931**, *33*, 73–134. [[CrossRef](#)]
44. Wright, W.D. A re-determination of the trichromatic coefficients of the spectral colours. *Trans. Opt. Soc.* **1928**, *30*, 141–164. [[CrossRef](#)]
45. Lund, I.; Dalsgaard, J.; Rasmussen, H.; Holm, J.; Jokumsen, A. Replacement of fish meal with a matrix of organic plant proteins in organic trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed, and the effects on nutrient utilization and fish performance. *Aquaculture* **2011**, *321*, 259–266. [[CrossRef](#)]
46. Gamboa-Delgado, J.; Márquez-Reyes, J.M. Potential of microbial-derived nutrients for aquaculture development. *Rev. Aquac.* **2018**, *10*, 224–246. [[CrossRef](#)]
47. Glencross, B.D.; Huyben, D.; Schrama, J.W. The application of single-cell ingredients in aquaculture feeds—A review. *Fishes* **2020**, *5*, 22. [[CrossRef](#)]
48. Sirakov, I.; Velichkova, K.; Nikolov, G. The effect of algae meal (*Spirulina*) on the growth performance and carcass parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. BioSci. Biotechnol. SE/ONLINE* **2012**, 151–156.
49. Sheikhzadeh, N.; Mousavi, S.; Mardani, K. *Spirulina platensis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed: Effects in growth, fillet composition, and tissue antioxidant mechanism. *Aquac. Int.* **2019**, *27*, 1613–1623. [[CrossRef](#)]
50. Interface Food and Drink 2019, Consumer and Instrumental Analysis of Trout. Available online: www.interface-online.org.uk (accessed on 20 October 2019).
51. Serrano, E.; Simpfendorfer, R.; Medina, A.; Sandoval, C.; Martínez, A.; Morales, R.; Davies, S.J. Partially replacing fish oil with microalgae (*Schizochytrium limacinum* and *Nannochloropsis oceanica*) in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared in saltwater with reference to growth performance, muscle fatty acid composition and liver ultrastructure. *Aquac. Res.* **2021**, 1–13. [[CrossRef](#)]
52. Krogdahl, A.; Hemre, G.-I.; Mommsen, T.P. Carbohydrates in fish nutrition: Digestion and absorption in postlarval stages. *Aquac. Nutr.* **2005**, *11*, 103–122. [[CrossRef](#)]
53. Geurden, I.; Aramendi, M.; Zambonino-Infante, J.; Panserat, S. Early feeding of carnivorous rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a hyperglucidic diet during a short period: Effect on dietary glucose utilization in juveniles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *292*, R2275–R2283. [[CrossRef](#)]
54. Lazo, O.; Guerrero, L.; Alexi, N.; Grigorakis, K.; Claret, A.; Pérez, J.A.; Bou, R. Sensory characterization, physico-chemical properties and somatic yields of five emerging fish species. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 396–406. [[CrossRef](#)]
55. Byrne, C.D.; Targher, G. NAFLD: A multisystem disease. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, S47–S64. [[CrossRef](#)]
56. Asaoka, Y.; Terai, S.; Sakaida, I.; Nishina, H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. *Dis. Models Mech.* **2013**, *6*, 905–914. [[CrossRef](#)]
57. Jankowska, B.; Zakeš, Z.; Żmijewski, T.; Szczepkowski, M. Fatty acid profile and meat utility of wild and cultured zander, *Sander lucioperca* (L.). *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* **2003**, *6*, 2.
58. Çelik, M.; Diler, A.; Küçükgülmez, A. A comparison of the proximate compositions and fatty acid profiles of zander (*Sander lucioperca*) from two different regions and climatic conditions. *Food Chem.* **2005**, *92*, 637–641. [[CrossRef](#)]
59. Nakamura, M.T.; Nara, T.Y. Structure, Function and Dietary Regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ Desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 345–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Lee, J.M.; Lee, H.; Kang, S.B.; Park, W.J. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* **2016**, *8*, 23. [[CrossRef](#)]
61. Tocher, D.R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* **2015**, *449*, 94–107. [[CrossRef](#)]
62. Galindo, A.; Garrido, D.; Monroig, Ó.; Pérez, J.A.; Betancor, M.B.; Acosta, N.G.; Kabeya, N.; Marrero, M.A.; Bolaños, A.; Rodríguez, C. Polyunsaturated fatty acid metabolism in three fish species with different trophic level. *Aquaculture* **2021**, *530*, 735–761. [[CrossRef](#)]
63. Burr, G.S.; Wolters, W.R.; Barrows, F.T.; Hardy, R.W. Replacing fishmeal with blends of alternative proteins on growth performance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), and early or late stage juvenile Atlantic salmon (*Salmo Salar*). *Aquaculture* **2012**, *334*, 110–116. [[CrossRef](#)]

64. Wacyk, J.; Powell, M.; Rodnick, K.; Overturf, K.; Hill, R.A.; Hardy, R. Dietary protein source significantly alters growth performance, plasma variables and hepatic gene expression in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed amino acid balanced diets. *Aquaculture* **2012**, *356*, 223–234. [[CrossRef](#)]
65. Craft, C.D.; Ross, C.; Sealey, W.M.; Gibson Gaylord, T.; Barrows, F.T.; Fornshell, G.; Myrick, C.A. Growth, proximate composition, and sensory characteristics of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* consuming alternative proteins. *Aquaculture* **2016**, *429*, 223–231. [[CrossRef](#)]
66. Hauptman, B.S.; Barrows, F.T.; Block, S.S.; Gibson Gaylord, T.; Paterson, J.A.; Rawles, S.D.; Sealey, W.M. Evaluation of grain distillers dried yeast as a fish meal substitute in practical-type diets of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Aquaculture* **2014**, *432*, 7–14. [[CrossRef](#)]
67. Lie, Ø. Flesh quality—Role of nutrition. *Aquac. Res.* **2001**, *32*, 341–348. [[CrossRef](#)]
68. González, D.; Flick, G.J.; O’Keefe, S.F.; Duncan, S.E.; McLean, E.; Craig, S.R. Composition of farmed and wild yellow perch (*Perca flavescens*). *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 720–726. [[CrossRef](#)]
69. Lu, J.; Takeuchi, T.; Ogawa, H. Flesh quality of tilapia *Oreochromis niloticus* fed solely on raw Spirulina. *Fish. Sci.* **2003**, *69*, 529–534. [[CrossRef](#)]
70. Mahmoud, M.A.A.; Buettner, A. Characterisation of aroma-active and off-odour compounds in German rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Part I: Case of aquaculture water from earthen-ponds farming. *Food Chem.* **2016**, *210*, 623–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Mahmoud, M.A.A.; Buettner, A. Characterisation of aroma-active and off-odour compounds in German rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Part II: Case of fish meat and skin from earthen-ponds farming. *Food Chem.* **2017**, *232*, 841–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Zusammenfassende Diskussion

Die Diskussion erfolgt chronologisch entlang der Herstellungsstufen (Tabelle 4) beginnend mit den Rohstoffen der Futtermittel, über mögliche Futtermittel und ihr Einsatz in einer ersten Teststudie bis zum finalen Futtermittel in einer Pilotstudie und der abschließenden sensorischen Bewertung der Filets.

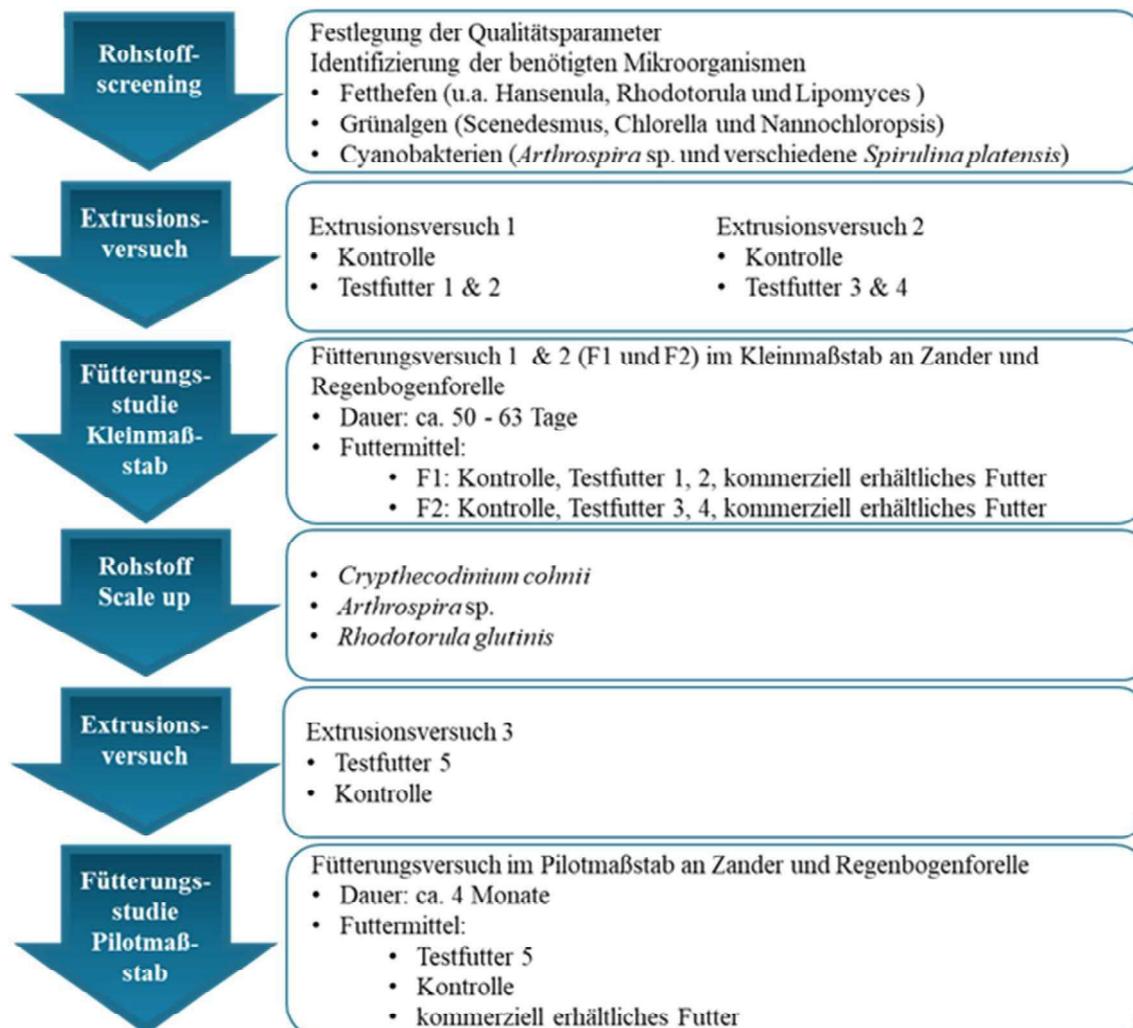


Abbildung 4 Schema des Ablaufs der vorliegenden Studie.

7.1. Nachhaltige Fischfuttermittel: Substitution und Effekte

Die vorliegende Dissertation konzentriert sich auf die Möglichkeit einer partiellen Substitution von Fischmehl und Fischöl in Fischfuttermitteln, um einen maßgeblichen Beitrag zur Förderung der Nachhaltigkeit zu leisten. Wie bereits in Kapitel 3 und 4 ausführlich erörtert, wird eine konsequente Verfolgung einer nachhaltigen Aquakultur in Deutschland angestrebt, um sicherzustellen, dass diese zukünftig als hochwertige und nachwachsende Ressource vollumfassend nutzbar ist.

Für die Entwicklung eines geeigneten Fischfuttermittels mit einem signifikant reduzierten Anteil an Fischmehl und Fischöl wurde das Produkt in sämtlichen Herstellungsstufen umfassend betrachtet und analysiert (Abbildung 4). Zu Beginn erfolgte die Festlegung der Inhaltsstoffe, anhand derer die Qualität beurteilt und Unterschiede über den Herstellungsprozess hinweg bewertet wurden. Die Reduzierung des Fischmehls und/oder Fischöls führt zwangsläufig zu Nährstofflücken, die insbesondere (essenzielle) Aminosäuren bzw. Proteine und Fettsäuren bzw. Fette betreffen.

Die ausschließliche Verwendung einer einzigen Substanz zur Kompensation dieser Nährstofflücke setzt sehr hohe Anforderungen an diese spezifische Zutat. In den letzten zwei bis drei Jahrzehnten wurde mehrfach nachgewiesen (Tabelle 3), dass die ausschließliche Verwendung einer einzelnen Substanz als Ersatz zu veränderten, teils nachteiligen Wachstumsleistungen führt. Daher konzentrieren sich viele Studien darauf, entweder Fischmehl oder Fischöl zu substituieren, um lediglich eine Nährstofflücke auszubalancieren.

