

# RAAK-PRO ZEEVIVO Zeewier in visvoer

## Rapport Werkpakket A, Zeewierteelt



Auteur: Tsjippie Visser

Penvoerder: Hogeschool Van Hall Larenstein

**Consortium:**

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



# Eindrapport Werkpakket A, Zeewierteelt

Het effect van stikstof op de groei en het eiwitgehalte van *Saccharina latissima* en *Ulva lactuca* en de aminozurencompositie van *Ulva lactuca*.

Tsjippie Visser

Leeuwarden 2020



## ZEEVIVO Projectsamenvatting

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

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

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

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

# Inhoudsopgave

ZEEVIVO Projectsamenvatting .....	2
1. Inleiding .....	6
2. Methode .....	7
2.1 Onderzoeksopzet <i>Saccharina</i> .....	7
2.2 Onderzoeksopzet <i>Ulva</i> .....	8
2.3 Groei en eiwitbepaling .....	9
2.5 Aminozuur bepaling <i>Ulva</i> .....	9
2.6 Data-analyse <i>Saccharina</i> en <i>Ulva</i> .....	9
3. Resultaten <i>Saccharina</i> .....	10
3.1 Groei .....	10
3.2 Eiwitgehalte .....	10
4. Resultaten <i>Ulva</i> .....	11
4.1 Groei .....	11
4.2 Eiwitgehalte .....	12
4.3 Amino-zuren .....	13
5. Discussie .....	15
5.1 <i>Saccharina</i> .....	15
5.2 <i>Ulva</i> .....	15
Totaal stikstof - totaal aminozuren gehalte onder hoge nitraatconcentratie .....	16
Bacteriële infectie .....	16
6. Aanbevelingen .....	17
Biomassa - medium verhoudingen .....	17
Stikstofbron .....	17
Vertaalslag naar de praktijk .....	17
7. Conclusie .....	19
8. Dankwoord .....	20
9. Bibliografie .....	21
Bijlage I Overzicht verschillen in experimentele opzet .....	i
Bijlage II Protocol for growth analysis using ImageJ v1.51 .....	ii
Bijlage IV Gebruikte software en apparatuur .....	iii

## 1. Inleiding

Door een hard groeiende wereldpopulatie groeit ook de vraag naar vis en daarmee de productie van vis in de aquacultuursector. Wanneer de ingrediënten voor het visvoer duurzaam geproduceerd worden, kan gekweekte vis een duurzaam alternatief zijn voor gevangen vis. Momenteel is soja de meest gebruikte eiwitbron in visvoer, dit is nadelig met het oog op duurzaamheid doordat het concurreert met andere landbouwgewassen, natuur en recreatie. Zeewier als bron van deze eiwitten is een mogelijk duurzaam alternatief.

Door het hoge eiwitgehalte is zeewier een potentieel interessante bron voor de productie van functionele voedingsmiddelen of diervoedingrediënten. Zeewier heeft, afhankelijk van bijvoorbeeld de soort en het seizoen, een eiwitgehalte van maximaal 25%. Als zeewier als alternatieve duurzame eiwitbron gekweekt zou worden, zou controle over groei en samenstelling een zeer belangrijke vereiste zijn voor implementatie op grote schaal. Idealiter zou het een hoog en constant eiwitgehalte moeten hebben. Zeewieren nemen hun voedingsstoffen rechtstreeks op uit het water. Een hogere beschikbaarheid van nutriënten in het water zou leiden tot een hogere opname en daarmee mogelijk tot hogere concentraties van stikstofhoudende componenten zoals eiwitten in het zeewier.

Op basis van eerder onderzoek van onder andere Hortimare en het NIOZ zijn het bruinwier *Saccharina latissima* (suikerkelp, hierna naar verwezen als *Saccharina*) (Figuur 1) en het groenwier *Ulva lactuca* (zeesla, hierna naar verwezen als *Ulva*) (Figuur 2) onderzocht. Beiden soorten kunnen een hoge productie per oppervlakte hebben en komen voor in Nederland. Daarbij is er een najaarssoort (*Saccharina*) en een voorjaarssoort (*Ulva*) die zo kunnen zorgen voor een continue productie gedurende het jaar.



Figuur 1: *Saccharina latissima* (Steen Booher, 2018)



Figuur 2: *Ulva lactuca* (Novak, 2018)

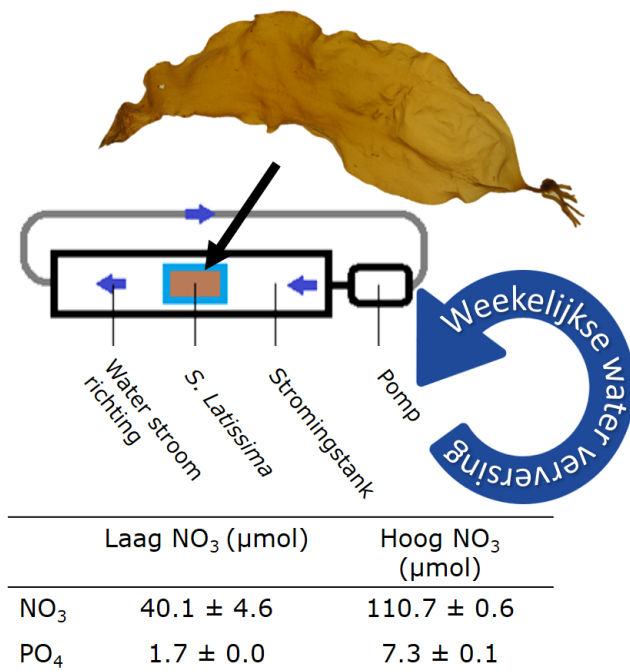
De doelstelling van werkpakket A is het bepalen van het effect van stikstofconcentratie op groeisnelheid, eiwitgehalte en aminozuursamenstelling van *Saccharina* en *Ulva*.

## 2. Methode

*Saccharina* en *Ulva* zijn zeewiersoorten met verschillende eigenschappen, daarom verschillen de gebruikte onderzoeksmethodes van elkaar. De onderzoeksopzet wordt daarom per zeewiersoort behandeld.

### 2.1 Onderzoeksopzet *Saccharina*

Jonge *Saccharina* zeewier individuen (sporofyten), zijn opgekweekt onder hoge en lage nitraatconcentraties in 12 stromingstanken (Figuur 3). Beide nitraatconcentraties zijn getest in combinatie met hoge, medium en langzame stroomsnelheden, wat resulteerde in zes behandelingen en n=2 per behandeling (Tabel 1). Er werd gebruik gemaakt van een “pulse and chase set-up” waarbij voor en na een waterverversing de nutriëntconcentraties van het water werden gemeten (Lubsch and Timmermans 2018). Oppervlakte, gewicht en eiwitbepalingen zijn aan het eind van het experiment, na 4 maanden, bepaald.



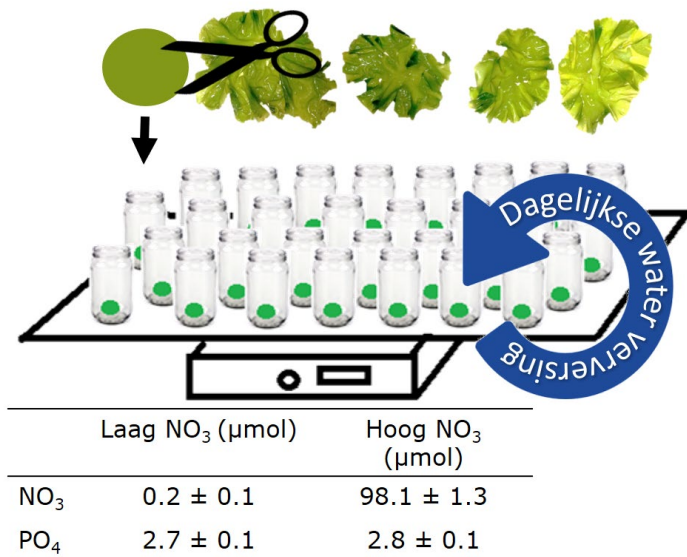
Figuur 3: experimentele opzet van *S. latissima* in een stromingstank.

