

800-184  
U-184  
2006

# INFORME FINAL

## PROYECTO FONTEC

### “EVALUACION DE UN VEHÍCULO DE ORIGEN LIPIDICO PARA ADICIONAR EL PIGMENTO ASTAXANTINA EN LA DIETA DE SALMONIDEOS”

EMPRESA BENEFICIARIA  
ENTIDAD EJECUTORA  
CÓDIGO PROYECTO

QUIMICA SPES S.A.  
QUIMICA SPES S.A.  
203-3566

ABRIL 2006

## **I. RESUMEN EJECUTIVO**

### **Objetivos generales**

El presente proyecto tiene por objeto: **“La evaluación de un vehículo de origen lipídico para adicionar el pigmento Astaxantina en la dieta de salmonideos”**.

Se busca determinar si la adición del pigmento Astaxantina, a través de un vehículo de origen lipídico (CARRIER) en las dietas de salmones (*Oncorhynchus mikyss*):

1. Es aplicable en pigmentos naturales y sintéticos
2. Es aplicable en pigmentos insolubles o solubles en agua
3. Es inocua y palatable.
4. Es eficiente en la disolución del pigmento.
5. Permite una adición post-extrusión.
6. Mejora la estabilidad del pigmento.
7. Mejora la estabilidad del alimento extruido.
8. Mejora el color de la carne del salmón
9. Aumenta el porcentaje de retención de pigmento en el musculo.

### **Objetivos específicos e indicadores de éxito**

#### **1.- Preparación del vehículo**

Esta etapa correspondiente a la numero 1 del proyecto, se efectuó en instalaciones experimentales de Química Industrial Spes y consistió en formular un producto inocuo y palatable, capaz de solubilizar pigmentos utilizados en la industria en la preparación de alimentos de salmonideos.

Indicador de éxito:

El objetivo de esta etapa es lograr que el producto diseñado sea capaz de solubilizar todos aquellos pigmentos sintéticos utilizados mayoritariamente por la industria de alimento de salmonídeos.

## **2.- Pruebas de laboratorio**

Estas pruebas correspondientes a la etapa 2 del proyecto se efectuaron en estanques con agua dulce/mar del centro experimental Aquatic Health. Se evaluó en el ámbito de escala experimental y bajo condiciones controladas la eficacia e inocuidad del CARRIER.

Indicador de éxito:

Los objetivos de esta prueba son demostrar la inocuidad y palatabilidad del vehículo lipídico, así como tener la base de conocimiento sobre el producto, para efectuar modificaciones sobre el (etapa 4 del estudio) para la realización de una segunda prueba bajo condiciones productivas a nivel piloto en agua de mar (etapa 5 del estudio).

## **3.- Estabilidad del alimento**

Estas pruebas correspondientes a la etapa 3 del proyecto se efectuaron en los laboratorios de la Universidad de Santiago.

Indicador de éxito:

El objetivo es verificar las características del alimento fabricado para la etapa 2 del proyecto, así como su estabilidad en el tiempo.

## **4.- Modificaciones al Carrier**

Estas pruebas correspondientes a la etapa 4 del proyecto se efectuaron en los laboratorios de Química Industrial Spes.

### Indicador de éxito

El objetivo es ampliar y modificar la formulación del vehículo lipídico para lograr la solubilización de pigmentos no solo sintéticos, sino también naturales, basado en los resultados obtenidos en las etapas 2 y 3 del ensayo.

### **5.- Pruebas piloto**

Esta prueba correspondiente a la etapa 5 del proyecto, se efectuó en jaulas experimentales con agua de mar, de la empresa EWOS INNOVATION.

### Indicador de éxito:

En esta prueba se probará en condiciones de producción a nivel industrial, la factibilidad de fabricación de alimento con adición de CARRIER en etapa de aceitado (post-extrusión), su inocuidad, palatabilidad y capacidad de pigmentación, así como la estabilidad del alimento producido en estas condiciones.

## II.-ACTIVIDADES DESARROLLADAS

### ETAPA 1: PREPARACION DEL VEHICULO LIPÍDICO

El producto CARRIER, fue preparado exitosamente en el laboratorio de Química Industrial Spes, en una cantidad de 200 kilos para ser utilizados en la etapa 2.

Se pudo comprobar la su capacidad de disolución que presenta el CARRIER para Astaxantinas sintéticas, tanto solubles como insolubles en agua.

En esta etapa se privilegió la formulación de un CARRIER para disolución de Astaxantinas de origen sintético, dado su mayoritario empleo en las dietas salmonídeos en la industria chilena.

La formulación de un CARRIER, apropiado para la disolución de Astaxantinas tanto de origen sintético como natural, se planteó como objetivo específico para la etapa número 4 de este proyecto, de modificaciones al CARRIER.

Es el objetivo de este estudio formular un producto tal , que sea capaz de solubilizar la molécula de astaxantina, para facilitar su homogenización en el resto del alimento y su transporte al musculo de la carne del salmón.

Ya que la dieta de salmonídeos, esta compuesta por un porcentaje muy elevado de aceite de pescado y/o vegetal, y por otros diversos componentes sólidos, en los que el pigmento no presenta solubilidad alguna, es de interés además que el producto de la solubilización entre CARRIER y Astaxantina, sea soluble en el único componente líquido de la dieta, vale decir la fracción oleosa del alimento. .

La formulación desarrollada para el CARRIER, es tal que permite que la molécula de astaxantina sea soluble en la fracción oleosa del alimento, lo que posibilita la adición del pigmento en la etapa final del aceitado del alimento.

De esta manera, se estaría evitando la incorporación del pigmento en la etapa de pre-extrusión que destruye parcialmente al pigmento, por la acción de la temperatura propia de este proceso.

La molécula de CARRIER esta compuesta por dos terminales, uno de carácter polar y el otro no-polar, cuyo conjunto actúa como puente para la solubilización de la Astaxantina y el aceite.

En el proceso de solubilización, el CARRIER con sus terminales hidrofobitos queda hacia el interior en contacto con el aceite, mientras que las cabezas polares están en la superficie, en contacto con la Astaxantina.

Esta unión, puede considerarse como una minúscula gota de lípido delimitada por grupos polares en contacto con el pigmento disuelto. Las moléculas de Astaxantina no solubles en aceite quedan atrapadas en el interior de la micela, y puede ser arrastrada por la disolución.

## ETAPA 2: PRUEBA EN ESTANQUES (FASE DE ESTUDIO LABORATORIO)

Se utilizó un total de 300 truchas (*Oncorhynchus mykiss*) de aproximadamente 300 g de peso promedio y con una desviación estándar (DE) no superior al 5%. En forma previa al traslado a la unidad experimental, se les realizó análisis para chequear el estado sanitario. Se utilizó un grupo de peces vacunados contra IPNV.

Los peces fueron recepcionados en agua de mar y se distribuyeron en grupos de 25 en doce estanques de 700 Lt. con suministro constante de aire y agua de mar/dulce (10 L/min) y alimentados con la misma dieta del lago o piscicultura de origen (sin pigmento) por un periodo de aclimatación de dos semanas.

Posteriormente (tiempo 0) los peces fueron alimentados con 4 dietas experimentales (tratamientos), suministrando cada dieta a 3 estanques diferentes, es decir cada tratamiento tuvo 3 repeticiones. El estudio consistió de un diseño factorial de tratamientos de 2 x 2, donde las variables en estudio fueron 2 tipos de vehículo para adicionar el pigmento a las dietas (acuoso y lipídico) y 2 niveles de astaxantina en las dietas (50 y 80 ppm). El período experimental tuvo una duración de 68 días. Los distintos tratamientos se describen en la siguiente tabla.