Die Substitutionen hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die untersuchten Individuen. So zeigte sich meist ein langsamerer Wachstum gegenüber der Kontrollgruppe, verbunden mit einer höheren Futtermittelnutzung, wenn Fischmehl substituiert wurde. Diese Defizite lassen sich auf die Veränderungen im verfügbaren Aminosäureprofil der Ersatzstoffe und auf antinutritive Substanzen wie Phytate zurückführen.^{70,96,97}

Bei der Substitution von Fischöl liegt der Fokus auf der Analyse des Fettsäureprofils der untersuchten Spezies.^{153,154} So zeigten bereits andere Studien, dass der vollständige Ersatz von Fischöl durch pflanzliche Öle (Raps-, Leinsamen- und Sojaöl) negative Auswirkungen auf die Wachstumsleistung der untersuchten Fische haben kann.¹⁵⁵ Die überwiegenden Studien konzentrieren sich auf den anteiligen Ersatz von Fischmehl und Fischöl. Darüber hinaus gibt es auch Ansätze, vollständig auf Fischmehl und -öl im Futter zu verzichten, die als „*fish-free feeds*“ bezeichnet werden.^{108,156–159}

Um diese potentiellen negativen Auswirkungen zu minimieren, wurde in den hier untersuchten Studien (Kapitel 6) nicht nur eine einzelne Zutat zur Substitution von Fischmehl und Fischöl verwendet, sondern mehrere Zutaten kombiniert, um die Nährstofflücke zu schließen.^{150–152} Der Vorteil bestand darin, dass die Nährstofflücken kontrollierbarer waren und leichter ausgeglichen werden konnten.

7.2. Auswahl der Mikroorganismen

Mikroorganismen lassen sich in verschiedenen Fermentern und Anlagen großtechnisch kultivieren und ihre Zusammensetzung kann durch eine entsprechende Prozessführung kontrolliert werden. Für ihr Wachstum werden zunehmend Nebenströme oder Beiprodukte aus anderen Industrien verwendet, um den Nachhaltigkeitsansatz zu unterstützen und eine kosteneffiziente Kultivierung zu ermöglichen.^{96,97,124,160} Eine Vielzahl von Hefen, Mikroalgen und Cyanobakterien wurden bereits in der Literatur als Protein- und/oder Lipidquelle oder als Quelle von bioaktiven Substanzen bzw. Zutaten beschrieben.¹⁴⁶

Wenige Studien ersetzen Fischmehl und -öl durch eine Kombination von MO.^{54,161} In der vorliegenden Arbeit wird die Reduktion von ca. 50% auf 25% Fischmehl und -öl beschrieben.^{150–152} Das entspricht einer größeren Reduzierung als bei anderen Studien, wie

beispielsweise der Aufzucht von jungen Europäischen Wolfsbarschen. Bei dieser Studie wurde der Anteil an Fischmehl- und -öl von 31% auf etwa 23% bis 18% reduziert.⁵⁴

Die Kultivierung der jeweiligen MO ist entscheidend für die Zusammensetzung des Futters, da diese die Bildung und den Gehalt der Primär- und Sekundärmetabolite beeinflusst. Daher wurden verschiedene Spezies aufgrund ihrer Eigenschaften anhand der verfügbaren Literatur vorab ausgewählt und anschließend im Rahmen eines Rohstoffscreening auf ihre Eignung als potenzielle Quelle von Proteinen oder Lipiden untersucht.

Durch die Literaturrecherche und die Möglichkeit der praktischen Umsetzung wurden *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus sp.*, *Nannochloropsis spp.* und *Arthrospira sp.* am IGV kultiviert. Anschließend wurden Inhaltsstoffanalysen durchgeführt, um die Eignung zu prüfen und um mögliche Prozess- bzw. Biomarker zu identifizieren. Hierbei wurden u.a. Proteingehalte, Fettgehalte, Elementaranalysen, sekundär Metabolite oder die antioxidative Aktivität bestimmt. Darüber hinaus wurden verschiedene Fetthefen u.a. der Gattungen *Rhodotorula*, *Candida*, *Hansenula* und *Lipomyces* am Institut für Angewandte und Molekulare Mikrobiologie der Technischen Universität Berlin kultiviert. Anschließend wurden die Fetthefe auf ihren Fettgehalt und ihre Fettsäureverteilung untersucht. *Cryptocodinium cohnii* wurde aufgrund des hohen DHA-Gehaltes in der Trockenmasse ausgewählt, um so auch den Gehalt im Fisch zu erhöhen. Abschließend fiel die Wahl auf die Entwicklung einer Mischung aus *Cryptocodinium cohnii*, *Arthrospira sp.* und *Rhodotorula glutinis*.¹⁵⁰

7.3. Fütterungsstudie im Kleinmaßstab

Die vorgestellte Fütterungsstudie im Kleinmaßstab (Kapitel 6.1 und Abbildung 4) zeigt, dass sämtliche Futtermittelmischungen sowohl von Regenbogenforellen als auch Zandern angenommen wurden. Darüber hinaus wurde das Mischungsverhältnis der Mikroorganismen identifiziert, welches zu einem Futtermittel führte, das unseren Qualitätsansprüchen insbesondere bezüglich der Wachstumsparameter und antioxidativen Aktivität entsprach.

In der Studie im Kleinmaßstab wurden vier verschiedene Testfuttermischungen im Vergleich zu einem Kontrollfutter und einem konventionellen Standardfutter untersucht. Das Standardfutter ist ein konventionelles, auf dem Markt erhältliches Futter, welches dazu diente, herkömmlich gefütterte Fische zu erzeugen. Das Kontrollfutter wurde nach einem Standardrezept eines Futtermittelherstellers formuliert, welches zu etwa 50% aus einer Mischung aus Fischmehl und Fischöl bestand. Dieses Kontrollfutter wurde als Referenz verwendet, um das Verhalten im Herstellungsprozess, sowie die Akzeptanz und Verwertung der anderen nicht substituierten Zutaten im Futter zu analysieren. Die neu entwickelten Fischfutter hingegen enthielten lediglich etwa 25% Fischmehl und Fischöl, die anderen 25% wurden durch eine von vier Mischung an Mikroorganismenbiomassen (Tabelle 5) ersetzt.

Das Hauptziel dieser Fütterungsstudie im Kleinmaßstab bestand darin, das optimale Mischungsverhältnis des Mikroorganismen-Mixes zu ermitteln, um die bestmögliche Qualität bei den gezüchteten Fischen und den verbraucherrelevanten Fischfilets zu erzielen. Die vier Testfutter unterschieden sich in der Zusammensetzung der Mikroorganismen zueinander. Die Gehalte der MO-biomassen, *Cryptocodinium cohnii*, *Arthrospira sp.* und *Rhodotorula glutinis*, beschreiben in allen Testfuttermitteln etwa ein Viertel des Futters.

In der Studie im Kleinmaßstab zeigten die Untersuchungen, dass das Mischungsverhältnis der verwendeten Zutaten zur Substitution innerhalb des Futters wichtig ist (Tabelle 5). Denn nur eines der getesteten Futter (Testfutter Nr. 3) konnte akzeptable Wachstumsparameter bei beiden untersuchten Fischarten erzielen.¹⁵⁰ In Tabelle 6 werden sowohl die Wachstums- und Leistungsparameter als auch die chemischen Parameter dargestellt, die zur Beurteilung der Fischqualität herangezogen wurden.¹⁵⁰⁻¹⁵² Diese Wachstums- und Leistungsparameter sind etablierte Kennzahlen, die in der Aquakultur zur Qualitätsbeurteilung herangezogen werden und als Standardparameter gelten.

Tabelle 5 Gehalt an Mikroorganismen, Fischmehl und Fischöl in den Testfuttern Nr. 1 bis Nr. 5 und der Kontrolle

Zutat [%]	Kontrolle	Testfutter Nr. 1	Testfutter Nr. 2	Testfutter Nr. 3	Testfutter Nr. 4	Testfutter Nr. 5
Fischmehl	37,5	18,9	18,9	18,9	18,9	19,0
<i>Arthrospira</i> sp.	-	12,9	12,9	19,4	9,7	12,1
<i>R. glutinis</i>	-	6,5	9,7	3,2	9,7	8,0
<i>C. cohnii</i>	-	6,5	3,2	3,2	6,5	5,6
Fischöl	13,6	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8

Die in Betracht gezogenen chemisch-analytischen Parameter wurden gezielt im Hinblick auf die Forschungsfrage ausgewählt. Vorangig wurden dabei typische, produktspezifische Parameter geprüft, die von lebensmittelrechtlicher Relevanz sind (Kapitel 4.4). Besonderes Augenmerk wurde auf den Proteingehalt und den Fettgehalt gelegt, da diese Gehalte aufgrund der Teilsubstitution potenzielle Hinweise auf die bereits erwähnten möglichen Nährstofflücken liefern können. Daher erfolgte eine eingehende Untersuchung des Fettsäureprofils, um auch antioxidativ wirksame ein- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu identifizieren. Neben diesen lipophilen Antioxidantien wurden auch hydrophile Substanzklassen mittels Folin-Ciocalteu-Test (Gesamtphenolgehalt, *englisch: Total phenolic content*; TPC), Trolox Äquivalent Antioxidative Kapazität -Assay (*englisch: Trolox equivalent antioxidant capacity*; TEAC) und Elektronenspinresonanz (Radikalabbau, ESR) untersucht, um die antioxidative Aktivität abzuschätzen.

Die antioxidative Aktivität ist keine klar definierte Größe, die durch nur einen Parameter beschrieben werden kann. Daher wurden hier fünf verschiedene Assays angewendet, um die potentielle antioxidative Wirkung abzuschätzen und zu bewerten. Hierbei wurden bewusst Methoden gewählt, die bestimmte Substanzklassen oder funktionelle Gruppen näher charakterisieren. Fiol et al. (2013) zeigten bereits, dass die Bestimmungen mittels TPC, TEAC und ESR verwendet werden können, um die antioxidative Aktivität in rohem und prozessiertem Kohl zu bewerten.¹⁶² Angesichts der ebenfalls stark pigmentierten Matrices in der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls diese Assays an die Matrices (MO, Fischfutter und Fischfilet) angepasst. Aufgrund der ausgeprägten Farbintensität der MO wurden zusätzlich die Gehalte an Carotinoiden und Chlorophyll untersucht, da diese Substanzklassen ebenfalls antioxidative Eigenschaften haben.

Tabelle 6 Ausschnitt der betrachteten Parameter zur Qualitätsbeurteilung aus Schafberg et al. ^{150–152}

Wachstums- und Leistungsparameter		Chemisch analytische Parameter	
Endgewicht	Leberanteil	Asche	Chlorophyllgehalt
Gewichtszuwachs	Bauchfettanteil	Proteingehalt	Carotinoidgehalt
Längenzuwachs	Leberfarbe	Trockenmasse	Gesamtphenolgehalt (TPC-Assay)
Lebergewicht	Filetfarbe	Fettgehalt	Antioxidative Kapazität (TEAC-Assay)
Spezifischer Wachstumsfaktor	Überlebensrate	(un)gesättigte Fettsäuren	Radikalabbau mittels Elektronenspinresonanz Spektroskopie (ESR)
Futterquotient		Sensorik (Farbe, Geruch, Geschmack, Textur)	

Vorherige Studien untersuchten bereits, dass der Carotinoidgehalt im Blut in Zusammenhang mit dem Gewicht, der spezifischen Wachstumsrate, und dem Futterquotienten stand und mit hohen Konzentrationen im Filet korrelierten.⁹⁴ Die Anreicherung antioxidativer Substanzen war daher ein erwünschter Effekt in der vorliegenden Arbeit (Kapitel 4). Carotinoide und Chlorophylle sind lipophile Substanzen, die im Filet akkumuliert werden können, aufgrund ihrer starken Farbgebung können sie eine Farbveränderungen bewirken. Während der Fütterungsstudie im Kleinmaßstab wurde visuell festgestellt, dass die Anreicherung der Carotinoide und Chlorophylle zu leicht grünstichigen und orangefarbenen Filets führte. Die Farbveränderung zu größeren Rot- und Gelbanteilen in Fischfilets durch die Verwendung von Spirulina im Futter wurde bereits beschrieben.⁹⁵ Aufgrund dieser visuellen Veränderungen und der nicht zufriedenstellenden Wachstums- und Leistungsparameter wurde vor dem Beginn des Pilotversuchs die Rezeptur der Testfutter erneut überarbeitet und ein fünftes Versuchsfutter erstellt.