Tabel 1: Methode overzicht *Saccharina latissima*

<b>NO<sub>3</sub> concentraties (µM/L)</b>	40.1, 110.7
<b>PO<sub>4</sub> concentratie (µM/L)</b>	1.7, 7.3
<b>Steekproefgrootte</b>	n=2 per behandeling
<b>Volume medium (ml)</b>	Volume stromingstank
<b>Temperatuur (°C)</b>	13±1
<b>Saliniteit (‰)</b>	29±1
<b>Lichtintensiteit (µM/m<sup>2</sup>/s)</b>	100±19
<b>Uithongeringsperiode voor start experiment (Dagen)</b>	Nvt (start met sporofyten)
<b>Duur experiment</b>	4 maanden
<b>Moment N-toevoeging &amp; waterverversing</b>	Om de 7 dagen
<b>Moment oppervlakte &amp; gewicht bepaling</b>	Einde experiment
<b>Moment eiwitgehaltemetingen</b>	Eind experiment

## 2.2 Onderzoeksopzet *Ulva*

*Ulva* kan nutriënten opslaan in pigmentcellen. Voorafgaand aan het experiment is er gezorgd dat deze opslag leeg is. Dit is bereikt door uithongering van het zeewier in nutriëntarm water voor 13 dagen. Door deze zogenaamde *starvation phase* ontstaat er homogeen zeewier (Lubsch & Timmermans, 2018; Fujita, 1985; Pedersen, 1994). Uit dit zeewier werden cirkels uitgesneden die in glazen potten zijn geplaatst op een schudtafel (100 rpm) in zeewater met verschillende nitraat concentraties (Figuur 4). Er is gewerkt met een lage (0.2 µMol/L) en een hoge (98.1 µMol/L) nitraatconcentratie (Tabel 2). Per behandeling is gekozen voor 16 replicaten. Er werd gebruik gemaakt van een “pulse and chase set-up” waarbij voor en na een waterverversing de nutriëntconcentraties van het water werden gemeten (Lubsch and Timmermans 2018). Om de dag werd de groei van het zeewier gemeten en aan het begin en aan het einde van het experiment werd ook het eiwitgehalte in het zeewier bepaald.



Figuur 4: experimentele opzet van *U. Lactuca* op een schudtafel met lage nutriëntomstandigheden (n=16) en hoge nutriëntomstandigheden (n=16).

Tabel 2: Methode overzicht *Ulva lactuca*

<b>NO<sub>3</sub> concentraties (µM/L)</b>	0.2, 98.1
<b>PO<sub>4</sub> concentratie (µM/L)</b>	2.7, 2.8
<b>Steekproefgrootte</b>	n=16
<b>Volume medium (ml)</b>	100
<b>Temperatuur (°C)</b>	12.1
<b>Saliniteit (‰)</b>	29.2
<b>Lichtintensiteit (µM/m<sup>2</sup>/s)</b>	134 ± 37
<b>Uithongeringsperiode voor start experiment (Dagen)</b>	13
<b>Duur experiment</b>	13
<b>Moment N-toevoeging &amp; waterversing</b>	1 <sup>e</sup> 4 dagen elke 6 uur, daarna dagelijks
<b>Moment oppervlakte bepaling (Dagen)</b>	1, 3, 5, 7, 9, 11, 13
<b>Moment eiwitgehaltemetingen (Dagen)</b>	Initieel, 1, 13

### 2.3 Groei en eiwitbepaling

De groei van *Saccharina* en *Ulva* is bepaald met behulp van een oppervlaktemeting, waarbij gebruik is gemaakt van foto's en Image-J 1.49 software (Bijlage II). Het verschil in oppervlakte tussen meetmomenten is vervolgens uitgedrukt in relatieve groeisnelheid (RGR, Relative Growth Rate). Voor *Saccharina* is er naast de groei op basis van oppervlakte ook gekeken naar groei op basis van drooggewicht. Hiervoor is het zeewier drooggedept en gewogen.

Het totale stikstofgehalte van de zeewiersamples is bepaald met behulp van Dumas. Vervolgens is dit omgerekend naar eiwitgehalte, waarbij gebruik gemaakt is van een stikstof tot eiwitfactor van 4.97 (Angell 2015).

### 2.5 Aminozuur bepaling *Ulva*

De meest accurate maar ook meest kostbare methode voor het bepalen van de hoeveelheid eiwit in het zeewier, is het bepalen van de verschillende aminozuren. Deze methode is nog niet beschikbaar voor Suikerkelp en is daarom alleen toegepast bij het *Ulva* experiment. De volgende aminozuren zijn gemeten: (AA) argine, histidine, isoleucine, methionine, fenylalanine, tryptofaan, valine, alanine, asparaginezuur/ asparagine, glutaminezuur/ glutamine, glycine, serine en tyrosine. (cysteïne, lysine, proline en threonine werden niet gemeten tijdens de analyse, dit zou een onderschatting kunnen geven van het totaal aan AA) De analyses zijn uitgevoerd met een High Performance Liquid Chromatography (HPLC) systeem.

### 2.6 Data-analyse *Saccharina* en *Ulva*

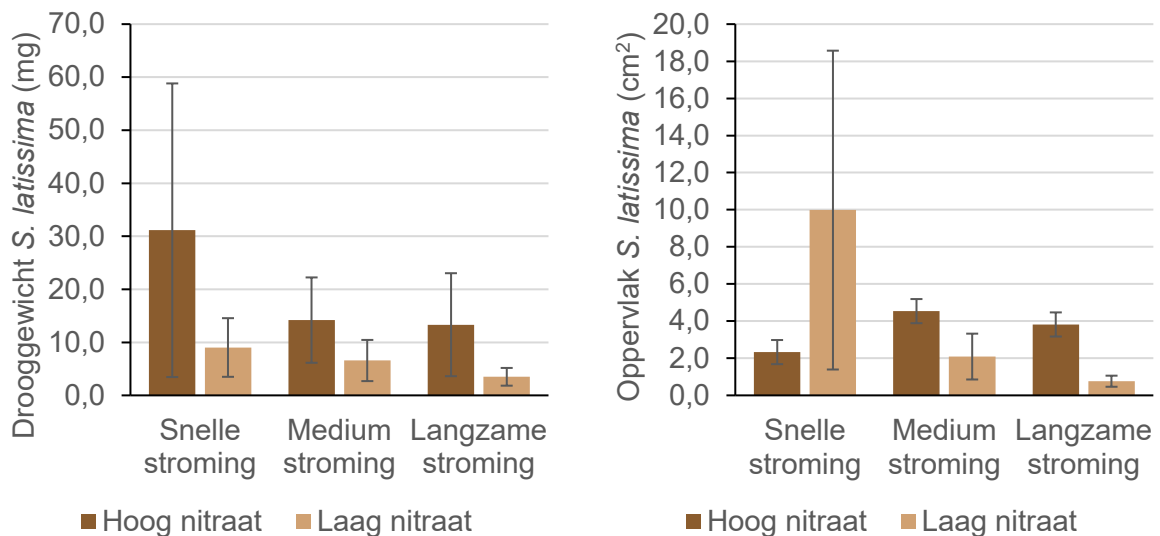
Voor de verwerking van de verschillende gegevens is gebruik gemaakt van SPSS software. Het effect van stromingsnelheid en stikstofconcentratie op de groeisnelheid van *Saccharina* is niet statistisch getest omdat er slechts twee replicaten per behandeling mogelijk waren. Het effect van stikstofconcentratie op het eiwitgehalte van *Ulva* is getest met behulp van een t-test.