Tratamiento	Contenido de Astaxantina (mg/kg)	Tipo de Vehículo	Número de estanques
1	50	Acuoso	3
2	80	Acuoso	3
3	50	Lipídico	3
4	80	Lipídico	3

Se utilizaron dos niveles de suplementación de Astaxantina (50 y 80 mg /kg de alimento) con el objeto de observar con mayor facilidad el hipotético efecto del vehículo en cuestión sobre la tasa de depósito de pigmento en el músculo de los peces, al emplear un nivel inferior al promedio de la industria. El nivel de 50 ppm es señalado como el óptimo mínimo necesario por las predicciones de color para salmones en Noruega. Además, el exceso de pigmento puede enmascarar la posibilidad de ver diferencias en

el efecto pigmentante de un producto u otro. La dosis de 80 mg/kg de alimento corresponde a la dosis normalmente utilizada por la industria.

Al inicio del estudio, los peces fueron alimentados con una dieta sin pigmento por un periodo de 14 días, con el objeto de evitar la presencia de pigmento en músculo al momento de iniciar el estudio. Adicionalmente, una menor concentración de pigmento en el músculo al inicio del estudio, permitiría una mayor tasa de depósito de pigmento durante la fase experimental.

Temperatura: Considera la temperatura ambiental de la Unidad durante los 68 días del experimento.

#### Elaboración de los Alimentos empleados en esta etapa

Los alimentos utilizados en el estudio fueron elaborados por la empresa Alitec. Un mismo alimento sin adición de aceite fue empleado para todos los tratamientos. La astaxantina fue adicionada a cada una de estas dietas junto con el aceite. Para los tratamientos control, (50 y 80 ppm de astaxantina solubilizada en agua), la astaxantina comercial (Carophyll Pink) fue solubilizada en agua a razón de 4:1 y luego mezclada con el aceite en un mezclador eléctrico. La mezcla de aceite y astaxantina fue posteriormente mezclada con el alimento sin aceite. Luego del mezclado, el alimento con aceite fue introducido a una máquina de vacío con el objetivo de permitir la incorporación del aceite al interior del pellet. El mismo procedimiento se utilizó con el vehículo Lipídico para el cual, la astaxantina comercial fue mezclada a razón de 10:1

Los niveles nutricionales de las dietas fueron formuladas de acuerdo al requerimiento nutricional de los peces para cada etapa de crecimiento. El calibre de los pellets fue de 4 mm, el cual corresponde al estándar de la industria para los peces del tamaño empleados en el presente experimento.

La cantidad de alimento suministrada a cada estanque (repetición) se realizó de acuerdo a una tabla de alimentación que considera la biomasa y la temperatura promedio del agua. Con esta información se calculó la cantidad de alimento a suministrar a cada estanque por separado.

Sistema de alimentación: se realizó temprano en la mañana durante dos horas, entregando el alimento en pequeñas raciones y hasta saciedad; luego en la tarde dos horas más, bajo el mismo régimen. La cantidad de alimento consumida se registró en forma diaria.

#### Grado de apetencia

Para monitorear la apetencia se observó cada mañana, en la primera alimentación, estanque por estanque la actividad de los peces cuando cae el alimento (ganas de comer).

Se efectuó una primera vuelta de observación en cada estanque y se registró, enseguida se realizaron otras dos vueltas de observación, es decir, cada mañana se obtuvieron 3 registros por estanque. Para medir el grado de apetencia, se considera los siguientes valores; Escaso, Normal, Abundante.

#### Mediciones y análisis químicos

Durante el estudio experimental se realizaron las siguientes mediciones:

##### a) Estanques:

- Temperatura máxima, mínima y promedio diaria de los estanques.
- Oxígeno disuelto: diariamente con Oxiguard®

##### b) Peces:

- Consumo de alimento: se calculó para cada dieta en forma individual por estanque.
- Tasa de ganancia de peso, porcentaje de crecimiento y largo de los peces: a los 30, 60 y 68 días de experimentación; para esto los peces fueron pesados por estanque y medidos en longitud en el día cero.
- Factor de condición: a los 0, 30, 60 y 68 días de experimentación a la totalidad de los peces de cada estanque. Esta medición se obtiene calculando el peso dividido por la longitud al cubo.

- Palatabilidad del alimento: se evaluó el apetito y/o rechazo del alimento mediante observación y usando tabla de apreciación de 1. Escaso, 2. Normal y 3. Abundante.
- Presencia de hongos u otras enfermedades: se chequeo por muestreo y observación de los peces en estudio.
- Mortalidad acumulada en forma diaria, estableciendo causa de muerte.
- Pigmentación y color: al inicio del estudio y después de 14 días de alimentar a los peces con una dieta sin pigmento (tiempo 0), y luego, a los 30, 60 y 68 días, se sacrificaron 3 peces por estanque para medir el color y la concentración de Astaxantina en músculo.
  - i. Color: el color se evaluó en Color Box con carta de color Salmofan, escala de 20 a 32. La zona de medición fue: lomo, línea media a la altura de la aleta dorsal y cola por sobre el poro anal. Cada punto fue evaluado por 3 panelistas entrenados y los resultados se expresan como un promedio de ellos. Adicionalmente, el color se midió en forma instrumental con un colorímetro triestímulo (Ej.: Minolta Chroma Meter®), el cual mide la reflectancia de la luz del músculo comparada a una placa de calibración. Esto permite tener una medición cuantitativa y objetiva del color.
  - ii. Pigmento: el contenido de Astaxantina se determinó en un corte transversal del pez eviscerado considerado entre la aleta dorsal y el poro anal del pez, en el trozo conocido como NQC (corte noruego). Para este análisis se hizo un pool de 3 peces de cada estanque o repetición. Por tanto, se obtuvieron 3 valores por tratamiento. El análisis se realizó por Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC) en fase normal para poder cuantificar el porcentaje de isómeros cis y trans de Astaxantina contenidos en el músculo del pez. El contenido de Astaxantina se expresa en mg/kg de músculo. La tasa de retención de pigmento en músculo se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Tasa de retención de astaxantina} = (\text{Astaxantina en músculo (mg/kg)/ICB}) \times 100,$$

Donde ICB = Consumo de astaxantina (mg/pez)/ Ganancia de Biomasa en el período

- Peso Eviscerado: 3 peces por estanque a los 0, 30, 60 y 68 días del período experimental.
- Grasa y humedad en músculo: a los 0, 30, 60 y 68 días del período experimental. Se analizó en el mismo corte noruego utilizado para la determinación de concentración de Astaxantina, realizando también un pool de muestras por estanque o repetición. El contenido de grasa se determinó por extracción Soxhlet, con hidrólisis ácida (AOAC, 1995).

#### c) Alimento

- Pigmento: de cada dieta elaborada se tomó una muestra representativa de alimento, la cual fue analizada para contenido de Astaxantina por NIR. Este análisis de astaxantina en el alimento fue utilizado para determinar la tasa de pigmentación de las truchas.
- Químico proximal: cada dieta fue analizada para químico proximal a través de la determinación por NIR (Reflectancia por Sistema Infrarrojo) para verificar la composición de la misma.

#### d) Análisis Estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SAS (1985) de acuerdo a un diseño factorial. Las variables que resultaron significativas ( $p < 0,05$ ) al ANOVA fueron sometidas a la prueba de LSD (Least Significant Difference) de comparación de medias (Steel y Torrie, 1980).

### Resultados de la etapa 3

Los resultados de indicadores productivos se presentan en las Tabla 1 y 2.

El peso vivo de los peces a los 0, 30, 60 y 68 días no fue estadísticamente diferente entre los distintos tratamientos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la ganancia de peso de los

peces que recibieron el alimento con astaxantina vehiculizada en lípido fue menor ( $p < 0.05$ ) a los 68 días de edad. El consumo de alimento no registró diferencias entre tratamientos en ninguna de las mediciones realizadas ( $p > 0,05$ ). La eficiencia de conversión alimenticia fue significativamente mas elevada en los peces que recibieron el alimento con astaxantina vehiculizada en lípido a los 60 y 68 días de edad. No se observaron interacciones significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos para las variables de indicadores productivos.

Los resultados de peso eviscerado, factor de condición de los peces y porcentaje de crecimiento no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos.