7.4. Einfluss der Herstellung auf Testfutter Nr. 5

Da die Testfutter Nr. 1 bis Nr. 4 keine zufriedenstellenden Ergebnisse hervorbrachten, wurde das Mischungsverhältnis der MO ein weiteres Mal geändert. Das Testfutter Nr. 5 enthält daher ca. 12% *Arthrospira* sp., 8% *R. glutinis* und ca. 6 % *C. cohnii* (Tabelle 5).

Wie bereits erwähnt, haben die Primär- und Sekundärstoffe der MO und Inhaltstoffe der Zutaten einen maßgeblichen Einfluss auf die Qualität des späteren Filets. Das Testfutter Nr. 5 wurde daher während des Herstellungsprozesses näher untersucht, wobei der Fokus auf Veränderungen in der antioxidativen Aktivität während des Extrusionsprozesses lag. Während der Extrusion wirken verschiedene Kräfte wie Temperaturen im Bereich von 70 – 150 °C und Drücke bis 25 MPa auf die Futtermischung, was zu Veränderungen der funktionellen Eigenschaften der Rohstoffe führt. Aufgrund der verwendeten Zutaten treten u.a. Maillard-Reaktionen ein und es kann zur Oxidation von Lipiden führen. Der Einfluss der Extrusion wurde auch in den Ergebnissen der Tests zur Beurteilung der antioxidativen Aktivität (Carotinoidgehalt, Chlorophyllgehalt, Gesamtphenolgehalt und Radikalabbau) sichtbar, denn diese nahm im Testfutter Nr. 5 über den fortschreitenden Prozess ab. Darüber hinaus war die antioxidative Aktivität des Testfutter Nr. 5 größer als die des Kontrollfutters.

Neben Carotinoiden und Chlorophyllen wurde vermutet, dass die antioxidative Aktivität auch auf mögliche Polyphenole aus den MO zurückzuführen sein könnten. Da die Kultivierung der MO nicht auf die vermehrte Produktion von Polyphenolen abzielte, wurde angenommen, dass deren Gehalt gering war. Durch interne Vorversuche wurden verschiedene Polyphenole aus Mikroalgen nach der Extraktion und Anreicherung mittels LC-MSMS im MRM-Modus nachgewiesen.¹⁶³ Die Gehalte waren sehr gering, jedoch wurde aufgrund der Extrusion des Futters eine erhebliche Reduktion der vorhandenen Polyphenole erwartet, welche bereits in verschiedenen Studien gezeigt wurde.¹⁶⁴ Aufgrund der beobachteten Reduktion in den antioxidativen Assays wurde daher auf eine weitere Betrachtung ausgewählter Polyphenole im Futter und im Fischfilet verzichtet.

7.5. Fütterungsstudie im Pilotmaßstab

Die Fütterungsstudie im Pilotmaßstab zeigte erfolgreich, dass das finale Testfutter Nr. 5 bei Regenbogenforellen eine vergleichbare Qualität erreicht wie bei der Fütterung eines konventionellen Fischfuttermittels. Darüber hinaus verdeutlichte diese Studie, dass das Futtermittel weiter angepasst werden muss, um es erfolgreich in der Zanderhaltung nutzen zu können.

Die Fütterungsstudie im Pilotmaßstab zeichnete sich durch den verlängerten Beobachtungszeitraum (Pilotmaßstab: 4 Monate, Kleinmaßstab: 60 Tage) sowie die erhöhte Anzahl untersuchter Individuen aus (Pilotmaßstab: 64 – 70 Individuen pro Futter und Becken, Kleinmaßstab 13 Individuen pro Futter und Becken). Die vorliegende Pilotstudie zeigte, dass die Wachstumsleistung der Gruppe, die Testfutter Nr. 5 erhielten, zu vergleichbaren Eigenschaften bei Regenbogenforellen führte wie bei denen, die das Standard- oder Kontrollfutter erhielten. Ebenso zeigten die Wasser-, Asche- und Proteingehalte in allen Fischen keine signifikanten Unterschiede. Der Fettgehalt der Fischfilets wies geringfügige Unterschiede auf (1 – 2%), wobei die Fettsäurezusammensetzung variierte. Dies war auf das spezifische Fettsäureprofil des jeweiligen Futters zurückzuführen, wobei insbesondere die hohen Gehalte an Linolsäure und die PUFA in den Filets der mit Testfutter Nr. 5 gefütterten Fische auf den Gehalt der MO im Futter zurückzuführen sind.^{165–167}

Durch den längeren Untersuchungszeitraum zeigten sich in dieser Studie erneut Verfärbungen im Filet aufgrund der Akkumulation von Carotinoiden, die jedoch nicht so prägnant hervorstachen wie in der vorhergegangenen Kleinstudie.¹⁵⁰ Einer Akkumulation von Chlorophyllen, die zu einer grünen Färbung der Filets führt, wurde durch die Reformulierung des Futters entgegengewirkt. Somit war ein weiterer Aspekt der Weiterentwicklung des Testfutters Nr. 5, insbesondere in Bezug auf Regenbogenforellen, erfolgreich. Neben den beschriebenen Pigmenten wurden ebenfalls wieder der TPC, der TEAC und der ESR-Assay durchgeführt. Hier wurden keine signifikanten Veränderungen der antioxidativen Aktivität in den Filets betrachtet. Der TEAC- und der TPC-Assay zeigten keine Korrelation in Bezug auf die eingesetzte Mikroorganismen-Mischung, während die TEAC- und die ESR-Ergebnisse den gleichen aufsteigenden Trend über die Zeit zeigten. Einen ähnlichen Trend haben bereits andere Publikation beschrieben.^{150,168} Die Erhöhung der antioxidativen Aktivität im Filet resultierte daher ausschließlich durch die Akkumulation der Pigmente.

Die Studie im Pilotmaßstab, die auf Zander ausgerichtet war, erzielte nicht den gleichen Erfolg wie die Pilotstudie der Regenbogenforellen.¹³⁶ Die mit Testfutter Nr. 5 gefütterten Zander

wiesen signifikant geringere Endgewichte auf, was wiederum zu erheblichen Unterschieden im Gewichtszuwachs im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen (Kontroll- und Standardfutter) führte.^{135,136} Die Wachstumsleistung und Futtermittelverwertung der mit Testfutter Nr.5 gefütterten Zander waren nicht zufriedenstellend, was auf die unterschiedliche Verdauung von Karnivoren (hier: Zander) und Omnivoren (hier: Regenbogenforelle) zurückzuführen sein könnte.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Diese Studie hatte das Ziel herauszufinden, ob Zander die Mikroorganismen-Mischung, Testfutter Nr. 5, akzeptieren oder grundsätzlich ablehnen. Als Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass das Futter weiteren Optimierungen unterliegen muss, um als vollwertiges Zanderfutter genutzt werden zu können.

7.6. Sensorische Betrachtung der Fischfilets

Die Pilotstudie befasste sich zudem mit den sensorischen Eigenschaften von Regenbogenforellen und Zander.¹⁵² Hier wird gezeigt, dass es durch das neue Futter zu Abweichungen im Aussehen der Filets kommen kann, diese bei den Fischarten jedoch anders wahrgenommen werden.

Im Rahmen eines paarweisen Vergleichstests wurden von den Prüfenden die Attribute *Farbe*, *Geruch*, *Geschmack* und *Textur* in Bezug auf *Ausprägung* und *Präferenz* bewertet. Die Prüfenden wurden ermutigt, zusätzliche Anmerkungen zu machen, falls sie weitere Eigenschaften bemerkten. Die Zanderfilets wurden überwiegend als ausgewogen, ohne signifikante sensorische Unterschiede bewertet, obwohl die Wachstumsleistung nicht optimal war. Bei den Regenbogenforellenfilets wurden mehr Unterschiede als bei den Zanderfilets festgestellt. Beispielsweise wurde das Filet der Fische, die mit Testfutter Nr. 5 gefüttert wurden, als *zu dunkel* beschrieben, während die Filets der Kontroll- und Standardgruppen als *blass* oder *hell* bezeichnet wurden. Dennoch wurden keine Filets einer Gruppe deutlich bevorzugt.

Bei den Filets beider Spezies waren die Unterschiede in Bezug auf *Farbe*, *Geschmack*, *Geruch* und *Textur* minimal. Selbst bei signifikanten Unterschieden in der Intensität dieser Attribute hatte dies keinen wesentlichen Einfluss auf die Präferenzwahl der Prüfenden. Hier stellt sich die Frage, ob der Verbraucher gewillt ist bzw. durch entsprechende Kampagnen überzeugt werden kann, dass das Aussehen der Filets der Fische, die mit Testfutter Nr. 5 gefüttert werden, das ansprechendere Filet in der Zukunft sind. Ein ähnlicher Gewöhnungseffekt wurde in den 1980er bzw. 1990er Jahren bei Lachsforellen erreicht, als begonnen wurde Forellen mit carotinoidhaltigem Futter zu füttern.¹

8. Ausblick

Der Aquakultursektor wird voraussichtlich in den kommenden Jahrzehnten weiter expandieren.³ In diesem Zusammenhang wird auch der Anteil an nachhaltiger Aquakultur zunehmen. Es sollte daher im allgemeinen Interesse der Futtermittel- und Lebensmittelwirtschaft liegen, den Bedarf an nachhaltigem Futter zu decken. Darüber hinaus müssen die Konzepte für die Aquakultur und Fischerei neu überdacht werden. Island gelang es ein Null-Abfall-Konzept umzusetzen, indem nicht nur die Fische, sondern sämtliche Nebenströme und Abfälle der Fischindustrie zu 100% verwertet werden.

Die vorliegenden Fütterungsstudien dieser Arbeit bieten Einblicke in das erhebliche Potential der ausgewählten Rohstoffe. Sie legen nahe, dass weitere Studien im größeren Maßstab erforderlich sind, um die Eignung eines Futters, das Fetthefen, Mikroalgen und Cyanobakterien enthält, für den Einsatz in konventionellen Aquakulturbetrieben zu validieren. Diese Experimente sollten dazu dienen, eine gleichbleibende Qualität in den Fischpopulationen sicherzustellen und potentiell negative Auswirkungen zu identifizieren. Bei der Bewertung des Wachstums sollte die Vergleichsgruppe nicht nur konventionelle Haltungsarten, sondern auch ökologische Aquakulturen beinhalten.

In Anbetracht der steigenden Bedeutung des Tierwohls sollte untersucht werden, ob das hier entwickelte Futter aufgrund seines Gehalts an Antioxidantien zur Stressreduktion bei den Fischen beitragen kann. Es ist ebenfalls ratsam, die Wachstumsleistung und Schlachtparameter anderer Fischarten zu untersuchen. Insbesondere sollten Karpfen wegen ihrer hohen Produktionszahlen in Deutschland in Betracht gezogen werden. Es sollten Fütterungsstudien auch bei Kleinproduzenten (der Teichwirtschaft) angedacht werden. Auf diesem Wege kann überprüft werden, ob der Umgang und die Handhabe mit dem neuen Futter in der Praxis umsetzbar sind.

Die Ausweitung der sensorischen Beurteilungen auf ein größeres Panel kann weitere Erkenntnisse zur Verbraucherakzeptanz aufdecken. So könnten Beliebtheitstests bei Verbrauchergruppen in Betracht gezogen werden, um die Markteinführung der Produkte zu planen. Die Akzeptanz eines Produktes auf dem Markt ist entscheidend für dessen Erfolg.

In Bezug auf das Futtermittel sollte die Analytik erweitert und Lagerungsversuche in den Prüfungsumfang inkludiert werden. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, im weiteren Verlauf neue Prozessmarker während des Extrusionsprozesses sowie der Lagerung zu identifizieren und zu validieren.

9. Literatur

Die Literaturquellen, die in den Veröffentlichungen genannt werden, sind den Referenzlisten im jeweiligen Abschnitt der dazugehörigen Publikation zu entnehmen. Die Quellen der Einleitung, des Grundlagenteils und der Diskussion werden im folgenden Literaturverzeichnis aufgeführt.