### 3. Resultaten *Saccharina*

#### 3.1 Groei

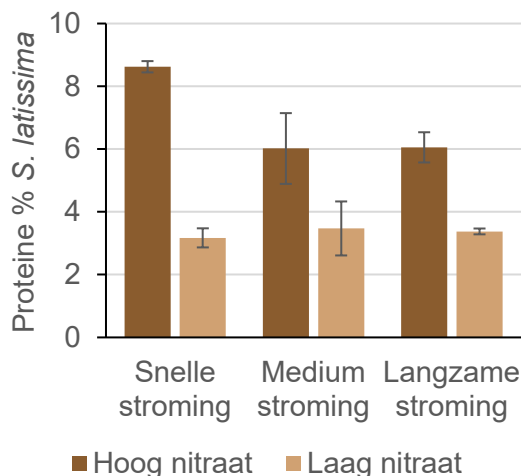
Hoge nitraatconcentraties lijkt bij alle stroomsnelheden te resulteren in een hoger drooggewicht van *Saccharina* (Figuur 5). Dit effect is het grootste bij een snelle stroming. Het effect van nitraatconcentratie en stroomsnelheid op het oppervlakte van *Saccharina* is minder duidelijk. Het lijkt dat, bij een snelle stroming, een lage nitraatconcentratie leidt tot een grotere oppervlakte. Bij een langzame stroming lijkt juist een hoge nitraatconcentratie voor een grotere oppervlakte te leiden. Deze resultaten zijn echter niet statistisch vergeleken en moeten met voorzichtigheid worden geïnterpreteerd.



Figuur 5: Gemiddeld drooggewicht (met standaarddeviatie) en oppervlakte onder hoge 110,7  $\mu\text{M/l}$  en lage 40,1  $\mu\text{M/l}$  nitraatomstandigheden en verschillende stroomsnelheden ( $n=2$  per behandeling) van *S. latissima*.

#### 3.2 Eiwitgehalte

Zeewier geproduceerd onder een hoge nitraat concentratie levert in alle gevallen het hoogste eiwitgehalte op. Een hoge stroomsnelheid lijkt dit effect te versterken (Figuur 6).

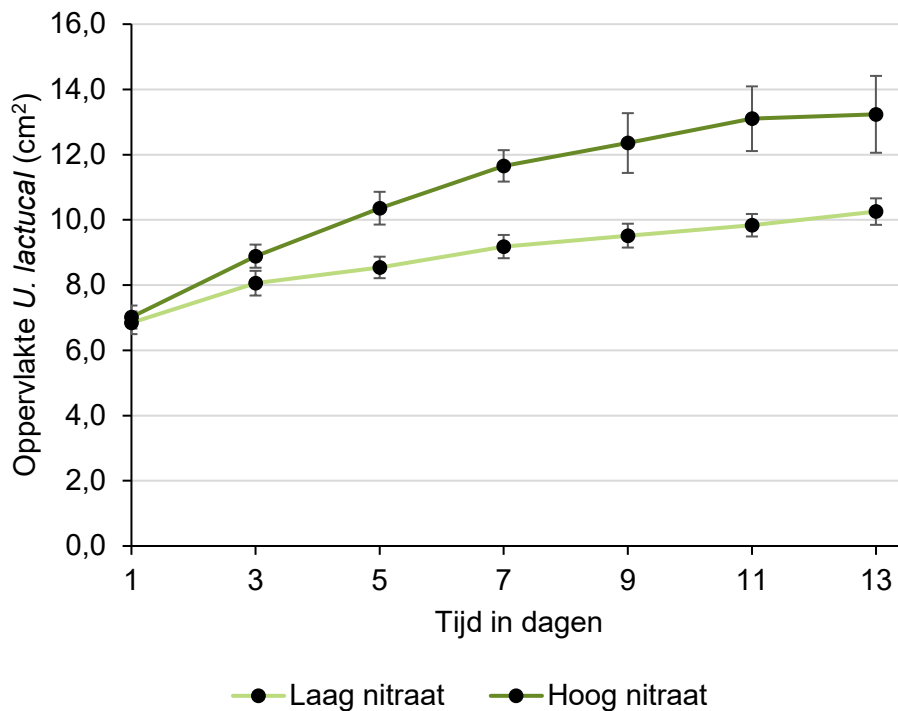


Figuur 6: Gemiddelde eiwitgehalten ( $N=4,97$ ) (met standaarddeviatie) onder hoge 110,7  $\mu\text{M/l}$  en lage 40,1  $\mu\text{M/l}$  nitraatomstandigheden en verschillende stroomsnelheden ( $n=2$  per behandeling) van *S. latissima*.

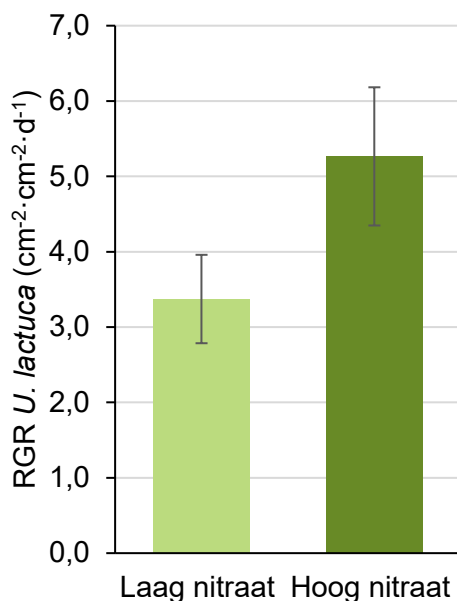
## 4. Resultaten *Ulva*

### 4.1 Groei

Beide behandelingen (hoog nitraat 98  $\mu\text{M/L}$  en laag 0,2  $\mu\text{M/L}$ ) van het zeewier vertoonden een constante groei in oppervlakte (Figuur 7). Onder de hoge nitraatconcentratie was de RGR 5,27  $\pm$  4,09  $\mu\text{g/mg}$ , dat was significant hoger ( $t_{169}=3,63$ ,  $p<0,000$ ) dan de RGR van de lage nitraatconcentratie: 3,37  $\pm$  2,47  $\mu\text{g/mg}$  (Figuur 8).



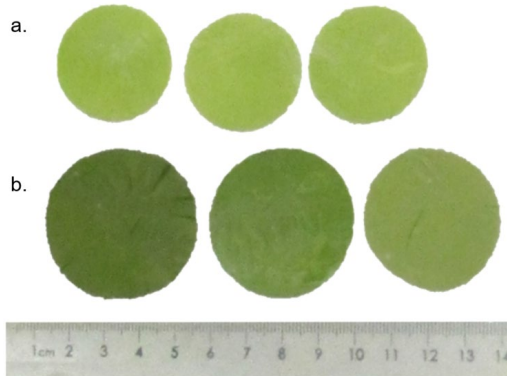
Figuur 7: Oppervlakte in de tijd van *U. lactuca* (cm<sup>2</sup>) onder lage nitraat concentraties (0,2  $\mu\text{M/L}$ ) ( $n=16$ ) en hoge nitraat concentraties (98,1  $\mu\text{M/L}$ ) ( $n=16$ ) met standaarddeviatie.