Tabla 1: Resultados de peso vivo a los 30, 60 y 68 días de edad

Tratamiento	Peso Vivo (g)			
	Inicial	30 d	60 d	68 d
50-A	305	462	671	728
80-A	290	443	647	695
50-C	298	454	649	694
80-C	283	429	618	663
<i>p</i>	0,3979	0,4387	0,2206	0,0983
<b>A</b>	298	453	659	712
<b>L</b>	291	442	634	679
<b>50</b>	302	458	660	711
<b>80</b>	287	436	633	679
<i>Valor P</i>				
<b>Pigmento</b>	0,1375	0,1605	0,1276	0,0734
<b>Carrier</b>	0,4516	0,4682	0,1492	0,0642
<b>P x C</b>	0,9972	0,8358	0,8479	0,9497

Tabla 2: Resultados de ganancia de peso, consumo de alimento y conversión de alimento a los 30, 60 y 68 días de edad

Tratamiento	Ganancia de peso (g)			Consumo de alimento promedio /repetición (g)			Conversión alimenticia		
	30 d	60 d	68 d	30 d	60 d	68 d	30 d	60 d	68 d
50-A	156	366	423 <sup>a</sup>	4233	8567	9747	1,083	1,058 <sup>b</sup>	1,075 <sup>b</sup>
80-A	153	357	405 <sup>ab</sup>	4067	8167	9297	1,069	1,034 <sup>b</sup>	1,066 <sup>b</sup>
50-C	156	351	396 <sup>ab</sup>	4467	9000	10070	1,144	1,154 <sup>a</sup>	1,175 <sup>a</sup>
80-C	147	336	381 <sup>b</sup>	4133	8233	9275	1,129	1,106 <sup>ab</sup>	1,130 <sup>ab</sup>
<i>p</i>	0,6722	0,1984	<b>0,0508</b>	0,2391	0,2702	0,2685	0,3284	<b>0,0248</b>	<b>0,0174</b>
<b>A</b>	155	362	414 <sup>a</sup>	4150	8367	9522	1,076	1,046 <sup>b</sup>	1,071 <sup>b</sup>
<b>L</b>	152	344	389 <sup>b</sup>	4300	8617	9673	1,137	1,130 <sup>a</sup>	1,153 <sup>a</sup>
<b>50</b>	156	359	410	4350	8784	9909	1,114	1,106	1,125
<b>80</b>	150	347	393	4100	8200	9286	1,099	1,070	1,098
<i>Valor P</i>									
<b>Pigmento</b>	0,3321	0,2265	0,0988	0,0977	0,0914	0,0752	0,6502	0,1564	0,2229
<b>Carrier</b>	0,6017	0,0791	<b>0,0189</b>	0,2932	0,4349	0,6341	0,0872	<b>0,0062</b>	<b>0,0039</b>
<b>P x C</b>	0,6380	0,7349	0,9118	0,5494	0,5633	0,5870	0,9834	0,6033	0,3971

Los resultados de color, en músculo se presentan en la Tabla 3.

Los resultados de color en músculo medidos en base a tres determinaciones diferentes (Carta color, color fan y color steak) no fueron influenciados significativamente ( $p > 0,05$ ) para los tratamientos.

**Tabla 3: Resultados de color, expresados en Carta de Color, Color Fan y Color Steak a los 30, 60 y 68 días de edad:**

Tratamiento	Carta Color			Color Fan			Color Steak		
	30 d	60 d	68 d	30 d	60 d	68 d	30 d	60 d	68 d
<b>50-A</b>	14,00	16,33	15,33	24,33	28,33	28,33	3,33	5,67	5,00
<b>80-A</b>	12,00	16,67	15,67	20,00	28,67	28,67	3,67	6,00	5,67
<b>50-C</b>	14,67	16,67	15,67	24,67	28,33	28,67	3,67	5,33	5,67
<b>80-C</b>	15,00	16,33	15,67	25,00	28,33	28,67	4,00	5,33	5,67
<b>p</b>	0,4162	0,8018	0,8592	0,4132	0,8592	0,8592	0,8272	0,3630	0,3300
<b>A</b>	13,00	16,50	15,50	22,17	28,50	28,50	3,50	5,84	5,34
<b>L</b>	14,84	16,50	15,67	24,84	28,33	28,67	3,84	5,33	5,67
<b>50</b>	14,34	16,50	15,50	24,5	28,33	28,50	3,50	5,50	5,34
<b>80</b>	13,50	16,50	15,67	22,50	28,50	28,67	3,84	5,67	5,67
<b>Valor P</b>									
<b>Pigmento</b>	0,5400	1,0000	0,6305	0,4034	0,6305	0,6305	0,5237	0,5796	0,2815
<b>Carrier</b>	0,1967	1,0000	0,6305	0,2733	0,6305	0,6305	0,5237	0,1215	0,2815
<b>P x C</b>	0,3963	0,3466	0,6305	0,3335	0,6305	0,6305	1,0000	0,5796	0,2815

Los resultados de astaxantina y retención de astaxantina en músculo se presentan en la Tabla 4.

El contenido de astaxantina en músculo fue significativamente más elevado a los 30 y 60 días de edad en los peces alimentados con 80 mg/kg de pigmento al compararlo con los peces que consumieron la dieta con 50 mg/kg. Sin embargo, a los 68 días de edad, esta variable no fue diferente entre los tratamientos ( $p > 0,05$ ). La tasa de retención de pigmento a los 30 y 60 días de edad fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) para los peces alimentados con astaxantina vehiculizada en lípido. Sin embargo, a los 68 días de edad, la tasa de pigmentación no fue diferente para los distintos tratamientos. No se observaron interacciones significativas para las variables de pigmentación.

**Tabla 4: Resultados de astaxantina y retención de astaxantina en músculo a los 30, 60 y 68 días de edad:**

Tratamiento	Astaxantina en músculo (mg/kg)			Retención (%)		
	30 d	60 d	68 d	30 d	60 d	68 d
50-A	4,20 <sup>b</sup>	8,50 <sup>ab</sup>	12,2	14,37	15,36 <sup>a</sup>	21,25
80-A	5,73 <sup>ab</sup>	10,87 <sup>a</sup>	15,43	11,77	13,53 <sup>a</sup>	22,09
50-C	4,27 <sup>b</sup>	4,50 <sup>b</sup>	12,17	6,88	6,80 <sup>b</sup>	20,89
80-C	6,60 <sup>a</sup>	10,03 <sup>a</sup>	13,60	9,60	10,81 <sup>ab</sup>	18,96
<b>p</b>	<b>0,0463</b>	<b>0,0312</b>	<b>0,2682</b>	<b>0,0624</b>	<b>0,0270</b>	<b>0,7171</b>
<b>A</b>	4,97	9,69	13,82	13,07 <sup>a</sup>	14,45 <sup>a</sup>	21,67
<b>L</b>	5,44	7,27	12,89	8,24 <sup>b</sup>	8,81 <sup>b</sup>	19,93
<b>50</b>	4,24 <sup>b</sup>	6,5 <sup>b</sup>	12,19	10,63	11,08	21,07
<b>80</b>	6,17 <sup>a</sup>	10,45 <sup>a</sup>	14,52	10,69	12,17	20,53
<b>Valor P</b>						
<b>Pigmento</b>	<b>0,0096</b>	<b>0,0144</b>	<b>0,0934</b>	<b>0,9728</b>	<b>0,5220</b>	<b>0,7866</b>
<b>Carrier</b>	<b>0,4377</b>	<b>0,0934</b>	<b>0,4681</b>	<b>0,0196</b>	<b>0,0084</b>	<b>0,3971</b>
<b>P x C</b>	<b>0,5037</b>	<b>0,2474</b>	<b>0,4836</b>	<b>0,1478</b>	<b>0,1097</b>	<b>0,4977</b>

El contenido de grasa y humedad en músculo de peces se presenta en la Tabla 5.

No se observaron diferencias ( $p > 0,05$ ) para estas variables durante el desarrollo del estudio como tampoco interacciones significativas ( $p > 0,05$ ).

Tabla 5. Composición corporal.