1. Baltes, W.; Matissek, R. Lebensmittelchemie; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, **2011**.
2. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. Lehrbuch der Lebensmittelchemie; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, **2008**. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-73202-0>.
3. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022; FAO, **2022**. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>.
4. Lala-Pritchard, T.; Johnstone, G. 2030 Research and Innovation Strategy: Aquatic Foods for Healthy People and Planet. Penang, Malaysia: WorldFish. Strategy: 2020-38. **2020**.
5. Weltbevölkerungsuhr. <https://countrymeters.info/de/World> (Zugriff am 04.06.2024).
6. Bevölkerungszahl und ihr Wachstum, Welt (1950-2020). Bundesinstitut für Bevölkerungsforschung. <https://www.bib.bund.de/DE/Fakten/Fakt/W03-Bevoelkerungszahl-Wachstum-Welt-ab-1950.html> (Zugriff am 01.10.2022).
7. Gullestad, P.; Aglen, A.; Bjordal, Å.; Blom, G.; Johansen, S.; Krog, J.; Misund, O. A.; Røttingen, I. Changing Attitudes 1970–2012: Evolution of the Norwegian Management Framework to Prevent Overfishing and to Secure Long-Term Sustainability. *ICES Journal of Marine Science* **2014**, 71 (2), 173–182. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fst094>.
8. Ferguson-Cradler, G. Fisheries' Collapse and the Making of a Global Event, 1950s–1970s. *Journal of Global History* **2018**, 13 (3), 399–424. <https://doi.org/10.1017/S1740022818000219>.
9. Jackson, J. B. C.; Kirby, M. X.; Berger, W. H.; Bjorndal, K. A.; Botsford, L. W.; Bourque, B. J.; Bradbury, R. H.; Cooke, R.; Erlandson, J.; Estes, J. A.; Hughes, T. P.; Kidwell, S.; Lange, C. B.; Lenihan, H. S.; Pandolfi, J. M.; Peterson, C. H.; Steneck, R. S.; Tegner, M. J.; Warner, R. R. Historical Overfishing and the Recent Collapse of Coastal Ecosystems. *Science* **2001**, 293 (5530), 629–637. <https://doi.org/10.1126/science.1059199>.
10. 90 Prozent der Fischbestände in den Meeren übernutzt? – Fischbestände Online: Thünen-Institut für Ostseefischerei <https://www.fischbestaende-online.de/fakten/90-prozent-der-fischbestaende-in-den-meeren-uebernutzt-der-zustand-der-weltweiten-meeresfischbestaende> (Zugriff 01.10.2022).
11. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO Annuaire. Statistiques Des Pêches et de l'aquaculture 2019/FAO Anuario. Estadísticas de Pesca y Acuicultura 2019; FAO, **2021**. <https://doi.org/10.4060/cb7874t>.
12. Definition Aquaculture. FAO <https://www.fao.org/3/x6941e/x6941e04.htm> (Zugriff 29.09.2022).
13. Was ist Aquakultur? | Aquakulturinfo. <https://www.aquakulturinfo.de/was-ist-aquakultur> (Zugriff 29.09.2022).
14. Verordnung (EU) Nr. 1380/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2013 über die Gemeinsame Fischereipolitik und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1954/2003 und (EG) Nr. 1224/2009 des Rates sowie zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 2371/2002 und (EG) Nr. 639/2004 des Rates und des Beschlusses 2004/585/EG des Rates; 2013; Vol. 354. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 01.01.2023 <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/1380/oj/deu>
15. Verordnung (EU) 2018/848 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. Mai 2018 über die ökologische/biologische Produktion und die Kennzeichnung von

- ökologischen/biologischen Erzeugnissen sowie zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 834/2007 des Rates; 2018; Vol. 150. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 21.02.2023 <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/848/oj/deu>
16. Durchführungsverordnung (EU) 2020/464 der Kommission vom 26. März 2020 mit Durchführungsbestimmungen zur Verordnung (EU) 2018/848 des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich der für die rückwirkende Anerkennung von Umstellungszeiträumen erforderlichen Dokumente, der Herstellung ökologischer/biologischer Erzeugnisse und der von den Mitgliedstaaten bereitzustellenden Informationen (Text von Bedeutung für den EWR); 2020; Vol. 98. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 25.11.2021 http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2020/464/oj/deu
 17. European Commission. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries. The EU Fish Market: 2021 Edition.; Publications Office: LU, **2021**.
 18. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020; FAO, **2020**. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.
 19. Schäperclaus, W.; von Lukowicz, M. (Hrsg.). Lehrbuch Der Teichwirtschaft, 5.; Eugen Ulmer: Stuttgart, **2018**.
 20. Statistisches Bundesamt Deutschland - GENESIS-Online. <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online?operation=statistic&levelindex=0&levelid=1695505797664&code=41362#abreadcrumb> (Zugriff 29.09.2022).
 21. Brämick, D. U.; Schiewe, S. Jahresbericht zur Deutschen Binnenfischerei und Binnenaquakultur 2020. Institut für Binnenfischerei, Potsdam-Sacrow, **2021**.
 22. Kestemont, P.; Dabrowski, K.; Robert C., S. Biology and Culture of Percid Fishes - Principles and Practices, 1st ed.; Springer: Dordrecht, **2015**.
 23. Zienert, S. & Heidrich, S. Aufzucht von Zandern in der Aquakultur. Schriften des Instituts für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow, Bd. 18. Hrsg.: Institut für Binnenfischerei e.V. Potsdam-Sacrow. **2005**, 60 S. ISSN 1438-4876
 24. Fisch-Informationszentrum (FIZ) e.V., Lexikon Fisch und Meeresfrüchte <https://www.fischinfo.de/index.php/lexikon> (Zugriff am 03.06.2023).
 25. Zander - Lebensmittel-Warenkunde. <https://lebensmittel-warenkunde.de/lebensmittel/fisch/suesswasserfische/zander.html> (Zugriff am 03.06.2023).
 26. Bischoff, A. A.; Kubitz, M.; Wranik, C. M.; Pfefferkorn, H.; Augustin, C. B.; Hagen, W.; Palm, H. W. Fatty Acid Utilization of Pikeperch (*Sander Lucioperca* (Linnaeus, 1758)) Larvae under Starvation Conditions during Early Development. *Bulletin of Fish Biology* **2017**, 17 (1) 59-73
 27. Dalsgaard, J.; Lund, I.; Thorarinsdottir, R.; Drengstig, A.; Arvonen, K.; Pedersen, P. B. Farming Different Species in RAS in Nordic Countries: Current Status and Future Perspectives. *Aquacultural Engineering* **2013**, 53, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2012.11.008>.
 28. Policar, T.; Schaefer, F. J.; Panana, E.; Meyer, S.; Teerlinck, S.; Toner, D.; Żarski, D. Recent Progress in European Percid Fish Culture Production Technology—Tackling Bottlenecks. *Aquacult Int* **2019**, 27 (5), 1151–1174. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00433-y>.
 29. Froese, R.; Pauly, D. (Edi) FishBase – *Oncorhynchus mykiss*, Rainbow trout: fisheries, aquaculture, gamefish. <https://fishbase.net.br/summary/Oncorhynchus-mykiss.html> (Zugriff am 21.06.2022).
 30. Bühler, B.; Hollmann, F.; Junker, B.; Junne, S.; Kuepfer, L.; Mao, L.; Marienhagen, J.; Muffler, K.; Noack, S.; Olbrich, C.; Rihko-Struckmann, L.; Schallmeyer, A.; Schmid, J.; Stafforst, T.; Steingroewer, J.; Zurbriggen, M. Dechema Diskussionspapier “*Biotechnologie - Der Schlüssel Zur Bioökonomie*”; **2014**

31. Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über Lebensmittelhygiene; 2004; Vol. 139. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 24.03.2021 <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/852/oj/deu>
32. Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 mit spezifischen Hygienevorschriften für Lebensmittel tierischen Ursprungs; 2004; Vol. 139. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 15.02.2023 <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj/deu>
33. Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel, zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 999/2001, (EG) Nr. 396/2005, (EG) Nr. 1069/2009, (EG) Nr. 1107/2009, (EU) Nr. 1151/2012, (EU) Nr. 652/2014, (EU) 2016/429 und (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 1/2005 und (EG) Nr. 1099/2009 des Rates sowie der Richtlinien 98/58/EG, 1999/74/EG, 2007/43/EG, 2008/119/EG und 2008/120/EG des Rates und zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EEG, 96/23/EG, 96/93/EG und 97/78/EG des Rates und des Beschlusses 92/438/EWG des Rates (Verordnung über amtliche Kontrollen)Text von Bedeutung für den EWR.; 2017; Vol. 095. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 28.01.2022 <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/625/oj/deu>
34. Verordnung (EU) Nr. 1379/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2013 über die gemeinsame Marktorganisation für Erzeugnisse der Fischerei und der Aquakultur, zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1184/2006 und (EG) Nr. 1224/2009 des Rates und zur Aufhebung der Verordnung (EG) Nr. 104/2000 des Rates; 2013; Vol. 354. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 28.01.2022 <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/1379/oj/deu>
35. Durchführungsverordnung (EU) Nr. 1420/2013 der Kommission vom 17. Dezember 2013 zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 347/96, (EG) Nr. 1924/2000, (EG) Nr. 1925/2000, (EG) Nr. 2508/2000, (EG) Nr. 2509/2000, (EG) Nr. 2813/2000, (EG) Nr. 2814/2000, (EG) Nr. 150/2001, (EG) Nr. 939/2001, (EG) Nr. 1813/2001, (EG) Nr. 2065/2001, (EG) Nr. 2183/2001, (EG) Nr. 2318/2001, (EG) Nr. 2493/2001, (EG) Nr. 2306/2002, (EG) Nr. 802/2006, (EG) Nr. 2003/2006, (EG) Nr. 696/2008 und (EG) Nr. 248/2009 infolge der Annahme der Verordnung (EU) Nr. 1379/2013 des Europäischen Parlaments und des Rates über die gemeinsame Marktorganisation für Erzeugnisse der Fischerei und der Aquakultur; 2013; Vol. 353. vom 28.12.2013 http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2013/1420/oj/deu
36. Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel (Text von Bedeutung für den EWR); 2005; Vol. 338. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 08.03.2020 <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/deu>
37. Verordnung (EG) Nr. 2074/2005 der Kommission vom 5. Dezember 2005 zur Festlegung von Durchführungsvorschriften für bestimmte unter die Verordnung (EG) Nr. 853/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates fallende Erzeugnisse und für die in den Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vorgesehenen amtlichen Kontrollen, zur Abweichung von der Verordnung (EG) Nr. 852/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 853/2004 und (EG) Nr. 854/2004 (Text von Bedeutung für den EWR); 2005; Vol. 338. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 14.12.2019 <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2074/oj/deu>

38. Fischetikettierungsgesetz - Gesetz zur Durchführung der Rechtsakte der Europäischen Gemeinschaft über die Etikettierung von Fischen und Fischereierzeugnissen. Zuletzt geändert am 20.10.2015 <https://www.gesetze-im-internet.de/fischetikettg/BJNR298000002.html>
39. Tierische Lebensmittel-Hygieneverordnung - Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von bestimmten Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Zuletzt geändert am 11.01.2021 <https://www.gesetze-im-internet.de/tier-lmhv/BJNR182800007.html>
40. Durchführungsverordnung (EU) Nr. 404/2011 der Kommission vom 8. April 2011 mit Durchführungsbestimmungen zu der Verordnung (EG) Nr. 1224/2009 des Rates zur Einführung einer gemeinschaftlichen Kontrollregelung zur Sicherstellung der Einhaltung der Vorschriften der gemeinsamen Fischereipolitik. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 14.07.2020 http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2011/404/oj
41. Seefischereiverordnung (SeefiV). Zuletzt geändert am 01.04.2019 <https://www.gesetze-im-internet.de/seefiv/BJNR014850989.html>
42. Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 25. Oktober 2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel und zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 1924/2006 und (EG) Nr. 1925/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinie 87/250/EWG der Kommission, der Richtlinie 90/496/EWG des Rates, der Richtlinie 1999/10/EG der Kommission, der Richtlinie 2000/13/EG des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 2002/67/EG und 2008/5/EG der Kommission und der Verordnung (EG) Nr. 608/2004 der Kommission Text von Bedeutung für den EWR; 2011; Vol. 304. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 01.01.2018 <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj/deu>
43. Verordnung (EG) Nr. 178/2002 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 28. Januar 2002 zur Festlegung der allgemeinen Grundsätze und Anforderungen des Lebensmittelrechts, zur Errichtung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit und zur Festlegung von Verfahren zur Lebensmittelsicherheit; 2002; Vol. 031. Aktuelle konsolidierte Fassung vom 01.07.2022 <http://data.europa.eu/eli/reg/2002/178/oj/deu>
44. Fischetikettierungsverordnung (FischEtikettV). Verordnung zur Durchführung des Fischetikettierungsgesetzes. Zuletzt geändert am 05.11.2015 <https://www.gesetze-im-internet.de/fischetikettv/FischEtikettV.pdf>
45. Leitsätze für Fisch und Fischerzeugnisse vom 14. Januar 2021 (BAnz AT 22.03.2021 B1, GMBI 2021 S. 502), geändert am 4. Mai 2022 (BAnz AT 1.6.2022, GmbI 2022 S. 506 - 507) https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/DE/_Ernaehrung/Lebensmittel-Kennzeichnung/LeitsaetzeFische.pdf?__blob=publicationFile&v=4
46. Lebensmittel-, Bedarfsgegenstände- und Futtermittelgesetzbuch (LFGB). "Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch in der Fassung der Bekanntmachung vom 15. September 2021 (BGBl. I S. 4253; 2022 I S. 28), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 6 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist. <https://www.gesetze-im-internet.de/lfgb/LFGB.pdf>
47. Verordnung über Anforderungen an die Hygiene beim Herstellen, Behandeln und Inverkehrbringen von Lebensmitteln (LMHV) Lebensmittelhygiene-Verordnung in der Fassung der Bekanntmachung vom 21. Juni 2016 (BGBl. I S. 1469), die zuletzt durch Artikel 3 der Verordnung vom 20. Juni 2023 (BGBl. 2023 I Nr. 159) geändert worden ist. https://www.gesetze-im-internet.de/lmhv_2007/LMHV.pdf
48. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB, § 35 Vorläufiges Tabakgesetz, § 28b GenTG; Beuth: Berlin.
49. Geschichte der Aquakultur | alimentarium. <https://www.alimentarium.org/de/factsheet/geschichte-der-aquakultur> (Zugriff am 23.08.2022).