Figuur 8: Relatieve groei ratio van de oppervlakte van *U. lactuca* (cm<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>/d) onder lage nitraat concentraties (0,2  $\mu\text{M/L}$ ) ( $n=16$ ) en hoge nitraat concentraties (98,1  $\mu\text{M/L}$ ) ( $n=16$ ) met standaarddeviatie.

## 4.2 Eiwitgehalte

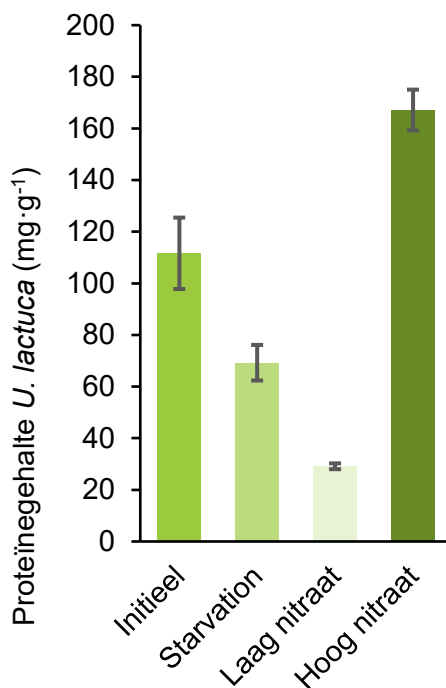
In Figuur 9 wordt de kleur en de grootte van het zeewier na 6 dagen incubatie op dag 7 van het experiment weergegeven. Er is al na 6 dagen een verschil in grootte en kleur te zien tussen zeewier geïncubeerd onder lage nitraatconcentraties (Figuur 7a) en hoge nitraatconcentraties (Figuur 7b).



Figuur 7a: drie uitgesneden *U. lactuca* thalli onder lage nitraat concentraties op dag 7.

Figuur 7b: drie uitgesneden *U. lactuca* thalli onder hoge nitraat concentraties op dag 7.

In Figuur 8 wordt het eiwitgehalte weergegeven voor de verschillende behandelingen. Het initiële zeewier, voor de *starvation phase*, bevat een eiwitgehalte van  $111,6 \pm 13,8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  eiwit. Na 13 dagen *starvation phase* is het eiwitgehalte gedaald naar  $69,2 \pm 6,9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Onder de laag nitraat behandeling zakt het eiwitgehalte nog verder naar  $29,2 \pm 1,1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Onder de hoog nitraat behandeling stijgt het eiwitgehalte van  $69,2 \pm 6,9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  naar  $167,1 \pm 7,9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Er was een significant verschil in eiwitgehalte tussen behandelingen (ANOVA,  $p < 0.000$ ). Post-hoc Tukey testen laten zien dat elke behandeling significant verschilt van elke andere behandeling ( $P < 0,000$  voor alle vergelijkingen).



Figuur 8: Eiwitgehalte van *U. lactuca* per behandeling (Initieel & Starvation  $n=3$ , Laag nitraat ( $0,2 \mu\text{M/L}$ ) & Hoog nitraat ( $98,1 \mu\text{M/L}$ )  $n=16$ ) gemeten met de Dumas methode  $\pm$  standaarddeviatie.

### 4.3 Aminoszuren

In Tabel 3 zijn de gemeten aminoszuur gehalten van *U. lactuca* weergegeven. Isoleucine, leucine, fenylalanine, valine, alanine, asparaginezuur/ asparagine, glycine, proline en serine gehalten nemen af onder omstandigheden met weinig nitraat (*starvation phase*) en nog meer onder langdurige omstandigheden met weinig nitraat (lage nitraat concentratie). Tryptofaan gehalten nemen ook af onder omstandigheden met weinig nitraat en nog meer onder langdurige omstandigheden met weinig nitraat, onder de hoge nitraat concentratie neemt het tryptofaan gehalte weer toe maar komt niet boven de initiële waarde uit. De tyrosine en methioninegehalten dalen onder lage nitraatomstandigheden en dalen nog meer onder langdurig lage nitraatomstandigheden. Onder de hoge nitraat concentratie is het gehalte gedaald met een factor 2 ten opzichte van het initiële gehalte. Arginine neemt af onder omstandigheden met weinig nitraat, en langdurige omstandigheden met weinig nitraat en stijgt met een factor 2.4 in vergelijking met initieel onder de hoge nitraat omstandigheid.

Glutaminezuur/ glutamine neemt af onder omstandigheden met weinig nitraat en zelfs nog meer onder langdurige omstandigheden met weinig nitraat en stijgt met factor 1.5 onder de hoge nitraat concentratie in vergelijking met het initiële niveau. In verhouding tot het totale aminoszuur gehalte is het glutaminezuur/ glutamine gehalte het hoogst. Naast glutamine en glutaminezuur zijn de grootste verschuivingen in aminoszuren als gevolg van de hoge nitraat concentratie te zien in arginine met een toename van 2.2, in methionine dat met een factor 2 daalde onder de hoge nitraat concentratie in vergelijking met het initiële gehalte en tyrosine met een afname van meer dan 2.4 vergeleken met het initiële gehalte.

Tussen de initiële, de *starvation phase*, de lage nitraat concentratie en de hoge nitraat concentratie zijn verschuivingen in aminoszuren waarneembaar. Er is een verschuiving van essentiële aminoszuren (EAA) naar niet-essentiële aminoszuren onder de hoge nitraat concentratie, vooral richting glutamine en glutaminezuur. Het totale aminoszuur gehalte varieerde van 24,4 mg g<sup>-1</sup> tot 116.8 mg g<sup>-1</sup> op basis van drooggewicht onder de lage nitraat concentratie. Onder de hoge nitraat concentratie is het totale aminoszuur gehalte hoger vergeleken met de lage nitraat concentratie en zeewier na de *starvation phase*. De totale aminoszuurconcentratie is hoger na de *starvation phase* in vergelijking tot het zeewier dat zich onder langdurige lage nitraat concentraties heeft bevonden.

Tabel 3: Essentiële aminozuren en niet-essentiële samenstelling van *U. lactuca* per behandeling op basis van drooggewicht weergegeven als initieel ( $n = 3$ ), na de starvation phase ( $n = 3$ ) en na 13 dagen blootstelling aan een lage nitraat concentratie ( $0.2 \mu\text{M}$ ) of een hoge nitraat concentratie ( $98.0 \mu\text{M}$ ) (beide  $n = 16$ ).