Tratamiento	Grasa corporal (%)		Humedad corporal (%)	
	30 d	60 d	30 d	60 d
50-A	1,83	2,47	74,97	75,10
80-A	1,83	2,80	74,83	75,17
50-C	1,83	2,23	74,83	76,07
80-C	2,03	2,30	74,90	75,90
<i>p</i>	0,9368	0,6316	0,9462	0,1886

### **ETAPA 3: EVALUACIÓN DE ESTABILIDAD DEL ALIMENTO**

El objetivo de esta etapa del estudio fue determinar la pérdida de concentración de la Astaxantina, Vitamina E y la estabilidad oxidativa del alimento, medida en base a contenido de ácidos grasos omega -3 (EPA y DHA) y TBA (Substancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). La concentración de los compuestos mencionados anteriormente se analizaron a los 0, 15, 30 y 45 días de almacenamiento de los alimentos a temperatura ambiente y a 40° C.

#### Resultados de la etapa 3

La estabilidad de la astaxantina en el alimento almacenado a temperatura ambiente y a 40° C se presenta en las Figuras 1 y 2. La pérdida de astaxantina a temperatura ambiente fue similar entre los alimentos con vehículo acuoso y Lipídico a los 15 y 30 días de almacenamiento. Sin embargo, a los 45 días de almacenamiento, la pérdida de astaxantina en el alimento con vehículo Lipídico fue similar a la obtenida a los 30 días, es decir cercana al 10%, mientras que la pérdida de astaxantina en el alimento con vehículo acuoso fue de 33% (67% de actividad). A 40° C, la pérdida de astaxantina fue mayor en los alimentos control, siendo esta diferencia de 7, 16 y 18% menor para los alimentos con vehículo lipídico a los 15, 30 y 45 días de almacenamiento, respectivamente.

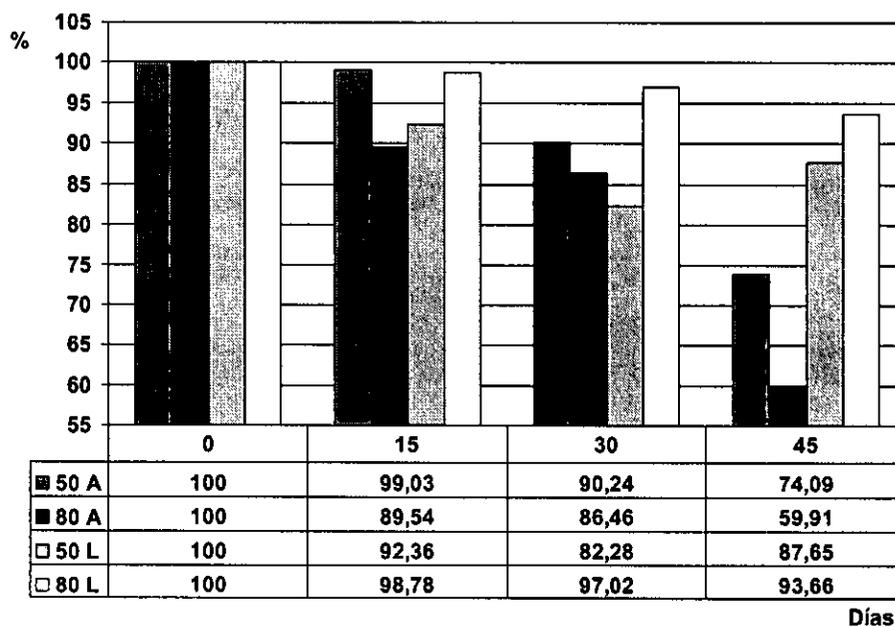
Tanto a temperatura ambiente como a 40° C, la pérdida de actividad de vitamina E a partir de los 15 días de almacenamiento fue menor para los alimentos con la astaxantina adicionada en vehículo acuoso. Esta diferencia, sin embargo, estuvo influenciada por la baja pérdida de actividad de vitamina E del tratamiento con 50 mg/kg de astaxantina en vehículo acuoso, al compararla con la pérdida producida en los otros 3 tratamientos, la cual fue similar entre ellos (Figuras 3 y 4).

Las pérdidas de EPA y DHA tanto a temperatura ambiente como a 40° C fueron mayores para los tratamientos con vehículo acuoso y se observó una mayor estabilidad de estos ácidos grasos en los tratamientos con presencia de vehículo lipídico (Figuras 5, 6, 7 y 8).

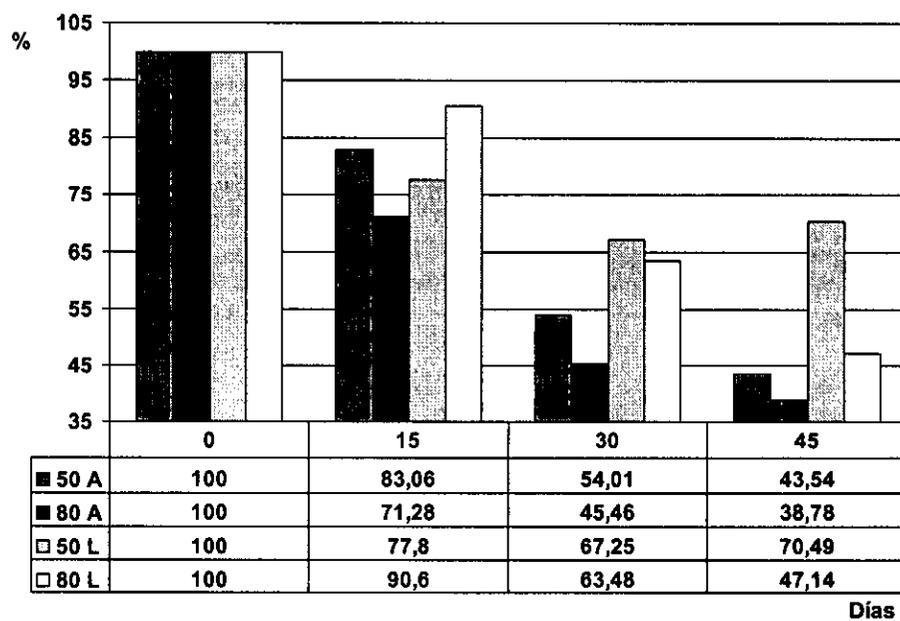
Los valores de TBA mostraron una disminución a temperatura de 40° C con los días de almacenamiento, sin embargo a los 45 días, esta disminución es menor en las dietas con presencia de vehículo lipídico, lo que evidenciaría una mayor estabilidad oxidativa y una menor formación de compuestos de oxidación secundaria para estos tratamientos. A su vez, a temperatura ambiente no se observan diferencias evidentes entre tratamientos (Figura 9, 10)

Los resultados obtenidos para los porcentajes de EPA y DHA así como los de TBA, tanto a temperatura ambiente como a 40° C sugieren una inestabilidad oxidativa de los tratamientos con presencia de vehículo acuoso, provocada probablemente por la hidrólisis sobre los ácidos grasos mas reactivos. En el caso de presencia de vehículo lipídico, esta reacción de oxidación estaría bloqueada.