50. Produkte und Fischarten | BioMar. <https://www.biomar.com/de/germany/produkte-und-fischarten/> (Zugriff am 24.08.2022).
51. Aller Aqua: Hochqualitätsfutter für die Forelle Aquakultur weltweit. <https://www.aller-aqua.com/de/fischarten/kaltwassersuesswasserfischarten/regenbogenforelle> (Zugriff am 24.08.2022)
52. Aller Aqua: Hochqualitätsfutter für die Europäischer Wels Aquakultur weltweit Zander Ocean Ivory Ex Mastfutter <https://www.aller-aqua.com/de/fischarten/warmwassersuesswasserfischarten/zander> (Zugriff am 24.08.2022)
53. Glencross, B. D.; Huyben, D.; Schrama, J. W. The Application of Single-Cell Ingredients in Aquaculture Feeds—A Review. *Fishes* **2020**, *5* (3), 22. <https://doi.org/10.3390/fishes5030022>
54. Vasilaki, A.; Mente, E.; Fountoulaki, E.; Henry, M.; Nikoloudaki, C.; Berillis, P.; Kousoulaki, K.; Nengas, I. Fishmeal, Plant Protein, and Fish Oil Substitution with Single-Cell Ingredients in Organic Feeds for European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*). *Front. Physiol.* **2023**, *14*, 1199497. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1199497>.
55. Kumar, V.; Sinha, A. K.; Makkar, H. P. S.; De Boeck, G.; Becker, K. Phytate and Phytase in Fish Nutrition. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **2012**, *96* (3), 335–364. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2011.01169.x>
56. IBRD. FISH TO 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture, (Agriculture and Environmental Service Discussion Paper 03, World Bank Report Number 83177-GLB). Washington: International Bank for Reconstruction and Development/International Development Association or The World Bank. 2013. <http://www.fao.org/docrep/019/i3640e/i3640e.pdf> (Zugriff am 20.10.2019)
57. Miles, R. D.; Chapman, F. A. The Benefits of Fish Meal in Aquaculture Diets. Publication FA122, Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. **2005**. <http://edis.ifas.ufl.edu/FA122>. (Zugriff 30.06.2016)
58. Gouveia, L.; Rema, P. Effect of Microalgal Biomass Concentration and Temperature on Ornamental Goldfish (*Carassius Auratus*) Skin Pigmentation. *Aquaculture Nutrition* **2005**, *11* (1), 19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00319.x>.
59. Nutztierhaltung - Ökologische Aquakultur. <https://www.nutztierhaltung.de/aquakultur/oekologische-aquakultur> (Zugriff am 16.05.2024).
60. Naturland - Prinzipien der Ökologischen Aquakultur. <https://www.naturland.de/de/naturland/wo-wir-sind/einkauf/551-oekologische-aquakultur.html> (Zugriff am 16.05.2024).
61. Ökolandbau – ökologische Aquakultur. <https://www.oekolandbau.de/landwirtschaft/oekologische-tierhaltung/oekologische-aquakultur/fuetterung/> (Zugriff am 16.05.2024).
62. Bell, M. V.; Dick, J. R.; Porter, A. E. A. In Vivo Assays of Docosaehaenoic Acid Biosynthesis in Fish. In: The big fish bang; 26th annual larval fish conference **2003**
63. New, M.; Wijkström, U. N. Use of Fishmeal and Fish Oil in Aquafeeds: Further Thoughts on the Fishmeal Trap; **2002**. <https://www.fao.org/fishery/en/publications/54566> (Zugriff am 23.09.2023).
64. IFFO - The Marine Ingredients Organisation. <https://www.iffocom.com/> (Zugriff am 18.12.2022).
65. European Commission. Directorate General for Maritime Affairs and Fisheries.; EUMOFA. Fishmeal and Fish Oil: Production and Trade Flows in the EU.; Publications Office: LU, **2021**.

66. Issifu, I.; Alava, J. J.; Lam, V. W. Y.; Sumaila, U. R. Impact of Ocean Warming, Overfishing and Mercury on European Fisheries: A Risk Assessment and Policy Solution Framework. *Front. Mar. Sci.* **2022**, *8*, 770805. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.770805>.
67. Sumaila, U. R.; Tai, T. C. End Overfishing and Increase the Resilience of the Ocean to Climate Change. *Front. Mar. Sci.* **2020**, *7*, 523. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00523>.
68. Fishmeal - Monthly Price - Commodity Prices - Price Charts, Data, and News - IndexMundi. <https://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=fish-meal&months=360> (Zugriff am 01.10.2022).
69. Albrektsen, S.; Kortet, R.; Skov, P. V.; Ytteborg, E.; Gitlesen, S.; Kleinegris, D.; Mydland, L.; Hansen, J. Ø.; Lock, E.; Mørkøre, T.; James, P.; Wang, X.; Whitaker, R. D.; Vang, B.; Hatlen, B.; Daneshvar, E.; Bhatnagar, A.; Jensen, L. B.; Øverland, M. Future Feed Resources in Sustainable Salmonid Production: A Review. *Reviews in Aquaculture* **2022**, *14* (4), 1790–1812. <https://doi.org/10.1111/raq.12673>.
70. Øverland, M.; Sørensen, M.; Storebakken, T.; Penn, M.; Krogdahl, Å.; Skrede, A. Pea Protein Concentrate Substituting Fish Meal or Soybean Meal in Diets for Atlantic Salmon (*Salmo Salar*)—Effect on Growth Performance, Nutrient Digestibility, Carcass Composition, Gut Health, and Physical Feed Quality. *Aquaculture* **2009**, *288* (3–4), 305–311. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.12.012>.
71. Hixson, S. M.; Parrish, C. C. Substitution of Fish Oil with Camelina Oil and Inclusion of Camelina Meal in Diets Fed to Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) and Their Effects on Growth, Tissue Lipid Classes, and Fatty Acids. *Journal of Animal Science* **2014**, *92* (3), 1055–1067. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7146>.
72. Sprague, M.; Walton, J.; Campbell, P. J.; Strachan, F.; Dick, J. R.; Bell, J. G. Replacement of Fish Oil with a DHA-Rich Algal Meal Derived from *Schizochytrium* Sp. on the Fatty Acid and Persistent Organic Pollutant Levels in Diets and Flesh of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*, L.) Post-Smolts. *Food Chemistry* **2015**, *185*, 413–421. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.150>.
73. El-Sayed, A.-F. M. Evaluation of Soybean Meal, Spirulina Meal and Chicken Offal Meal as Protein Sources for Silver Seabream (*Rhabdosargus Sarba*) Fingerlings. *Aquaculture* **1994**, *127* (2–3), 169–176. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90423-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90423-5).
74. Sitjà-Bobadilla, A.; Peña-Llopis, S.; Gómez-Requeni, P.; Médale, F.; Kaushik, S.; Pérez-Sánchez, J. Effect of Fish Meal Replacement by Plant Protein Sources on Non-Specific Defence Mechanisms and Oxidative Stress in Gilthead Sea Bream (*Sparus Aurata*). *Aquaculture* **2005**, *249* (1–4), 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.03.031>.
75. Ju, Z. Y.; Forster, I. P.; Dominy, W. G. Effects of Supplementing Two Species of Marine Algae or Their Fractions to a Formulated Diet on Growth, Survival and Composition of Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*). *Aquaculture* **2009**, *292* (3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.040>.
76. Ju, Z. Y.; Deng, D.-F.; Dominy, W. A Defatted Microalgae (*Haematococcus Pluvialis*) Meal as a Protein Ingredient to Partially Replace Fishmeal in Diets of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*, Boone, 1931). *Aquaculture* **2012**, *354–355*, 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.028>.
77. Oujifard, A.; Seyfabadi, J.; Kenari, A. A.; Rezaei, M. Fish Meal Replacement with Rice Protein Concentrate in a Practical Diet for the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus Vannamei* Boone, 1931. *Aquacult Int* **2012**, *20* (1), 117–129. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9446-8>.
78. Molina-Poveda, C.; Lucas, M.; Jover, M. Evaluation of the Potential of Andean Lupin Meal (*Lupinus Mutabilis* Sweet) as an Alternative to Fish Meal in Juvenile *Litopenaeus Vannamei* Diets. *Aquaculture* **2013**, *410–411*, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.06.007>.

79. Macias-Sancho, J.; Poersch, L. H.; Bauer, W.; Romano, L. A.; Wasielesky, W.; Tesser, M. B. Fishmeal Substitution with *Arthrospira (Spirulina Platensis)* in a Practical Diet for *Litopenaeus Vannamei*: Effects on Growth and Immunological Parameters. *Aquaculture* **2014**, 426–427, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.028>.
80. Radhakrishnan, S.; Saravana Bhavan, P.; Seenivasan, C.; Shanthi, R.; Muralisankar, T. Replacement of Fishmeal with *Spirulina Platensis*, *Chlorella Vulgaris* and *Azolla Pinnata* on Non-Enzymatic and Enzymatic Antioxidant Activities of *Macrobrachium Rosenbergii*. *The Journal of Basic & Applied Zoology* **2014**, 67 (2), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2013.12.003>.
81. Soller, F.; Rhodes, M. a.; Davis, D. a. Replacement of Fish Oil with Alternative Lipid Sources in Plant-Based Practical Feed Formulations for Marine Shrimp (*Litopenaeus Vannamei*) Reared in Outdoor Ponds and Tanks. *Aquaculture Nutrition* **2017**, 23 (1), 63–75. <https://doi.org/10.1111/anu.12360>.
82. Watanuki, H.; Ota, K.; Tassakka, A. C. M. A. R.; Kato, T.; Sakai, M. Immunostimulant Effects of Dietary *Spirulina Platensis* on Carp, *Cyprinus Carpio*. *Aquaculture* **2006**, 258 (1), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.05.003>.
83. Chou, R. L.; Her, B. Y.; Su, M. S.; Hwang, G.; Wu, Y. H.; Chen, H. Y. Substituting Fish Meal with Soybean Meal in Diets of Juvenile Cobia *Rachycentron Canadum*. *Aquaculture* **2004**, 229 (1), 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00395-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00395-8).
84. Lunger, A. N.; McLean, E.; Gaylord, T. G.; Kuhn, D.; Craig, S. R. Taurine Supplementation to Alternative Dietary Proteins Used in Fish Meal Replacement Enhances Growth of Juvenile Cobia (*Rachycentron Canadum*). *Aquaculture* **2007**, 271 (1), 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.006>.
85. Lunger, A. N.; Craig, S. R.; McLean, E. Replacement of Fish Meal in Cobia (*Rachycentron Canadum*) Diets Using an Organically Certified Protein. *Aquaculture* **2006**, 257 (1–4), 393–399. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.11.010>.
86. Coutteau, P.; Hadley, N. H.; Manzi, J. J.; Sorgeloos, P. Effect of Algal Ration and Substitution of Algae by Manipulated Yeast Diets on the Growth of Juvenile *Mercenaria Mercenaria*. *Aquaculture* **1994**, 120 (1), 135–150. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90229-1](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90229-1).
87. Dang, V. T.; Li, Y.; Speck, P.; Benkendorff, K. Effects of Micro and Macroalgal Diet Supplementations on Growth and Immunity of Greenlip Abalone, *Haliotis Laevigata*. *Aquaculture* **2011**, 320 (1), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.009>.
88. Arney, B.; Liu, W.; Forster, I.; Mckinley, R. S.; Pearce, C. M. Temperature and Food-Ration Optimization in the Hatchery Culture of Juveniles of the Pacific Geoduck *Panopea Generosa*. *Journal of Shellfish Research* **2015**, 34 (1), 39–53. <https://doi.org/10.2983/035.034.0107>.
89. Nakano, T.; Kanmuri, T.; Sato, M.; Takeuchi, M. Effect of Astaxanthin Rich Red Yeast (*Phaffia Rhodozyma*) on Oxidative Stress in Rainbow Trout. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1426 (119-125).
90. Storebakken, T.; Sørensen, M.; Bjerkeng, B.; Hiu, S. Utilization of Astaxanthin from Red Yeast, *Xanthophyllomyces Dendrorhous*, in Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*: Effects of Enzymatic Cell Wall Disruption and Feed Extrusion Temperature. *Aquaculture* **2004**, 236 (1–4), 391–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.10.035>.
91. Eimer, S. Alternative Fütterungsmethoden in der Mast von Regenbogenforellen. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät **2006**
92. Lund, I.; Dalsgaard, J.; Rasmussen, H. T.; Holm, J.; Jokumsen, A. Replacement of Fish Meal with a Matrix of Organic Plant Proteins in Organic Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Feed, and the Effects on Nutrient Utilization and Fish Performance. *Aquaculture* **2011**, 321 (3–4), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.028>.