Essentiële Aminozuren	Initieel		Starvation		Lage nitraat concentratie		Hoge nitraat concentratie	
	mg · g <sup>-1</sup>	% TAA	mg · g <sup>-1</sup>	% TAA	mg · g <sup>-1</sup>	% TAA	mg · g <sup>-1</sup>	% TAA
Arginine	0.9 ± 0.1	9.6 ± 0	0.9 ± 0.6	1.4 ± 0.8	0.8 ± 0.5	2.5 ± 1.5	2.2 ± 0.6	2.1 ± 0.5
Histidine	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD	BD
Isoleucine	7.8 ± 0.6	7.1 ± 0.1	4.8 ± 0.5	7.2 ± 0.3	1.7 ± 0.5	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.6	5.3 ± 0.4
Leucine	10.3 ± 1	9.4 ± 0.3	5.7 ± 1.6	8.5 ± 2.3	2.8 ± 0.9	9 ± 0.2	8 ± 0.6	7.8 ± 0.2
Lysine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Methionine	1 ± 0.3	1 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.5	1.3 ± 1	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.4
Fenylalanine	5.6 ± 0.4	5.1 ± 0	2.7 ± 1	4 ± 1.7	1.9 ± 0.7	6.3 ± 0.1	4.6 ± 0.4	4.5 ± 0.2
Threonine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tryptofaan	13.2 ± 0.9	12.1 ± 0	8.3 ± 1.6	12.3 ± 1.3	3.4 ± 1.1	10.9 ± 0.4	10.4 ± 0.8	10.2 ± 0.3
Valine	9 ± 0.7	8.2 ± 0.1	5 ± 0.6	7.4 ± 0.6	2.4 ± 0.8	7.8 ± 0.2	8 ± 0.6	7.8 ± 0.4
<b>Niet Essentiële Aminozuren</b>								
Alanine	10.5 ± 0.7	9.6 ± 0	7 ± 0.9	10.3 ± 0.3	3 ± 1.1	9.7 ± 0.3	9.3 ± 1	9.1 ± 0.9
Asparaginezuur acid / asparagine	15 ± 1.1	13.7 ± 0	9.7 ± 1.7	14.3 ± 1.2	4.2 ± 1.4	13.6 ± 0.4	14.3 ± 1.3	14 ± 0.7
Cysteïne	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glutaminezuur / glutamine	16.9 ± 0.9	15.4 ± 0.2	10.4 ± 2.1	15.4 ± 1.7	4.5 ± 1.5	14.5 ± 0.5	24.7 ± 1.7	24.2 ± 0.9
Glycine	7.3 ± 0.6	6.7 ± 0.1	4.7 ± 0.7	7 ± 0.4	2 ± 0.6	6.7 ± 0.3	6.3 ± 0.4	6.2 ± 0.4
Proline	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Serine	7.7 ± 0.7	7 ± 0.2	5 ± 0.9	7.4 ± 0.6	2.4 ± 0.7	7.7 ± 0.3	6.3 ± 0.4	6.1 ± 0.2
Tyrosine	4.4 ± 0.3	4 ± 0	2.8 ± 0.3	4.1 ± 0.3	1.4 ± 0.6	4.5 ± 0.3	2.1 ± 0.5	2.1 ± 0.4
	mg · g <sup>-1</sup>	%	mg · g <sup>-1</sup>	%	mg · g <sup>-1</sup>	%	mg · g <sup>-1</sup>	%
<b>Totaal N * 4.97</b>	111.6 ± 13.8	11.2 ± 1.4	69.2 ± 6.9	6.9 ± 0.7	29.1 ± 1.1	2.9 ± 0.1	167.1 ± 7.9	16.7 ± 0.8
<b>Totaal Aminozuren (AA)</b>	109.7 ± 7.6	100 ± 0	67.3 ± 8.2	100 ± 0	31 ± 10.6	100 ± 0	101.9 ± 6.7	100 ± 0
<b>Totaal Essentiële Aminozuren (EAA)</b>	47.8 ± 3.2	34.8 ± 0.1	27.8 ± 3.8	32 ± 4.8	13.4 ± 4.7	34.4 ± 0.8	39 ± 2.9	28 ± 0.5
<b>EAA/AA (%)</b>	43.6 ± 0.1	43.6 ± 0.1	41.5 ± 4.3	41.5 ± 4.3	43.3 ± 1.3	43.3 ± 1.3	38.3 ± 0.6	38.3 ± 0.6

## 5. Discussie

### 5.1 *Saccharina*

Het effect van nitraatconcentratie en stroomsnelheid op de groeisnelheid en de eiwitgehalte is niet statisch getest. Alle behandelingen met een hoog nitraatgehalte hebben echter een groter drooggewicht en een hoger eiwitgehalte. Dit effect lijkt versterkt te worden door een hoge stroomsnelheid. Bij een lage en medium stroomsnelheid is ook de oppervlakte groter van de hoge nitraatconcentratie behandelingen, maar bij een hoge stroomsnelheid is dat andersom. Het lijkt erop dat een hoge nitraatconcentratie leidt tot meer groei en een hoger eiwitgehalte en dat dit effect verder versterkt wordt door een hogere stroomsnelheid. Een experiment met meer replica's moet hier uitsluitsel over geven.

Het effect van stroming is mogelijk te verklaren door een hogere verversing van het water om het zeewier heen en zo wellicht een hoger nutriënten aanbod. De stroomsnelheid bepaald daarnaast de dikte van de diffusiegrenslaag rond het zeewieroppervlak en dus de beweging van gassen en ionen naar het zeewieroppervlak en daarmee de opname mogelijkheid van voedingstoffen (Wheeler, 1988; Hurd, 2000). De dikte van de diffusiegrenslaag (stilstaand water rondom het zeewier) zou dus af kunnen nemen bij een hogere stroomsnelheid. Hierdoor is het opnemen van nutriënten makkelijker en dit zou kunnen leiden tot meer groei en een hoger eiwitgehalte.

Opvallend is het grote oppervlak van *Saccharina* bij de lage nutriënt concentratie en hogere stroomsnelheid. Opname van voedingstoffen gebeurt via het oppervlak van het zeewier, een strategie voor meer nutriëntopname zou daarom kunnen zijn om het oppervlak te vergroten.

### 5.2 *Ulva*

Beide behandelingen leidden tot groei van *Ulva*. Bij de hoge nitraatconcentratie leidde dit tot een toename van het eiwitgehalte. Een hoge nitraatconcentratie leidt dus tot meer zeewier met een hoger eiwitgehalte. Bij een lage nitraatconcentratie was er een significante afname van het eiwitgehalte. Dit zou verklaart kunnen door de groei. Omdat het oppervlak van *Ulva* groter is geworden en er weinig nieuw eiwit aangemaakt kon worden, zou het kunnen dat de bestaande hoeveelheid eiwit verdund is. De waargenomen eiwitgehaltes (Tabel 5) van *Ulva* zijn vergelijkbaar met de waardes uit Lourenco (2002) en Shuuluka (2013).

Tabel 2: Eiwitgehaltes (% van drooggewicht) van *Ulva* gevonden in literatuur met conversiefactor van 4.97 en 5.65 specifiek voor *Ulva lactuca*, andere *Ulva* soorten 5.45 en verkregen waardes van *Ulva* onder hoge nitraat concentraties in het ZEEVIVO onderzoek.