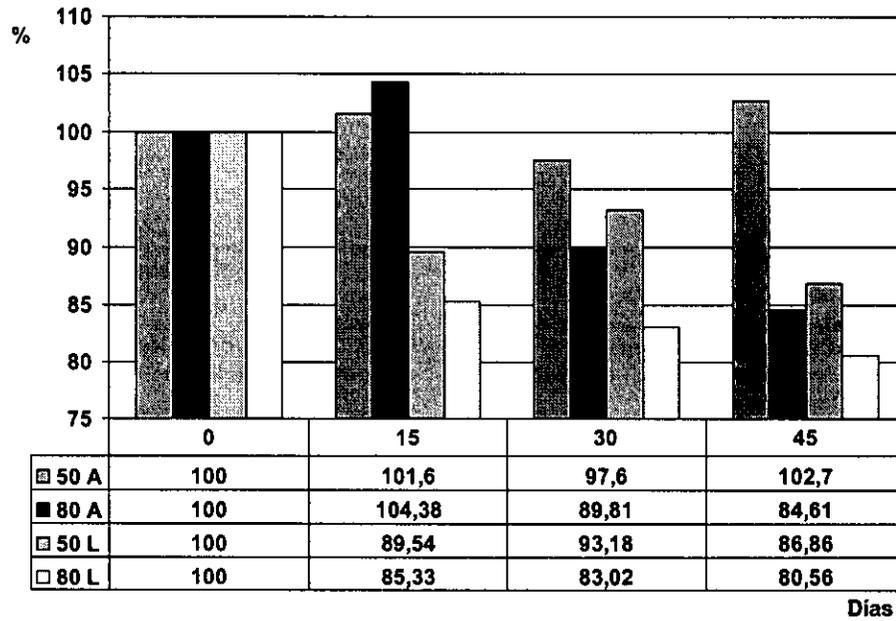
**Figura 1: Contenido de Astaxantina (T° ambiente)**



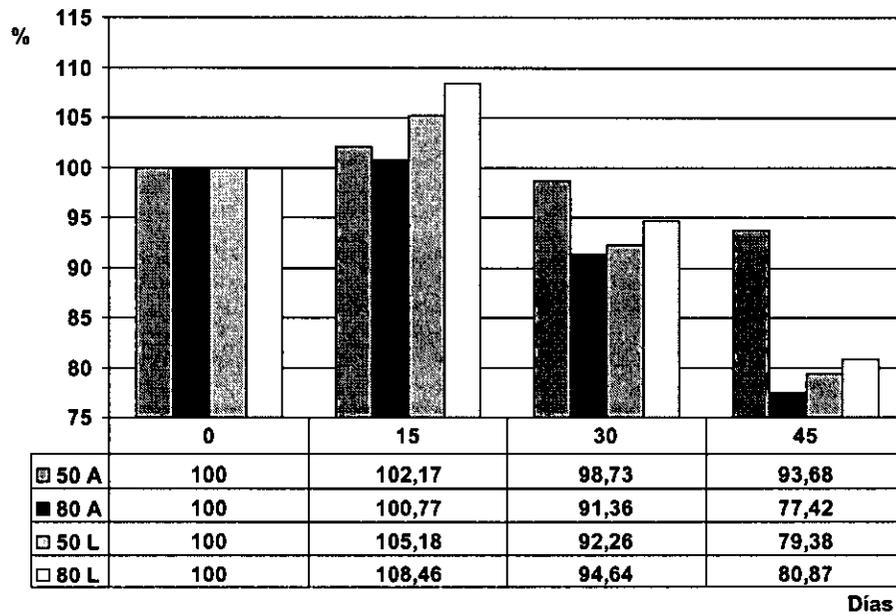
**Figura 2: Contenido de Astaxantina (40°C)**



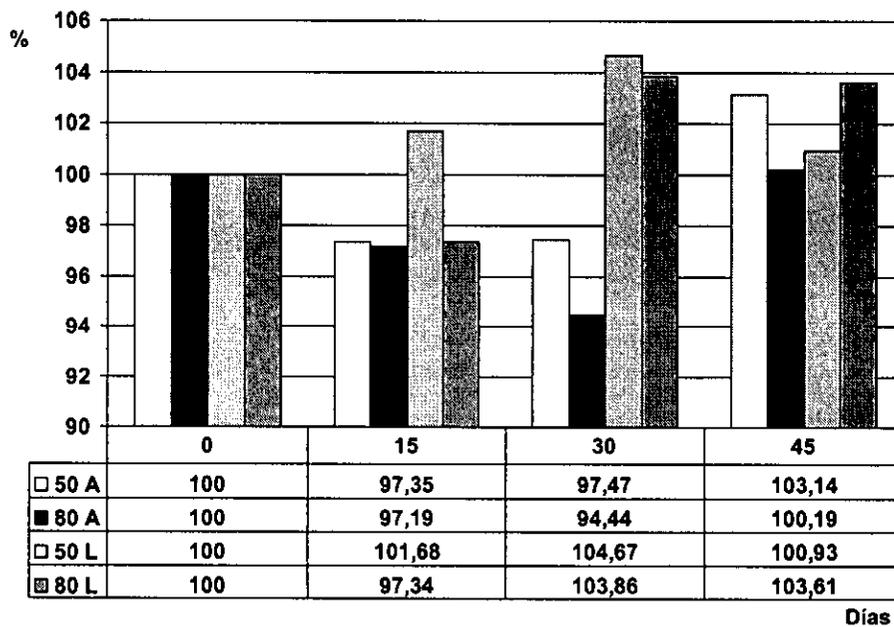
**Figura 3: Contenido de Vitamina E (T° ambiente)**



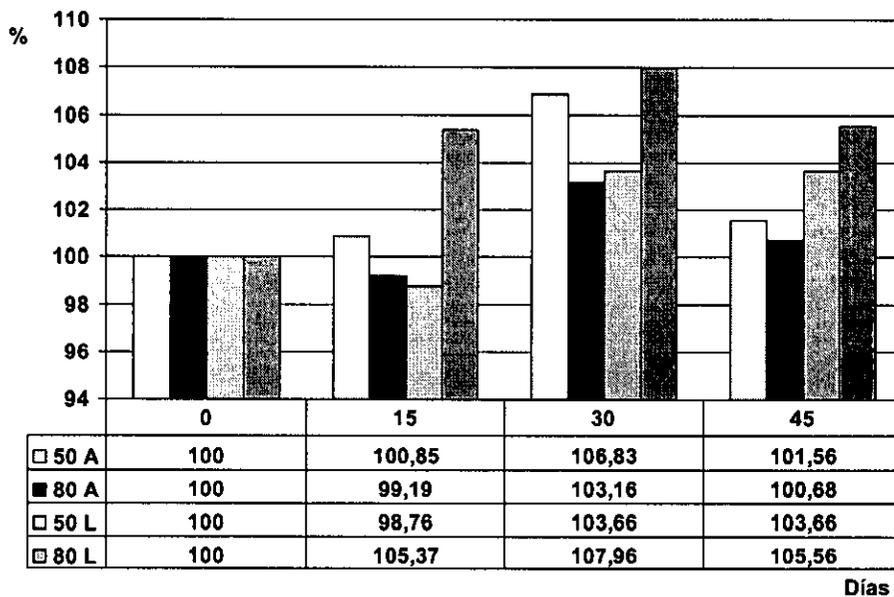
**Figura 4: Contenido de Vitamina E (40°C)**



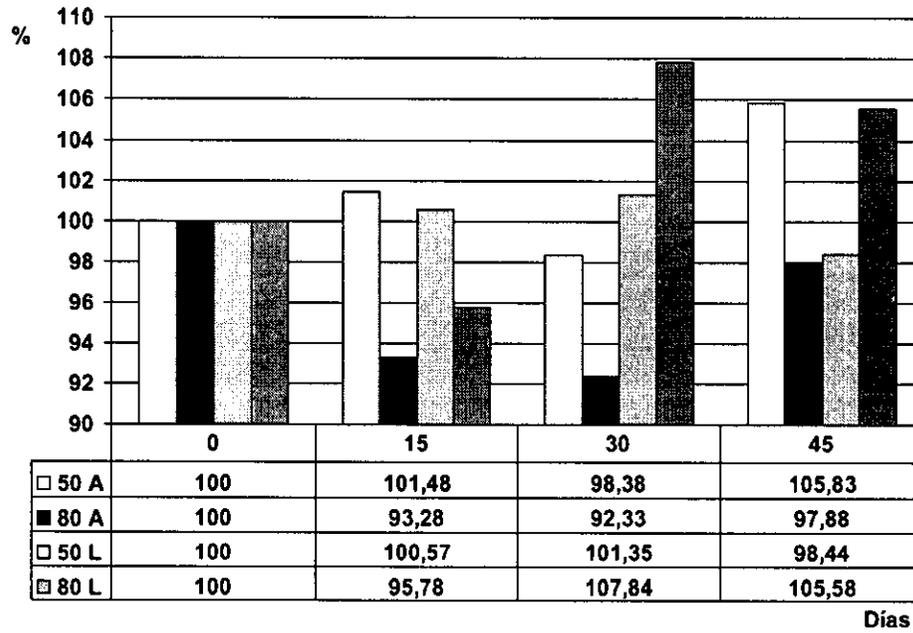
**Figura 5: Contenido de EPA (T° ambiente)**