93. Brizio, P.; Benedetto, A.; Righetti, M.; Prearo, M.; Gasco, L.; Squadrone, S.; Abete, M. C. Astaxanthin and Canthaxanthin (Xanthophyll) as Supplements in Rainbow Trout Diet: In Vivo Assessment of Residual Levels and Contributions to Human Health. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (46), 10954–10959. <https://doi.org/10.1021/jf4012664>.
94. Teimouri, M.; Amirkolaie, A. K.; Yeganeh, S. The Effects of Dietary Supplement of *Spirulina Platensis* on Blood Carotenoid Concentration and Fillet Color Stability in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Aquaculture* **2013**, 414–415, 224–228. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.015>.
95. Teimouri, M.; Amirkolaie, A. K.; Yeganeh, S. The Effects of *Spirulina Platensis* Meal as a Feed Supplement on Growth Performance and Pigmentation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Aquaculture* **2013**, 396–399, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.009>.
96. Hauptman, B. S.; Barrows, F. T.; Block, S. S.; Gibson Gaylord, T.; Paterson, J. A.; Rawles, S. D.; Sealey, Wendy. M. Evaluation of Grain Distillers Dried Yeast as a Fish Meal Substitute in Practical-Type Diets of Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Aquaculture* **2014**, 432, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.026>.
97. Barrows, F. T.; Frost, J. B. Evaluation of the Nutritional Quality of Co-Products from the Nut Industry, Algae and an Invertebrate Meal for Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Aquaculture* **2014**, 434, 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.037>.
98. Safari, O.; Shahsavani, D.; Paolucci, M.; Mehraban Sang Atash, M. The Effects of Dietary Nucleotide Content on the Growth Performance, Digestibility and Immune Responses of Juvenile Narrow Clawed Crayfish, *Astacus Leptodactylus Leptodactylus Eschscholtz*, 1823. *Aquaculture Research* **2015**, 46 (11), 2685–2697. <https://doi.org/10.1111/are.12422>.
99. Melenchón, F.; De Mercado, E.; Pula, H. J.; Cardenete, G.; Barroso, F. G.; Fabrikov, D.; Lourenço, H. M.; Pessoa, M.-F.; Lagos, L.; Weththasinghe, P.; Cortés, M.; Tomás-Almenar, C. Fishmeal Dietary Replacement Up to 50%: A Comparative Study of Two Insect Meals for Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Animals* **2022**, 12 (2), 179. <https://doi.org/10.3390/ani12020179>.
100. Green-Petersen, D.; Hyldig, G.; Jacobsen, C.; Baron, C. P.; Lund, I.; Hauch Nielsen, H.; Jokumsen, A. Influence of Dietary Lipid and Protein Sources on the Sensory Quality of Organic Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) After Ice Storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology* **2014**, 23 (4), 333–346. <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.718047>.
101. Mzengereza, K.; Ishikawa, M.; Koshio, S.; Yokoyama, S.; Yukun, Z.; Shadrack, R. S.; Seo, S.; Duy Khoa, T. N.; Moss, A.; Dossou, S.; Basuini, M. F. E.; Dawood, M. A. O. Effect of Substituting Fish Oil with Camelina Oil on Growth Performance, Fatty Acid Profile, Digestibility, Liver Histology, and Antioxidative Status of Red Seabream (*Pagrus Major*). *Animals* **2021**, 11 (7), 1990. <https://doi.org/10.3390/ani11071990>.
102. Fukada, H.; Kitagima, R.; Shinagawa, J.; Morino, H.; Masumoto, T. Effects of Complete Replacement of Fish Oil with Plant Oil Mixtures and Algal Meal on Growth Performance and Fatty Acid Composition in Juvenile Yellowtail *Seriola Quinqueradiata*. *Fish Sci* **2020**, 86 (1), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s12562-019-01361-9>.
103. Burel, C.; Boujard, T.; Tulli, F.; Kaushik, S. J. Digestibility of Extruded Peas, Extruded Lupin, and Rapeseed Meal in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and Turbot (*Psetta Maxima*). *Aquaculture* **2000**, 188 (3), 285–298. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00337-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00337-9).
104. Regost, C.; Arzel, J.; Cardinal, M.; Rosenlund, G.; Kaushik, S. J. Total Replacement of Fish Oil by Soybean or Linseed Oil with a Return to Fish Oil in Turbot (*Psetta Maxima*): 2. Flesh Quality Properties. *Aquaculture* **2003**, 220 (1), 737–747. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00655-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00655-5).

105. Silva-Carrillo, Y.; Hernández, C.; Hardy, R. W.; González-Rodríguez, B.; Castillo-Vargasmachuca, S. The Effect of Substituting Fish Meal with Soybean Meal on Growth, Feed Efficiency, Body Composition and Blood Chemistry in Juvenile Spotted Rose Snapper *Lutjanus Guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture* **2012**, 364–365, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.08.007>.
106. El-Sayed, A.-F. M. Alternative Dietary Protein Sources for Farmed Tilapia, *Oreochromis Spp.* *Aquaculture* **1999**, 179 (1), 149–168. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00159-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00159-3).
107. Ibrahim, M. D.; Ibrahim, M. A. The Potential Effects of Spirulina Platensis (*Arthrospira Platensis*) on Tissue Protection of Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) through Estimation of P53 Level. *Journal of Advanced Research* **2014**, 5 (1), 133–136. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.03.009>.
108. Sarker, P. K.; Kapuscinski, A. R.; McKuin, B.; Fitzgerald, D. S.; Nash, H. M.; Greenwood, C. Microalgae-Blend Tilapia Feed Eliminates Fishmeal and Fish Oil, Improves Growth, and Is Cost Viable. *Sci Rep* **2020**, 10 (1), 19328. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75289-x>.
109. Castro, P. L.; Torrecillas, S.; Montero, D.; Izquierdo, M. S.; Ginés, R. Effect of Combined Fishmeal and Fish Oil Replacement on Growth Performance, Flesh Quality and Shelf Life of European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*). *Aquaculture* **2022**, 560, 738452. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738452>.
110. Mueller, J.; Pauly, M.; Molkentin, J.; Ostermeyer, U.; Van Muilekom, D. R.; Rebl, A.; Goldammer, T.; Lindemeyer, J.; Schultheiß, T.; Seibel, H.; Schulz, C. Microalgae as Functional Feed for Atlantic Salmon: Effects on Growth, Health, Immunity, Muscle Fatty Acid and Pigment Deposition. *Front. Mar. Sci.* **2023**, 10, 1273614. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1273614>.
111. Handbuch für Lebensmittelchemiker; Frede, W., Ed.; Springer: Berlin, Heidelberg, **2010**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-01685-1>.
112. Cypionka, H. Grundlagen Der Mikrobiologie; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, **2010**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05096-1>.
113. Verordnung (EG) Nr. 767/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. Juli 2009 über das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermitteln, zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinien 79/373/EWG des Rates, 80/511/EWG der Kommission, 82/471/EWG des Rates, 83/228/EWG des Rates, 93/74/EWG des Rates, 93/113/EG des Rates und 96/25/EG des Rates und der Entscheidung 2004/217/EG der Kommission (Text von Bedeutung für den EWR) Text von Bedeutung für den EWR; 2018. Letzte konsolidierte Fassung: 26.12.2018 <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/767/2018-12-26/deu>
114. Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (Text von Bedeutung für den EWR) Text von Bedeutung für den EWR; 2021. Letzte konsolidierte Fassung: 27.03.2021 <http://data.europa.eu/eli/reg/2003/1831/2021-03-27/deu>
115. Feed Material Register. <https://feedmaterialsregister.eu/register> (Zugriff am 14.05.2024).
116. Rindi, F.; Soler-Vila, A.; Guiry, M. D. Taxonomy of Marine Macroalgae Used as Sources of Bioactive Compounds. In *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*; Hayes, M., Ed.; Springer US: Boston, MA, **2012**; 1–53 https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2_1.
117. *The Ecology of Cyanobacteria*; Whitton, B. A., Potts, M., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **2002**. <https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7>.
118. Raja, R.; Hemaiswarya, S.; Kumar, N. A.; Sridhar, S.; Rengasamy, R. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology* **2008**, 34 (2), 77–88. <https://doi.org/10.1080/10408410802086783>.

119. Milledge, J. J. Commercial Application of Microalgae Other than as Biofuels: A Brief Review. *Rev Environ Sci Biotechnol* **2011**, 10 (1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>.
120. Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications; Hayes, M., Ed.; Springer US: Boston, MA, **2012**. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1247-2>.
121. Krienitz, L.; Bock, C. Present State of the Systematics of Planktonic Coccoid Green Algae of Inland Waters. *Hydrobiologia* **2012**, 698 (1), 295–326. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1079-z>.
122. Dahlgren, G.; Küttel, M. Abteilung Chlorophyta (Grünalgen). In Systematische Botanik; In Dahlgren, G., Küttel, M. (eds); Springer: Berlin, Heidelberg, **1987**; pp 33–38. https://doi.org/10.1007/978-3-642-71611-9_7.
123. Sheath, R. G. 5 - RED ALGAE. In Freshwater Algae of North America; Wehr, J. D., Sheath, R. G., Eds.; Aquatic Ecology; Academic Press: Burlington, **2003**; 197–224. <https://doi.org/10.1016/B978-012741550-5/50006-4>.
124. Hillig, F. Impact of Cultivation Conditions and Bioreactor Design on Docosahexaenoic Acid Production by a Heterotrophic Marine Microalga. Ph.D. Thesis, Technische Universität Berlin, Fakultät III—Prozesswissenschaften, Berlin, Germany, **2014**
125. Lee, R. E. Phycology, 5th edition.; Cambridge University Press: Cambridge, **2018**.
126. De Swaaf, M.; Pronk, J.; Sijtsma, L. Fed-Batch Cultivation of the Docosahexaenoic-Acid-Producing Marine Alga *Cryptocodinium Cohnii* on Ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, 61 (1), 40–43. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1118-1>.
127. De Swaaf, M. E.; Sijtsma, L.; Pronk, J. T. High-Cell-Density Fed-Batch Cultivation of the Docosahexaenoic Acid Producing Marine Alga *Cryptocodinium Cohnii*. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 81 (6), 666–672. <https://doi.org/10.1002/bit.10513>.
128. Grewe, C. B.; Pulz, O. The Biotechnology of Cyanobacteria. In Ecology of Cyanobacteria II; Whitton, B. A., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, **2012**; pp 707–739. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3_26.
129. Wang, Z. P.; Zhao, Y. Morphological reversion of spirulina (*Arthrospira*) platensis (*Cyanophyta*): From linear to helical: Spirulina from linear to helical. *Journal of Phycology* **2005**, 41 (3), 622–628. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2005.00087.x>.
130. Auer, G. K.; Weibel, D. B. Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry* **2017**, 56 (29), 3710–3724. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00346>.
131. Ismaiel, M. M. S.; El-Ayouty, Y. M.; Loewen, P. C.; Piercey-Normore, M. D. Characterization of the Iron-Containing Superoxide Dismutase and Its Response to Stress in Cyanobacterium *Spirulina (Arthrospira) Platensis*. *J Appl Phycol* **2014**, 26 (4), 1649–1658. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0233-y>.
132. El-Baky, H. H. A.; Baz, F. K. E.; El-Baroty, G. S. Production of Phenolic Compounds from *Spirulina Maxima* Microalgae and Its Protective Effects. *African Journal of Biotechnology* **2009**, 8 (24), 7059-7067
133. Benemann, J. Microalgae for Biofuels and Animal Feeds. *Energies* **2013**, 6 (11), 5869–5886. <https://doi.org/10.3390/en6115869>.
134. Muhling, M. Characterization of *Arthrospira (Spirulina)* Strains. Durham theses, Durham University, **2000**. <http://etheses.dur.ac.uk/1198/> (Zugriff am 23.09.2023).
135. Kutty, S. N.; Philip, R. Marine Yeasts—a Review. *Yeast* **2008**, 25 (7), 465–483. <https://doi.org/10.1002/yea.1599>.
136. Rakicka, M.; Lazar, Z.; Dulermo, T.; Fickers, P.; Nicaud, J. M. Lipid Production by the Oleaginous Yeast *Yarrowia Lipolytica* Using Industrial By-Products under Different Culture Conditions. *Biotechnol Biofuels* **2015**, 8 (1), 104. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0286-z>.
137. Schulze, I. Microbial Lipid Production with Oleaginous Yeasts. PhD Thesis, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 2014. <https://doi.org/10.5445/IR/1000043118>.