Referentie	Species	N content	Eiwitgehalte (N*4.97)	Eiwitgehalte (N*5.65)
Lourenco, 2002	<i>U. fasciata</i>	2.46	12.23%	13.41%
Msuya, 2008	<i>U. lactuca</i>	5.32 – 6.24	26.41% - 31%	30.06% – 35.26%
Shuuluka, 2013	<i>U. lactuca</i>	2.9	14.41%	16.39%
ZEEVIVO	<i>U. lactuca</i>	3.4	16.71%	18.33

## Totaal stikstof - totaal aminozuren gehalte onder hoge nitraatconcentratie

In tabel 3 is te zien dat er geen groot verschil was tussen totaal eiwit gebaseerd op totaal stikstof en op basis van aminozuurbepaling bij het initiële zeewier, het zeewier na *starvation* en zeewier onder de lage nitraat concentratie. Onder hoge nitraat concentraties is er wel een duidelijk verschil. Het eiwitgehalte op basis van totaal stikstof is hoger ( $167.1 \pm 7.9$  mg eiwit/g) dan het eiwitgehalte op basis van de totale aminozuren ( $101.9 \pm 6.7$  mg eiwit/g). Dit zou verklaard kunnen worden doordat de aminozuren cysteine, lysine, proline and threonine niet zijn gemeten en zo een deel van het eiwit gemist wordt. Het is echter onwaarschijnlijk dat geheel te wijten valt aan de niet gemeten aminozuren. Als de totale aminozuur profielen van *Ulva sp.* uit drie artikelen met elkaar worden vergeleken (Ortiz et al. 2006; Shuuluka, Bolton, and Anderson 2013; Wong and Cheung 2000) blijkt dat cysteine, lysine, proline and threonine een procentueel aandeel hebben van respectievelijk (gemiddelde  $\pm$  standaarddeviatie.)  $0,7 \pm 0,7$ ,  $5,2 \pm 1,7$ ,  $3,9 \pm 2,3$ ,  $5,6 \pm 1,7$ . Als je deze percentages bij elkaar op telt zou dat betekenen dat er een afwijking van grofweg 15,5 % mogelijk zou zijn.  $102$  mg/g (AA) en  $167$  mg/g ( $N \times 4.97$ ) is echter een verschil van 61%.

Naast dit verschil is er waarschijnlijk ook sprake van luxe opname en dat stikstof wordt opgeslagen in een stikstof bevattend onderdeel van de cellen zoals Angell (2014) ook beschrijft voor *Ulva ohnoi*. Als we het totale stikstof gehalte uit onze studie ( $3.36 \pm 15\%$ ) vergelijken met de studie van Angell (2014) naar de variatie in aminozuurgehalte en het verband met stikstofgehalte en groeisnelheid in *Ulva ohnoi*, valt dit binnen de luxe opname 2.6% - 4.2% categorie. Angell, et al. (2014) observeerden ook dat er met een intern N-gehalte tussen de 2.6% - 4.2% er een toename van glutaminezuur/glutamine en arginine was in *U. ohnoi*. Glutamine is een aminozuur dat belangrijk is voor de energielevering aan het verteringsstelsel en het immuunsysteem en daarnaast ook wordt geassocieerd met de typische umami-smaak, wellicht kan dit voor bepaalde toepassingen in voeding of medicijnen als gunstig worden ervaren.

## Bacteriële infectie

Van dag 5 tot dag 7 van het experiment werd het water van de hoge nitraat concentraties troebel. Het water is vervolgens onderzocht onder een microscoop om te controleren op gametofyten. Er bleek echter sprake van een bacteriële infectie, mogelijk veroorzaakt door verontreiniging tijdens de voorbereidingsfase van het experiment. Na het vervangen van de waterbron was er geen troebelheid meer te vinden. Vanaf dag 10 begon *Ulva* in de hoge nitraat concentratie te degraderen en deels te verbleken, waarna een controle van de fotosynthese is gedaan. Hieruit bleek dat de fv/fm waardes gedaald waren maar nog niet ontoereikend waren, dus is het experiment alsnog doorgezet. Op basis van literatuur (Lubsch & Timmermans, 2018) is ervoor gekozen het experiment 14 dagen te laten duren omdat er naar verwachting dan verschil merkbaar zou moeten zijn. Echter is het experiment op dag 13 afgebroken in verband met de dalende kwaliteit. Desondanks, bleek er op dag 13 al een duidelijk verschil waarneembaar tussen de behandelingen en is er meer eiwit geproduceerd dan werd verwacht. Een verrijking van eiwit arm *U. lactuca* is mogelijk binnen 13 dagen.

## 6. Aanbevelingen

### Biomassa - medium verhoudingen

In aanloop naar de onderzoeken beschreven in dit rapport zijn er veel vooronderzoeken gedaan. Uit deze vooronderzoeken kwam onder andere naar voren dat de methode van eiwit bepaling en de medium-biomassa verhouding erg belangrijk is. Uit een vooronderzoek dat uitgevoerd is bij het Zeewiercentrum op Texel kwam naar voren dat er bij beide soorten *Ulva* en *Saccharina* in tank cultuur er een toename te zien in het totaal geproduceerde eiwit. Echter is dit niet te verbinden met een specifieke concentratie door een opbouw van nitraat en fosfaat gedurende de experimenten (er werden constant nutriënten gedoseerd, onafhankelijk van de concentratie). Doordat dit vooronderzoek in de buitenlucht is uitgevoerd zijn er mogelijk ook invloeden geweest van niet constante temperatuur en licht intensiteit waar rekening mee gehouden moet worden. Wel kon geconcludeerd worden dat er bij een opbouwend nitraat- en fosfaatgehalte er een punt lijkt te zijn waar het eiwitgehalte groeit en het gewicht daalt. Hierdoor ontstaat er alsnog verlies van de hoeveelheid te oogsten eiwit.

Tijdens een experiment is het heel belangrijk om de te testen nutriëntconcentraties zo stabiel mogelijk te houden. Dat wil zeggen dat als een bepaalde concentratie getest beoogt te worden, het heel belangrijk is dat er voldoende nutriënten beschikbaar zijn en er niet sprake kan zijn van opbouw of limitatie. Dit staat in verband met de hoeveelheid biomassa en medium maar vooral ook de opnamesnelheden van de zeewieren. De publicatie van Lubsch en Timmermans (2018) over opname kinetiek is heel belangrijk geweest bij het vinden van een juiste experimentele opzet, die zorgt voor zo stabiel mogelijke concentraties van nutriënten in het medium en binnen welke tijd er verversst dient te worden of nutriënten bij gedoseerd moeten worden. Om de juiste biomassa-medium verhouding voor de uiteindelijke onderzoeksopzet te bewerkstelligen zijn er nog andere vooronderzoeken gedaan die de opname snelheden van Lubsch en Timmermans (2018) in acht namen gedaan.

### Stikstofbron

Uit de eerste vooronderzoeken met *Ulva* in het laboratorium kwam naar voren dat er meer groei leek te zijn onder de gebruikte hogere nitraat concentraties (10 en 50  $\mu\text{Mol/L}$ ) en meer eiwit wanneer ammonium gebruikt werd in dezelfde hogere concentratie in vergelijking tot de lage concentraties van de stikstofbron (0 en 5  $\mu\text{Mol/L}$ ). Echter bleek uit deze studies ook dat de opname snelheid voor beide stikstofbronnen sneller dan verwacht was er daardoor waarschijnlijk limitatie is opgetreden. Er zou daarom vaker verversst moeten worden zodat de concentraties op peil blijven. Uit vooronderzoek met *Ulva* en *Saccharina bleken* ammonium concentraties lastiger te meten en minder betrouwbaar en omdat het zeewier met nitraat als stikstofbron niet dusdanig anders reageerde, is er gekozen om verder te gaan met nitraat als stikstofbron in de vervolgonderzoeken.