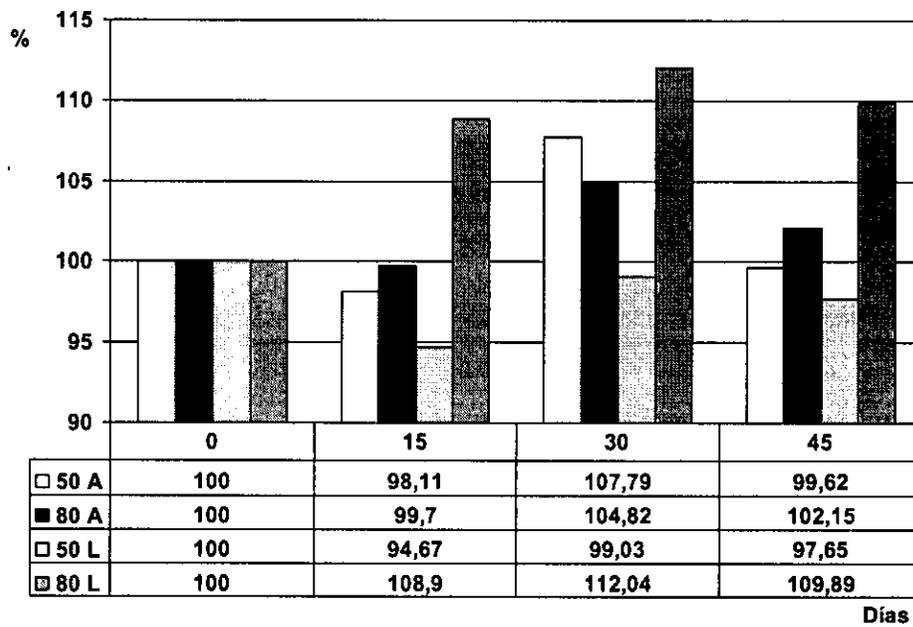
**Figura 6: Contenido de EPA (40°C)**



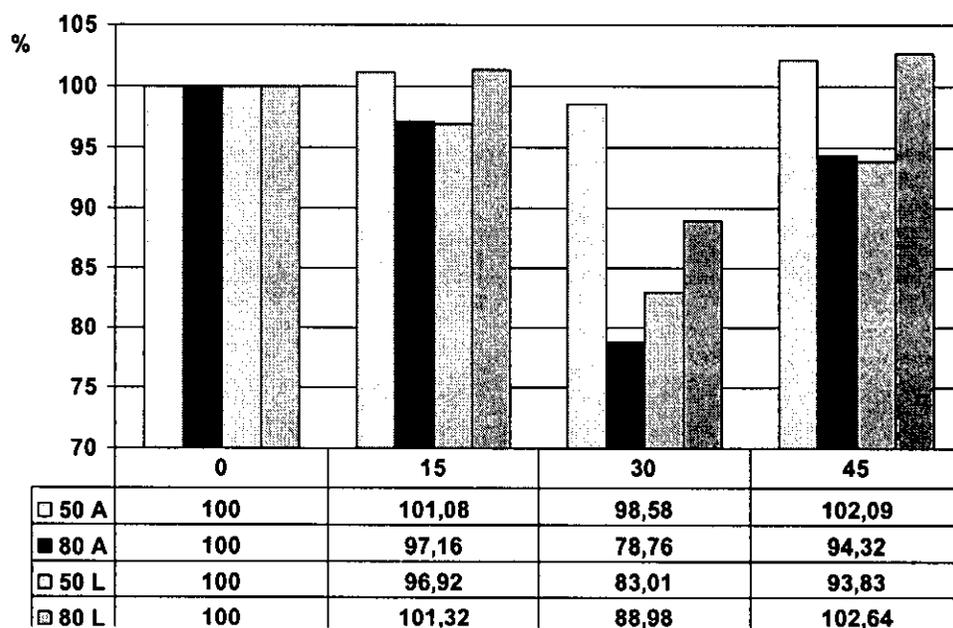
**Figura 7: Contenido de DHA (T° Ambiente)**



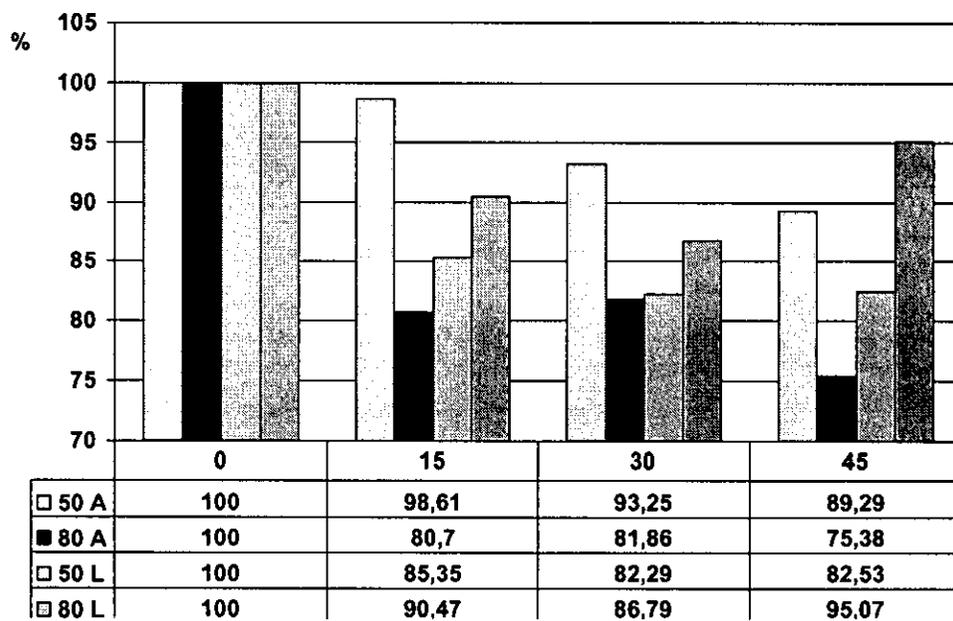
**Figura 8: Contenido de DHA (40°C)**



**Figura 9: Índice TBA (T° Ambiente)**



**Figura 10: Índice TBA (40°C)**



#### **ETAPA 4: MODIFICACIONES AL CARRIER**

De acuerdo a los resultados obtenidos en las etapas 2 y 3, se procedió a modificar la composición y estructura molecular del CARRIER, de modo de hacer posible su utilización en pigmentos de carácter natural además de sintéticos.

Las diferentes formulaciones ensayadas en esta etapa consistieron en modificar los largos de cadena del CARRIER y sus terminales polares o no-polares, con la finalidad de otorgar mayor o menor afinidad del CARRIER con el pigmento y el aceite.

Las modificaciones al largo de la cadena del CARRIER, permitieron establecer un producto, en el que se pueden solubilizar ambos tipos de astaxantina, tanto sintéticas como naturales.

Se confirmó que la mejor proporción de CARRIER: Astaxantina sintética o natural es de 10 partes de CARRIER por 1 parte de pigmento.

## ETAPA 5: PRUEBAS PILOTO- FASE INDUSTRIAL

Esta prueba correspondiente a la etapa 5 del proyecto, se efectuó en jaulas experimentales de agua de mar, de la empresa EWOS INNOVATION.

Los objetivos principales de esta prueba son verificar a nivel industrial, las conclusiones observadas en la etapa 2 de nivel experimental, en relación a la factibilidad de fabricación de alimento con adición de CARRIER en etapa de aceitado (post-extrusión), su inocuidad, palatabilidad y estabilidad, así como la capacidad de pigmentación del alimento producido en estas condiciones.