138. Abbas, C. A. Production of Antioxidants, Aromas, Colours, Flavours, and Vitamins by Yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*; Querol, A., Fleet, G., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2006**; 285–334. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_10.
139. Selvaraj, V.; Sampath, K.; Sekar, V. Administration of Yeast Glucan Enhances Survival and Some Non-Specific and Specific Immune Parameters in Carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* **2005**, 19 (4), 293–306. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.001>.
140. Kot, A. M.; Błażej, S.; Kurcz, A.; Gientka, I.; Kieliszek, M. Rhodotorula Glutinis—Potential Source of Lipids, Carotenoids, and Enzymes for Use in Industries. *Appl Microbiol Biotechnol* **2016**, 100 (14), 6103–6117. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7611-8>.
141. Wirth, F.; Goldani, L. Z. Epidemiology of Rhodotorula: An Emerging Pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012, **2012**, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/465717>.
142. Yeeh, Y. Rhodotorula. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Robinson, R. K., Ed.; Elsevier: Oxford, **1999**; 1900–1905. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.1340>.
143. Roadjanakamolson, M. Production of β -Carotene-Enriched Rice Bran Using Solid-State Fermentation of Rhodotorula Glutinis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 20 (3), 525–531. <https://doi.org/10.4014/jmb.0809.0550>.
144. Hernández-Almanza, A.; Cesar Montanez, J.; Aguilar-González, M. A.; Martínez-Ávila, C.; Rodríguez-Herrera, R.; Aguilar, C. N. *Rhodotorula Glutinis* as Source of Pigments and Metabolites for Food Industry. *Food Bioscience* **2014**, 5, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.11.007>.
145. Dai, C. C.; Tao, J.; Xie, F.; Dai, Y.; Zhao, M. Biodiesel Generation from Oleaginous Yeast *Rhodotorula Glutinis* with Xylose Assimilating Capacity. *Afr. J. Biotechnol.* **2007**, 6 (18), 2130–2134. <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2331>.
146. Matissek, R.; Steiner, G.; Fischer, M. *Lebensmittelanalytik*; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, **2014**. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-34829-7>.
147. Gey, M. H. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik: Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*; Springer-Lehrbuch; Springer: Berlin, Heidelberg, **2015**. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-46255-3>.
148. New, M.B.; Wijkström, U.N., Use of fishmeal and fish oil in aquafeeds: further thoughts on the fishmeal trap, FAO Fisheries Circular No. 975. Rome. **2002**. 61 pp
149. Tacon, A. G. J. *Feed Ingredients for Carnivorous Fish Species: Alternatives to Fishmeal and Other Fishery Resources*; FAO fisheries circular; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, **1994**.
150. Schafberg, M.; Loest, K.; Meister, U.; Kurth, E.; Müller-Belecke, A.; Rohn, S. Partial Fishmeal and Oil Substitution with a Microorganism Mix as an Innovative Diet for Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and Pike-Perch (*Sander Lucioperca*). *Eur Food Res Technol* **2018**, 244 (1), 127–143. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2939-6>.
151. Schafberg, M.; Loest, K.; Müller-Belecke, A.; Rohn, S. Impact of Processing on the Antioxidant Activity of a Microorganism-Enriched Fish Feed and Subsequent Quality Effects on Fillets of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Aquaculture* **2020**, 518, 734633. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734633>.
152. Schafberg, M.; Loest, K.; Müller-Belecke, A.; Rohn, S. Pike-Perch (*Sander Lucioperca*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil—Fishes' Growth Performances and Quality Traits. *Foods* **2021**, 10 (8), 1799. <https://doi.org/10.3390/foods10081799>.

153. Glencross, B. D. Exploring the Nutritional Demand for Essential Fatty Acids by Aquaculture Species. *Reviews in Aquaculture* **2009**, 1 (2), 71–124. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2009.01006.x>.
154. Turchini, G. M.; Torstensen, B. E.; Ng, W.-K. Fish Oil Replacement in Finfish Nutrition. *Reviews in Aquaculture* **2009**, 1 (1), 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.
155. Sales, J.; Glencross, B. A Meta-Analysis of the Effects of Dietary Marine Oil Replacement with Vegetable Oils on Growth, Feed Conversion and Muscle Fatty Acid Composition of Fish Species: A Meta-Analysis of the Replacement of Marine Oils with Vegetable Oils. *Aquaculture Nutrition* **2011**, 17 (2), e271–e287. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00761.x>.
156. Campbell, K. B.; McLean, E.; Barrows, F. T. In Pursuit of Fish-Free Feeds: A Multi-Species Evaluation. *Fishes* **2022**, 7 (6), 336. <https://doi.org/10.3390/fishes7060336>.
157. Sarker, P. K. Microorganisms in Fish Feeds, Technological Innovations, and Key Strategies for Sustainable Aquaculture. *Microorganisms* **2023**, 11 (2), 439. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020439>.
158. Sarker, P. K.; Kapuscinski, A. R.; Vandenberg, G. W.; Proulx, E.; Sitek, A. J. Towards Sustainable and Ocean-Friendly Aquafeeds: Evaluating a Fish-Free Feed for Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Using Three Marine Microalgae Species. *Elementa: Science of the Anthropocene* **2020**, 8, 5. <https://doi.org/10.1525/elementa.404>.
159. F3 FIN: Feed Innovation Network. F3 FIN. <https://f3fin.org/> (Zugriff am 06.01.2023).
160. Lorenz, E.; Runge, D.; Marbà-Ardébol, A.-M.; Schmach, M.; Stahl, U.; Senz, M. Systematic Development of a Two-Stage Fed-Batch Process for Lipid Accumulation in *Rhodotorula Glutinis*. *Journal of Biotechnology* **2017**, 246, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.02.010>.
161. Ganuza, E.; Benítez-Santana, T.; Atalah, E.; Vega-Orellana, O.; Ganga, R.; Izquierdo, M. S. *Cryptocodium Cohnii* and *Schizochytrium Sp.* as Potential Substitutes to Fisheries-Derived Oils from Seabream (*Sparus Aurata*) Microdiets. *Aquaculture* **2008**, 277 (1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.005>.
162. Fiol, M.; Weckmüller, A.; Neugart, S.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Krumbein, A.; Kroh, L. W. Thermal-Induced Changes of Kale's Antioxidant Activity Analyzed by HPLC–UV/Vis-Online-TEAC Detection. *Food Chemistry* **2013**, 138 (2–3), 857–865. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.101>.
163. Tagungsband: 43. Deutscher Lebensmittelchemikertag. Lebensmittelchemische Gesellschaft – Fachgruppe in der GDCh. Gesellschaft Dt. Chemiker **2014**
164. Brennan, C.; Brennan, M.; Derbyshire, E.; Tiwari, B. K. Effects of Extrusion on the Polyphenols, Vitamins and Antioxidant Activity of Foods. *Trends in Food Science & Technology* **2011**, 22 (10), 570–575. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.05.007>.
165. Davis, B. C.; Kris-Etherton, P. M. Achieving Optimal Essential Fatty Acid Status in Vegetarians: Current Knowledge and Practical Implications. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2003**, 78 (3), 640S–646S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.3.640S>.
166. Tocher, D. R. Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Aquaculture in Perspective. *Aquaculture* **2015**, 449, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.010>.
167. Lee, J.; Lee, H.; Kang, S.; Park, W. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* **2016**, 8 (1), 23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>.
168. Al-Duais, M.; Müller, L.; Böhm, V.; Jetschke, G. Antioxidant Capacity and Total Phenolics of *Cyphostemma Digitatum* before and after Processing: Use of Different Assays. *Eur Food Res Technol* **2009**, 228 (5), 813–821. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0994-8>.

169. Serrano, E.; Simpfendorfer, R.; Medina, A.; Sandoval, C.; Martínez, A.; Morales, R.; Davies, S. J. Partially Replacing Fish Oil with Microalgae (*Schizochytrium Limacinum* and *Nannochloropsis Oceanica*) in Diets for Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Reared in Saltwater with Reference to Growth Performance, Muscle Fatty Acid Composition and Liver Ultrastructure. *Aquaculture Research* **2021**, 52 (9), 4401–4413. <https://doi.org/10.1111/are.15279>.
170. Geurden, I.; Aramendi, M.; Zambonino-Infante, J.; Panserat, S. Early Feeding of Carnivorous Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) with a Hyperglucidic Diet during a Short Period: Effect on Dietary Glucose Utilization in Juveniles. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **2007**, 292 (6), R2275–R2283. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00444.2006>.
171. Krogdahl, Å.; Hemre, G.-I.; Mommsen, T. p. Carbohydrates in Fish Nutrition: Digestion and Absorption in Postlarval Stages. *Aquaculture Nutrition* **2005**, 11 (2), 103–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x>.
172. VERORDNUNG (EG) Nr. 1272/2008 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 16. Dezember 2008 über die Einstufung, Kennzeichnung und Verpackung von Stoffen und Gemischen, zur Änderung und Aufhebung der Richtlinien 67/548/EWG und 1999/45/EG und zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1907/2006, letzte konsolidierte Fassung vom 1.12.2023 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32008R1272&qid=1711316163536>

10. Anhang

10.1. Ergänzende Informationen zu den Publikationen (*Supplemental Material*)

10.1.1. Publikation II

*Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)*

Michaela Schafberg, Karin Loest, Andreas Müller-Belecke, Sascha Rohn

Supplementary data to this article can be found online at

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734633>

This article was originally published in *Aquaculture*, 518 by Schafberg, M., Loest, K., Müller-Belecke, A. & Rohn, S., Impact of processing on the antioxidant activity of a microorganism-enriched fish feed and subsequent quality effects on fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), 734633, 2020, Copyright 2019 Elsevier B.V. All rights reserved (2019),

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848619309597?via%3Dihub>

Table S1. Ingredient composition for 1 kg of the control diet and feed mix

Diet	Control diet	Feed Mix
Ingredients [kg]		
Fish meal 70	0.379	0.190
<i>Arthrospira</i> sp. (DW)	-	0.121
<i>Rhodotorula glutinis</i> (DW)	-	0.090
<i>Cryptocodinium cohnii</i> (DW)	-	0.045
Wheat	0.140	0.140
HP-shredded soy extract	0.120	0.120
Pea protein	0.100	0.100
Hemoglobin powder	0.050	0.050
Feather meal hydrolys.	0.050	0.050
Fish oil	0.136	0.068
<i>Misc:</i>		
Monoca-Phosphat (Cafk)	0.020	0.020
Aqua-Mix /F 0.5	0.004	0.004
Cholinchlorid 60%	0.002	0.002

Table S2. Changes of bioactive components during the manufacturing process – additional data to Table 1