### Vertaalslag naar de praktijk

Door zeewier in een omgeving te plaatsen waar van nature meer nitraat aanwezig is, kan het een meer waardevol product worden voor de diervoeding- en voedselindustrie op basis van eiwitten en aminozuren. Ook de waterstroomsnelheid is hierbij van belang omdat deze de diffusie snelheid en daarmee de opname snelheid van nutriënten bepaald. Een constante hoge nitraat concentratie en voldoende hoge waterstroomsnelheid zorgt voor zeewier met een hoger



eiwitgehalte. De gebruikte hogere concentraties in dit experiment voor *Ulva* en *Saccharina* zijn respectievelijk 98.1  $\mu\text{Mol/l}$  en 110.7  $\mu\text{Mol/l}$  wat het zelfde is als 6.1 mg/l en 6.9 mg/l nitraat. In het laatste rapport van het RIVM (Fraters et al. 2017) wordt vermeld dat op 50% van de gemeten locaties de nitraat concentraties in de wateren potentieel-eutroof zijn en 43% eutroof. In het overgrote deel van de Nederlandse overgangswateren ligt het nitraat gehalte dus heel hoog dat wil zeggen tussen de 5 en 25 mg/l, op meer dan de helft van de meetlocaties is de waarde hoger dan 10 mg/l. In de kustwateren zijn op ongeveer 20% van de meetlocaties de waardes hoog tussen de 2 en 5 mg/l.

Wellicht kan hier gebruik van worden gemaakt bij de kweek van zeewier. Een hoogwaardiger product kan verkregen worden en tegelijkertijd zou het kunnen zorgen voor betere waterwaarden volgens de kaderlichtlijn water. *Saccharina*, zou in de kust wateren geplaatst kunnen worden en *Ulva* is wellicht meer geschikt in de overgangswateren omdat het een soort is die een grote saliniteitstolerantie heeft.

## 7. Conclusie

Hogere nitraatconcentraties zorgden bij beide zeewiersoorten voor een hogere groeisnelheid en een hogere eiwitgehalte. De totale aminozuurhoeveelheid van *Ulva lactuca* was hoger bij blootstelling aan een hogere nitraatconcentratie. Een hoge stroomsnelheid lijkt bij *Saccharina* het effect van een hoge nitraatconcentratie te versterken. Bij *Ulva* is dit niet getest. Alle gemeten aminozuurgehaltenes van *Ulva* gekweekt onder hoge nitraatconcentraties waren hoger, behalve die van methionine, die gelijk was ten opzichte van de *Ulva lactuca* die gekweekt werd onder lage nitraatconcentraties. Het is dus mogelijk om tijdens het groeiproces, de aminozuur- en eiwitgehalte van zeewier te verhogen. De toename in eiwitgehalte was zelfs zo snel, dat het mogelijk is om zeewier te verrijken door het twee weken voor de oogst onder verhoogde nitraatconcentraties te laten groeien. De Nederlandse overgangs en kustwateren zijn wat betreft hun hoge nitraatconcentraties geschikt voor het kweken van eiwitrijk zeewier.

## 8. Dankwoord

Graag bedank ik Koen van Ipenburg, Felix Zundel, Marijn Maat, Ailynn Swiers en Felix Ijpelaar voor hun inzet als stagiair tijdens het project. Ik wil Reinier Nauta en Alexander Ebbing bedanken voor hun adviezen en het beschikbaar stellen van materiaal. Ook alle andere medewerkers van het NIOZ bedank ik graag voor het mogelijk maken van onderzoek op de locatie Yerseke. In het bijzonder Klaas Timmermans, zonder Klaas was dit allemaal niet mogelijk geweest. Ook wil ik graag mijn collega's Alwin Hylkema en Tom Wijers bedanken voor de prettige samenwerking. Dit onderzoek is medegefinancierd door Regieorgaan SIA, onderdeel van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO).

## 9. Bibliografie

- Angell, A. R., Angell, S. F., de Nys, R., & Paul, N. A. (2016). Seaweed as a protein source for mono-gastric livestock. *Trends in Food Science and Technology*.
- Angell, A. R., Mata, L., de Nys, R., & Paul, A. N. (2015). The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. *Journal of Applied Phycology*.
- Angell, A., Mata, L., de Nys, R., & Nicholas, P. (2014). *Variation in amino acid content and its relationship to nitrogen content and growth rate in Ulva ohnoi (Chlorophyta)*. Journal of Phycology.
- Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P., Fischer, A. R., van Boekel, M. A., . . . Hendriks, W. H. (2012). *The future supply of animal-derived protein for human consumption*. Trends Food Sci. Technol.
- Bonnal, L., Boissie, G., Cacot, P., Geoffroy, T., & Bastianelli, D. (2013). Etalonnage de la mesure de l'azote total dans les ulves (*Ulva* sp.) par SPIR. *SPIR 2013 conference*. Helio SPIR.
- Fraters, B., A. E. J. Hooijboer, A. Vrijhoef, A. C. C. Plette, N. Duijnhoven, van, M. Gosseling, C. H. G. Daatselaar, J. L. Roskam, and H. A. L. Begeman. 2017. *De Zorg Voor Morgen Begint Vandaag*. www.rivm.nl (December 14, 2020).
- Fujita, R. M. (1985). The role of nitrogen status in regulating transient ammonium uptake and nitrogen storage by macroalgae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*(92), 283-301.
- Hurd, C. L. (2000). Water motion, marine macroalgal physiology, and production. *J. Phycol*, 36, 453-72.
- Leal, A. L. G., de Castro, P. F., de Lima, J. P. V., de Souza Correia, E., & de Souza Bezerra, R. (2010). Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. *Aquaculture International*, 18(4), 635–646. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9284-0>
- Lourenco, S. O., Barbarino, E., De-Paula, J. C., Pereira, L. S., & Lanfer Marquez, U. M. (2002). Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, 50, 233-241.
- Lubsch, A., & Timmermans, K. (2018). *Uptake kinetics and storage capacity of dissolved inorganic phosphorus and corresponding N:P dynamics in Ulva lactuca (Chlorophyta)*. Journal of Phycology.
- Marinho, G. S., Holdt, S. L., & Angelidaki, I. (2015). *Seasonal variations in the amino acid profile and protein nutritional value of Saccharina latissima cultivated in a commercial IMTA system*. Dordrecht: Springer Science & Business Media.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F., & Morgan, C. A. (2002). *Animal Nutrition*. Essex: Pearson Education.
- Msuya, F. E., & Neori, A. (2008). Effect of water aeration and nutrient load level on biomass yield, N uptake and protein content of the seaweed *Ulva lactuca* cultured in seawater tanks. *Journal of Applied Phycology*.

- Novak, J. (2018). *Image*. Consulté le 06 26, 2018, sur BioLibz.cz: <https://www.biolib.cz/en/image/id7080/>
- Ortiz, J., Romero, N., Robert, P., Araya, J., Lopez-Hernández, J., Bozzo, C., ... Rios, A. (2006). Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chemistry*, 99(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.07.027>
- Pedersen, M. F. (1994). TRANSIENT AMMONIUM UPTAKE IN THE MACROALGA *ULVA LACTUCA* (CHLOROPHYTA): NATURE, REGULATION, AND THE CONSEQUENCES FOR CHOICE OF MEASURING TECHNIQUE. *Journal of Phycology*, 30(6), 980-986.
- Santiago, C. B., & Lovell, R. T. (1988). Amino acid requirements for growth of Nile tilapia. *Journal of Nutrition*, 118(12), 1540–1546. <https://doi.org/10.1093/jn/118.12.1540>
- Shuuluka, D., Bolton, J. J., & Anderson, R. J. (2013). Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural in South Africa. *Journal of Applied Phycology*, 677-685.
- Steen Booher, J. (2018). *Seaweed experiment*. Retrieved 06 26, 2018, from Jennifer Steen Booher: <http://jenniferbooher.com/wp/>
- Walker, P., Derksen, H., Hylkema, A., Timmermans, K., Schipper, J., Schram, E., & Vos, D. (2014). *RAAK-PRO ZEEVIVO Zeewier in visvoer*.
- Wheeler, W. (1988). Algal productivity and hydrodynamics a synthesis. *Pro. Phycol*, 6, 23-58.
- Wong, K. H., & Cheung, P. C. K. (2000). Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part I - Proximate composition, amino acid profiles and some physico-chemical properties. *Food Chemistry*, 71(4), 475–482. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00175-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00175-8)