### Materiales y Métodos

Peces: Trece mil (13.000) Salmones del Atlántico (*Salmo salar*) de 900 g de peso aproximadamente serán distribuidas en 12 jaulas a razón de 1000 peces por jaula. Tres (3) jaulas serán asignadas a cada uno de 4 tratamientos:

Tratamiento 1: Control, con adición de 40 mg/kg de Astaxantina sintética en el alimento a través del aceitador de alimento (sistema Flex Coating).

Tratamiento 2: Control, con sistema de incorporación pre-extrusión y un nivel de incorporación de 40 mg/kg de Astaxantina natural en el alimento

Tratamiento 3: Adición de 40 mg/kg de Astaxantina natural en el alimento a través del vehículo de origen lipídico, post extrusión

Tratamiento 4: Adición de 40 mg/kg de Astaxantina sintética en el alimento a través del vehículo de origen lipídico, post-extrusión

### Elaboración de los Alimentos

Los alimentos serán elaborados por Planta de Alimentos EWOS, Coronel. La dieta será la misma para todos los tratamientos.

En el caso del alimento control con presencia de astaxantina sintética (Tratamiento 1), el pigmento se adicionará de acuerdo al sistema de incorporación Flex Coating,

comercialmente empleado por EWOS. La dosis de astaxantina a emplear deberá asegurar un contenido de 40 ppm de astaxantina en el alimento final.

En el caso del alimento control con presencia de astaxantina natural (Tratamiento 2), el pigmento se adicionará de acuerdo al sistema de incorporación pre-extrusión, comercialmente empleado por EWOS. La dosis de astaxantina a emplear deberá asegurar un contenido de 40 ppm de astaxantina en el alimento final.

Para el caso de los tratamientos 3 y 4, la astaxantina, será adicionada a cada una de las respectivas dietas junto con el aceite después de la extrusión.

Para esto, la astaxantina sintética (Carophyll Pink) o la astaxantina natural (AquaSta Igene) según corresponda, serán solubilizadas en el vehículo lipídico razón de 1:5 para pigmentos sintéticos o naturales y luego esta mezcla será homogenizada con el aceite a incorporar en la dieta.

La solución de aceite y astaxantina mas vehículo lipídico, será posteriormente mezclada con el alimento extruido. Luego del mezclado del alimento extruido con el aceite, éste será sometido al proceso de vacío normal, con el objeto de permitir la incorporación de la mezcla al interior del pellet.

Duración del estudio: el estudio tendrá una duración de 3 meses. En este período las truchas engordarán desde los 900 g de peso hasta aproximadamente 1,7 kg de peso vivo.

Alimentos y alimentación: Los niveles nutricionales de las dietas serán de acuerdo al requerimiento nutricional de los peces. El calibre (tamaño) y composición de los alimentos (pellets) considerará el estándar utilizado por la industria para el normal desarrollo de los peces.

La cantidad de alimento estimada para el estudio será de 0,8 kg de alimento por pez, es decir 10,5 toneladas de alimento en 3 meses. Durante este período, el alimento se elaborará en dos oportunidades de tal forma que los alimentos no tengan una duración superior a los 45 días. Esto evitará el uso de alimento añejo y pérdidas de estabilidad del pigmento.

La cantidad de alimento a entregar a cada jaula se realizará de acuerdo a una tabla de alimentación que considera la biomasa y la temperatura promedio del agua. Con esta información, se calcula la cantidad de alimento a suministrar a cada estanque por separado. Los peces serán alimentados a saciedad.

Sistema de alimentación: automático

### Mediciones y Análisis Químicos

Durante el estudio experimental se realizarán las siguientes mediciones:

#### A) Jaulas:

- 1) Temperatura máxima, mínima y promedio diaria de las jaulas.
- 2) Oxígeno disuelto: diariamente con Oxiguard® (u otro sistema)

#### B) Peces:

- 1) Consumo de alimento: se calculará para cada ración y calibre que se suministre a los peces de cada estanque.
- 2) Crecimiento o tasa de crecimiento específico (SGR) y largo de los peces: a los 0 y 3 meses de experimentación. Para esto, una muestra de 120 peces por jaula será pesada y medidos en longitud en las fechas indicadas.
- 3) Factor de condición: a los 0 y 3 meses de experimentación.
- 4) Presencia de hongos u otras enfermedades: Se realizara inspección visual y en caso necesario de estudio patológico
- 5) Mortalidad acumulada en forma diaria, estableciendo causa de muerte toda vez que la mortalidad exceda lo normal.
- 6) Pigmentación y color: al inicio del estudio (tiempo 0) y luego a los 3 meses de alimentación, 40 peces por jaula serán sacrificados para medir el color y la concentración de Astaxantina en músculo.
- 7) Color: el color será evaluado en Color Box con carta de color Salmofan, escala de 20 a 32. La zona de medición será: lomo, línea media a la altura de la aleta dorsal y cola por sobre el poro anal. Los resultados se expresarán como un promedio de

ellos. Adicionalmente, el color se medirá en forma instrumental con un colorímetro triestímulo (Ej.: Minolta Chroma Meter®), el cual mide la reflectancia de la luz del músculo comparada a una placa de calibración. Esto permitirá tener una medición cuantitativa y objetiva del color.

8) Pigmento: el contenido de Astaxantina se determinará en un corte transversal del pez eviscerado considerado entre la aleta dorsal y el poro anal del pez, en el trozo conocido como NQC (corte noruego). Para este análisis, se harán 4 pool de los 10 peces cada uno por jaula o repetición. Por lo tanto, se obtendrán 4 valores por repetición. El contenido de Astaxantina se expresa en mg/kg de músculo. La tasa de retención de pigmento en músculo se calculará de la siguiente forma:

a) Tasa de retención de astaxantina =  $(\text{Astaxantina en músculo (mg/kg)}/\text{ICB}) \times 100$ ,  
donde ICB = Consumo de astaxantina (mg/pez)/ Ganancia de Biomasa en el período

### C) Alimento

a) Pigmento: de cada dieta que se elabore se tomará una muestra representativa de alimento, la cual será analizada para contenido de Astaxantina por HPLC.

### Resumen del número de análisis químicos requeridos:

Color: 40 peces por jaula por 12 jaulas por 2 muestreos (960 determinaciones).

Astaxantina en músculo: 4 determinaciones por jaula por 12 jaulas por 2 muestreos (96 análisis).

Astaxantina total en alimento: 2 dietas por 4 tratamientos (8 análisis).

Estabilidad Astaxantina en alimento: 4 dietas por 4 muestreos (0, 15, 30 y 45 días) a temperatura ambiente y 40° C (64 análisis).

### Resultados de la etapa 5:

Los resultados de indicadores productivos se presentan en la Tabla 1 y Diagrama 1.

El peso vivo de los peces y la ganancia de peso, no fue estadísticamente diferente entre los distintos tratamientos ( $p > 0,05$ ).

El consumo de alimento no registró diferencias entre tratamientos en ninguna de las mediciones realizadas ( $p > 0,05$ ).

La tasa de crecimiento específico (SGR) y la conversión de alimento (FCR) no se diferenciaron significativamente ( $p > .05$ ) entre tratamientos.