Ingredient or manufacturing step	TPC (mg GA g ⁻¹ DW)		TEAC (mg TE g ⁻¹ DW)		Radical scavenging activity (mg FE g ⁻¹ DW)		Total chlorophyll content (mg tChl g ⁻¹ DW)		Total carotenoid content (mg tCar g ⁻¹ DW)	
	12.76 ± 3.73	2.81 ± 1.26 ⁺	35.17 ± 0.06 ⁺	< LOQ	0.347 ± 0.260					
<i>Cryptocodium cohnii</i> ^a	10.31 ± 3.68	48.25 ± 20.00	12.75 ± 6.90	26.49 ± 0.99 ⁺	4.225 ± 0.170 ⁺					
<i>Arthrospira sp.</i> ^a	1.68 ± 0.15 ⁺	41.46 ± 0.09 [#]	4.63 ± 4.32	< LOQ	0.115 ± 0.006 [#]					
<i>Rhodotorula glutinis</i> ^a	4.04 ± 0.11	5.31 ± 0.37	5.21 ± 0.33	3.22 ± 0.22	0.544 ± 0.033					
FM-I	2.09 ± 0.10 [#]	12.70 ± 0.11 [#]	4.47 ± 0.09	1.21 ± 0.02 [#]	0.133 ± 0.002 [#]					
FM-II ^a	2.46 ± 0.05 [*]	2.64 ± 0.25 [#]	2.81 ± 0.03 [#]	1.02 ± 0.03 [#]	0.116 ± 0.005 ⁺					
FM-III ^a	2.46 ± 0.10 [#]	3.76 ± 0.09 [#]	3.11 ± 0.03 ⁺	0.81 ± 0.07 [*]	0.101 ± 0.012 [#]					
C-I	2.71 ± 0.04	3.12 ± 0.09	2.33 ± 0.06	0.07 ± 0.06	0.028 ± 0.004					
C-II ^b	1.79 ± 0.10	5.08 ± 0.05 ⁺	2.10 ± 1.04	0.02 ± 0.003	0.022 ± 0.001					
C-III ^b	1.71 ± 0.08 [*]	2.43 ± 0.12 [#]	2.59 ± 0.01	0.03 ± 0.004	0.019 ± 0.001 [#]					
C-IV ^b	1.07 ± 0.01 ⁺	3.62 ± 0.20 [*]	2.48 ± 0.00	0.37 ± 0.10	< LOQ					

FM = Feed Mix C = Control Diet LOQ: Limit of quantification DW: Dry weight TPC: Total phenolic content
 TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity GA: Gallic Acid TE: Trolox Equivalent FE: Fremy's salt Equivalent tChl: total Chlorophyll content

tCar: total Carotenoid content

^a compared with feed mix I ^b compared with control I Significant levels: * p<0.05; # p<0.01; + p<0.001

I = Premix II = after extrusion III = after drying IV = after the application of oil and drying

Table S3. Changes of bioactive components during the feeding trial

Diet & Week	TPC (mg GA g ⁻¹ BM ¹)		TEAC (mg TE g ⁻¹ BM)		Radical scavenging activity (mg FE g ⁻¹ BM)		Total chlorophyll content (mg tChl g ⁻¹ DW)		Total carotenoid content (mg tCar g ⁻¹ DW)	
	Control	Industry	Control	Industry	Control	Industry	Control	Industry	Control	Industry
S-4	0.086 ± 0.010	1.364 ± 0.051	0.365 ± 0.037	0.078 ± 0.013	< LOQ					
S-8	0.074 ± 0.011	1.053 ± 0.197*	0.596 ± 0.121*	0.064 ± 0.015	< LOQ					
S-12	0.117 ± 0.028 [#]	1.839 ± 0.226 [#]	0.431 ± 0.050	0.062 ± 0.009*	< LOQ					
S-16	0.062 ± 0.018 [~]	2.128 ± 0.268 ^{§†}	0.931 ± 0.109	0.052 ± 0.010 ^{§*}	0.0004 ± 0.0007					
FM-4	0.074 ± 0.037	1.022 ± 0.196	0.232 ± 0.045	0.072 ± 0.006	< LOQ					
FM-8	0.132 ± 0.083	0.899 ± 0.195	0.528 ± 0.154	0.068 ± 0.007	0.0001 ± 0.0001					
FM-12	0.100 ± 0.027	1.749 ± 0.189 ^{~†}	0.556 ± 0.106*	0.071 ± 0.013	0.0024 ± 0.0019 ^{§*}					
FM-16	0.103 ± 0.031 [#]	1.976 ± 0.151 ^{§†}	0.637 ± 0.227 [†]	0.055 ± 0.018	0.0003 ± 0.0004 [§]					
C-4	0.055 ± 0.008	1.118 ± 0.141	0.372 ± 0.096	0.066 ± 0.010	0.0001 ± 0.0001					
C-8	0.077 ± 0.021*	0.916 ± 0.176	0.524 ± 0.101	0.078 ± 0.005	< LOQ					
C-12	0.055 ± 0.016 [§]	1.484 ± 0.116 ^{~#}	0.469 ± 0.109	0.097 ± 0.043	< LOQ					
C-16	0.060 ± 0.010	1.945 ± 0.069 ^{~†}	0.558 ± 0.048*	0.086 ± 0.052	< LOQ					

FM = Feed Mix C = Control Diet S = Industry Standard Diet LOQ: Limit of quantification BM: Biomass DW: Dry weight

GA: Gallic Acid TE: Trolox Equivalent FE: Frey's salt Equivalent tChl: total Chlorophyll content tCar: total Carotenoid content

TPC: Total phenolic content TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

Compared with fish fillet from week 4; same feed

Compared with fish fillet at the previous sampling; same feed

Significant levels: * p<0.05; # p<0.01; † p<0.001

Significant levels: § p<0.05; ~ p<0.01; † p<0.001

Table S4. Changes of the fillet color during the observed time using the CIE-L*a*b* color space

Diet	Color Parameter	Week			
		4	8	12	16
Feed Mix	L	79.16 ± 0.80	77.39* ± 0.78	78.84 ± 0.79	70.85 [§] ± 0.71
	a	0.01 ± 0.00	1.23* ± 0.01	2.51* ± 0.03	1.06 [#] ± 0.01
	b	18.52 ± 0.19	20.38* ± 0.20	21.68 [§] ± 0.22	20.84 [§] ± 0.21
	dE ₁		2.85	4.04	8.69 ± 0.09
	dE _p			2.33	8.17 ± 0.08
Control	L	75.42 ± 0.75	73.77 ± 0.74	78.11 ± 0.78	72.60 ± 0.73
	a	0.35 ± 0.00	1.49 [#] ± 0.01	1.70* ± 0.02	1.76 ± 0.02
	b	20.01 ± 0.20	20.07 ± 0.20	19.85 ± 0.20	20.62 ± 0.21
	dE ₁		2.01	3.02	3.21 ± 0.03
	dE _p			4.36	5.56 ± 0.06
Standard	L	81.37 ± 0.81	76.22 [§] ± 0.76	79.01 [#] ± 0.79	74.69 [§] ± 0.75
	a	0.66 ± 0.01	0.69 ± 0.01	1.18* ± 0.01	0.21* ± 0.01
	b	18.96 ± 0.19	18.70 ± 0.20	19.60 ± 0.20	19.00 ± 0.19
	dE ₁		0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	dE _p			1.63 ± 0.02	4.47 ± 0.05

₁ compared with fish fillet color in week 4 _p compared with fish fillet color at the previous sampling

L: Lightness a: redness b: yellowness dE: color difference

Compared with fish fillet from week 4; same feed Significant levels: * p<0.05; [#] p<0.01; ⁺ p<0.001

Compared with fish fillet at the previous sampling; same feed Significant levels: [§] p<0.05; [§] p<0.01; [~] p<0.001

10.1.2. Publikation III

Pike-Perch (Sander lucioperca) and Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) fed with an Alternative Microorganism Mix for Reducing Fish Meal and Oil – Fishes' Growth Performances and Quality Traits

Michaela Schafberg, Karin Loest, Andreas Müller-Belecke, Sascha Rohn

Supplementary Materials: The following are available online at

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods10081799/s1>

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Table S1. Paired comparison tests of pike-perch. The panelists decided which of the tested group has the more expressed attribute and which attributes of the groups they prefer. If the panelists had the impression there were no difference, the answer ND was given.

Attribute	Test I			Test II			Test III				
	Standard	Industrial	ND	Feed Mix	Control	ND	Feed Mix	Standard	Industrial	ND	Control
Expressed											
Odor	6	7	11	5	8	11	3	5	16*		
Color	2	14	9	8	9	7	5	14	5		
Texture	6	6	12	5	4	15	2	13	9		
Taste	9	8	8	7	9	8	6	7	11		
Preferred											
Odor	5	10	9	8	8	8	10	6	8		
Color	5	17	1	11	10	3	5	15	4		
Texture	8	10	6	9	6	9	7	14	3		
Taste	4	10	9	7	9	8	8	10	6		

Significance levels: * $p < 0.20$; ** $p < 0.05$; ND = no differences.

Table S2. Paired comparison tests of rainbow trout. The panelists decided which of the tested group has the more expressed attribute and which attributes of the groups they prefer. If the panelists had the impression there were no difference, the answer ND was given.

Attribute	Test I			Test II			Test III				
	Standard	Industrial	ND	Feed Mix	Control	ND	Feed Mix	Standard	Industrial	ND	Control
Expressed											
Odor	9	7	8	9	10	5	5	6	13		
Color	3	14	7	4	0	20**	18**	4	2		
Texture	7	7	10	16*	6	2	8	8	8		
Taste	6	4	14	14	4	6	9	5	10		
Preferred											
Odor	12	7	5	4	13	7	9	7	8		
Color	8	15	1	13	4	7	0	5	19**		
Texture	11	8	5	6	11	7	4	13	7		
Taste	12	3	9	9	5	10	14	5	5		

Significant levels: * $p < 0.20$; ** $p < 0.05$; ND = no differences.

10.2. Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe

Im folgenden Verzeichnis (Tabelle 7) sind alle verwendeten Chemikalien gemäß VO (EG) 1272/2008 unter Angabe ihrer CAS-Nummern und der Gefahrenbeurteilungen (Tabelle 8) gemäß dem *global harmonisierten System* (GHS) aufgeführt.¹⁷²

Tabelle 7 Liste der verwendeten Gefahrstoffe

Substanz	CAS-Nr.	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
ABTS (2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))	28752-68-3	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008		
Aceton	67-64-1	02, 07	225 - 319 - 336	210 - 233 - 240 - 241 - 242 - 305 + 351 + 338
Acetylchlorid	75-36-5	02, 05	225 - 314	210 - 260 - 280 - 303 + 361 + 353 - 305 + 351 + 338 - 310
Dinatriumhydrogenphosphat	7558-79-4	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008		
Ethanol	64-17-5	02, 07	225-319	210 - 233 - 240 - 241 - 242 - 305 + 351 + 338
Folin – Ciocalteu's Reagenz	Gemisch aus 10377-48-7, 13472-45-2, 7664-38-2, 7647-01-0, 7726-95-6	05	290-314	234 - 280 - 303 + 361 + 353 - 304 + 340 + 310 - 305 + 351 + 338 - 363
Fremys Salz (Kaliumnitrosodisulfonat)	14293-70-0	02	260 - 302 - 312 - 332	223 - 231 + 232 - 280 - 301 + 312 - 302 + 352 + 312 - 304 + 340 + 312
Gallussäure	149-91-7	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008		
Kaliumdihydrogenphosphat	7778-77-0	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008		
Kaliumpersulfat	7727-21-1	03, 07, 08	H272 - H302 - H315 - H317 - H319 - H334 - H335	P210 - P220 - P280 - P301 + P312 - P302 + P352 - P305 + P351 + P338
Lysozym (70.000 U mg-1)	12650-88-3	08	H334	P261 - P284 - P304 + P340 + P312 - P501
Menhaden Fish Öl	8002-50-4	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008		

Fortsetzung Tabelle 7

Substanz	CAS-Nr.	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
n-Heptan	142-82-5	02, 07, 08, 09	225 - 304 - 315 - 336 - 410	210 - 240 - 273 - 301 + 330 + 331 - 302 + 352 - 403 + 233
Petrolether (Sdp. 40-60 °C)	8032-32-4	02, 07, 08	225 - 304 - 315 - 336 - 361f - 373 - 411	201 - 210 - 273 - 301 + 310 - 303 + 361 + 353 - 331
Salzsäure (37%)	7647-01-0	05, 07	290 - 314 - 335	280 - 303 + 361+353 - 305 + 351 + 338 + 310
Supelco ® 37 Component FAME Mix	Gemisch mit 75-09-2	07, 08	H315 - H319 - H336 - H351	P202 - P261 - P264 - P302 + P352 - P305 + P351 + P338 - P308 + P313
Trichloressigsäure	76-03-9	05, 09	314 - 335 - 410	260 - 271 - 273 - 280 - 303 + 361 + 353 - 305 + 351 + 338 - 391
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-carbonsäure)	53188-07-1	07	315 - 319 - 335	261 - 305 + 351 + 338
Ultrapure deionized water	7732-18-5	Kein Gefahrstoff gemäß VO (EG) 1272/2008		

Tabelle 8 GHS Kennzeichnung und Bedeutung gemäß VO (EG) 1272/2008 ¹⁶⁷

Kodierung	Bedeutung
02	Endzündbar
05	Korrosiv, ätzend
06	Akute Toxizität
07	Achtung
08	Gesundheitsgefahren
09	Gewässergefährdend

11. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde. In diese Arbeit eingebrachte Ergebnisse aus Praktika und Projektstudien entstammen meiner Anleitung.

Hamburg, den 24.06.2024
Ort, Datum

Michaela Schafberg
Unterschrift