## Bijlage I Overzicht verschillen in experimentele opzet

Methoden		
Species	<i>Ulva lactuca</i>	<i>Saccharina latissima</i>
Data experimenten	24-8-17 tot 18-9-17	okt-17 tot feb-18
Experiment duur (dagen)	13	4 maanden
Concentraties N ( $\mu\text{M/L}$ )	Laag (0.2), hoog (98.1)	Laag (40.1), hoog (110.7)
Concentraties P ( $\mu\text{M/L}$ )	3	Laag (1.7), hoog (7.3)
Samples	Discs	Sporofyten
Herkomst sample	Seaweed centre	NIOZ
Sample grote (n)	16 per regime: 32 totaal	3
Days of starvation	13	0
Containers	200ml glazen potten	Flume systeem
Volume	100ml	Flume tank
Saliniteit (‰)	29.2	29
Temperatuur ( $^{\circ}\text{C}$ )	12.1 $\pm$ 0.7	12
Licht/donker tijd	16, 8	12, 12
Licht intensiteit	134 $\pm$ 37 ( $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	100 ( $\mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )
Water verversingen	elke 6u (1e 4d), elke 24u	Om de 7 dagen
Nutrienten pulse	Elke 6u (1e 4d), elke 24u	Om de 7 dagen
gewichtsmetingen	Aan einde experiment	Aan einde experiment
Lengte/oppervlakte metingen	Om de dag	Aan einde experiment
Protein measured	Initieel, Uithongering en einde	Aan einde experiment
Protein analyse method	Dumas CHN (N*4.97)	Dumas CHN (N*4.97)
Aminozuur bepaling	HPLC	x

## Bijlage II Protocol for growth analysis using ImageJ v1.51

First before using the program, make sure that you are using clear and sharp pictures for the analysis. Besides the clear and sharp pictures, it is important to standardize your setup to make sure you get the same light with every measurement. And there must be a ruler off some kind on the picture to make sure you can set the scale.

1. Open the opensource program ImageJ v1.51.
2. Open the picture you want to analyse.
3. Use the rectangular selection tool and select the area you want to measure. Make sure that you include the ruler in your selection.
4. Adjust the type of picture, so you can adjust the threshold; Image > Type > 8-Bit. This step will convert your picture in a greyscale picture.
5. Now the scale has to be set. Use the straight selection tool and select one centimetre on the ruler. Now go to analyse > set scale. Now fill in 1.0 in the box 'Known distance' and press OK.
6. Now make two duplicates of your selected picture by pressing 'Ctrl + Shift + D' twice.

The first steps of this protocol were the fundament the measurement. In the next steps there is an explanation how to properly use the threshold. Often there are a lot of holes or double layers on *Ulva*, these influence your measurements and should be considered in the analysis.

7. To select the area you want to measure go to Image > Adjust > Threshold. Set the top bar on '0' and slide the lower bar to the left, stop sliding when the whole surface area of the *Ulva* is red. Now press Apply.
8. To measure the surface area of the *Ulva*. Select the *Ulva* with the rectangular selection tool. Go to Analyse > Analyse particles. Now make sure that the settings are just like in figure 1. When the settings are correct press OK. Two windows should pop up. One with the results and one with the outlines. In the window with the outlines, you are able the control which numbers in the results window are the surface area of the measurement. Save the results and write down the surface area of the *Ulva*.
9. Click on one of your duplicates to exclude the holes from the surface area you just measured. Select Threshold just like you did in step 7. Set the lower bar on '0' and slide the top bar from 255 when the holes are red, stop and press Apply.
10. The surface area of the holes now needs to be calculated. Select the holes you want to measure with the free shape selection tool. Make sure you do not include any black particles that are not holes in the *Ulva* this could influence your measurement (you can check this by checking the original picture). Now go to Analyse Particles just like in step 8. Save your results and write them down as 'holes'.
11. Click on your last duplicate to include the double or even triple layers of the *Ulva*. Select Threshold again just like in step 7 and 9. Now we need to select only double or triple layers. So, slide the top bar all the way to the left (0) and adjust the lower bar until the double or triple layers are red. Now press Apply.
12. The surface area of the double or triple layers now needs to be calculated. Select the double and triple layers you want to measure with the free shape selection tool, make sure you do not select any other black particles. Now go to Analyse Particles just like in step 8 and 10. Save your results and write them down as double or triple layers, you can check which one is a double or triple layer(s) in your outlines window. Write down which surface area is a double and which one is a triple layer.
13. Subtract the results from step 10 (the holes) from the results from step 8 (the total surface area). The outcome is your surface area without the holes.
14. The double and triple layers need to be add up to the outcome of step 13. The double layers get added up once and the triple layers get add up twice. The result is the absolute surface area of the *Ulva* sample you analysed.

## Bijlage IV Gebruikte software en apparatuur

Voor een goed gemixte water kolom in de potjes gebruikt bij het *Ulva* experiment werd een schudtafel gebruikt, INFORS AG CH-4103 Bottmingen, 100 rpm.

De nutriënt warden zijn geanalyseerd door het Koninklijk NIOZ, Yerseke, gebruikmakend van een high performance microflow analyser, quAAtro continuous flow analyser (Jodo Tokyo Kyuei et al., 1992; NIOZ, 2015) (Detection limits in  $\mu\text{mol/l}$ :  $\text{PO}_4$  ( $\mu\text{M}$ ) 0.03,  $\text{NH}_4$  ( $\mu\text{M}$ ) 0.05,  $\text{NO}_x$  ( $\mu\text{M}$ ) 0.03,  $\text{NO}_2$  ( $\mu\text{M}$ ) 0.01,  $\text{NO}_x\text{-NO}_2\text{=NO}_3 = 0,01$ ).

Tijdens het experiment werd de fotosynthese (via Fv / Fm-metingen) gemeten met behulp van een chlorofylfluorometer Walz mini-pam, Duitsland.

Voor de groei bepalingen van *Ulva* werd gebruik gemaakt van een fotocamera Panasonic Lumix DMC-FT5, foto resolutie 4608 x 3456 op een statief (afstand lens-substraat was 47 cm). Het zeewier werd bedekt met een doorzichtig transparant vel plastic om het oppervlak vlak te maken. Het oppervlak werd bepaald door analyse van de afbeeldingen met behulp van ImageJ 1.49v-software (ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Maryland, VS).

Het zeewier werd gehomogeniseerd in een roestvrijstalen buis van 2 ml met een metalen maalbal ( $\varnothing$  2 mm) in een mengmolen (Retch MM400) op 30 Hz.

Het totale stikstofgehalte werd bepaald met de DUMAS-methode met een organische elementanalysator (Thermo Scientific, Interscience, Flash 2000 Element Analyzer).

De aminozuren in *Ulva* werden geanalyseerd met behulp van een High Performance Liquid Chromatography (HPLC) systeem (Dionex P580 Series pump, Thermo Electron Corporation SpectraSYSTEM AS3000 autosampler and column oven, fitted with a Waters Column (WAT086344 serial no. 119331 18043862)) en een florescence detector (Jasco FP-2020 plus intelligent Fluorescence Detector).