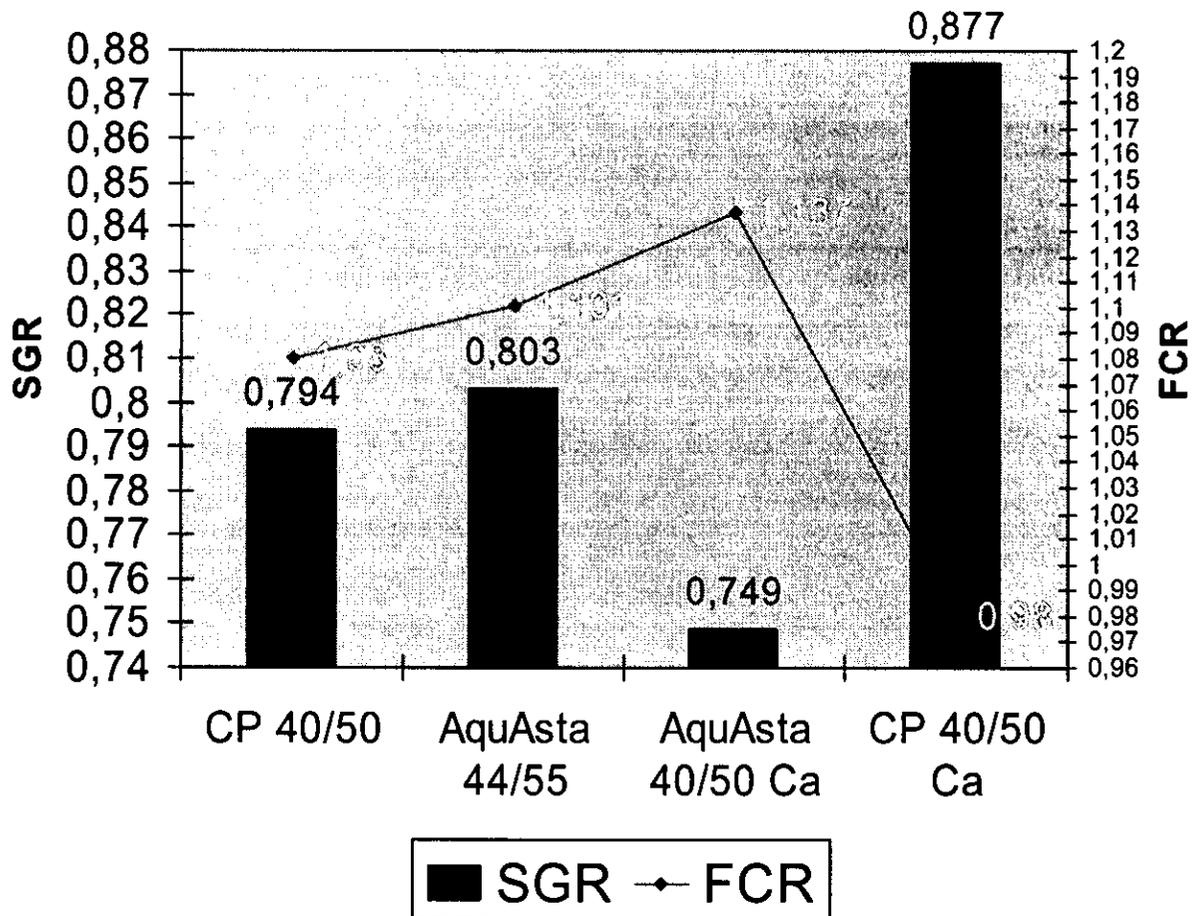
Sin embargo, el SGR es numéricamente inferior y el FCR menos eficiente en los tratamientos donde el CARRIER está incluido. Esto se explica, ya que las dietas se formularon reemplazando numéricamente los kilos de CARRIER en lugar de aceite, esto conduce a dietas de menor energía.

En las dietas con pigmento natural (tratamiento 3), en que la inclusión de CARRIER es mayor, (dado que el pigmento natural contiene menor concentración de astaxantina por kilo de pigmento incluido, y la cantidad de Carrier a incluir es directamente proporcional a la cantidad de pigmento adicionado, no a la cantidad de astaxantina) el reemplazo de aceite por CARRIER es cercano al 5% del aceite originalmente contemplado.

Tabla 1: Indicadores productivos

	CP 40/50	AquAsta 44/55	AquAsta 40/50Carrier	CP 40/50 Carrier
Peso Inicial, kg	.909 ± .06	.931 ± .03	.944 ± .05	.863 ± .03
Peso Final, kg	1.671 ± .09	1.724 ± .09	1.675 ± .003	1.694 ± .13
Ganancia de peso, kg	.761 ± .03	.793 ± .09	.732 ± .05	.831 ± .10
SGR	.794 ± .02	.803 ± .08	.749 ± .07	.877 ± .06
FCR	1.080 ± .04	1.101 ± .07	1.137 ± .13	.980 ± .10

Diagrama 1

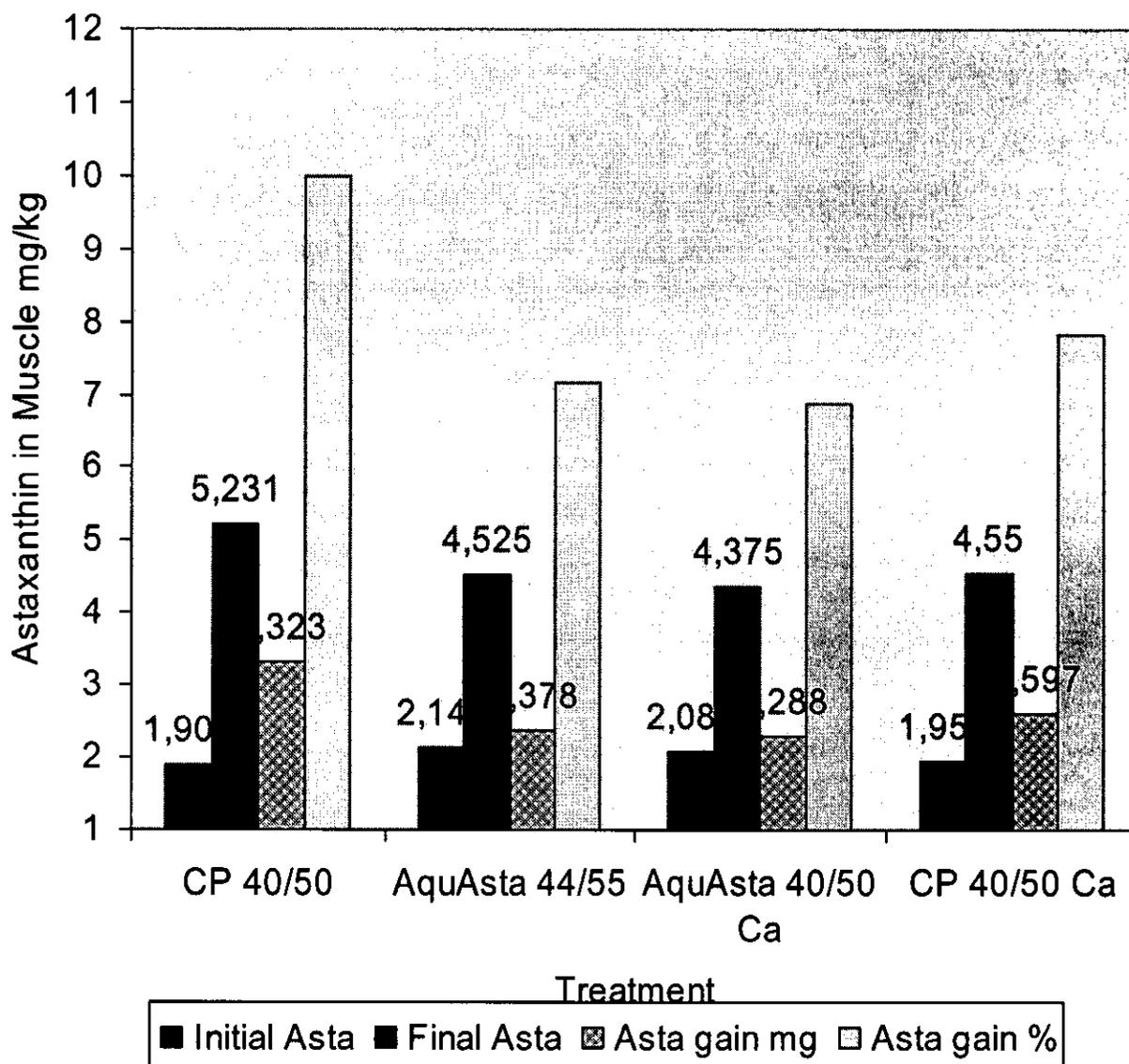


Como se puede observar en el diagrama 2, la tasa de fijación de astaxantina en el músculo fue significativamente inferior ( $p < 0.05$ ) para los peces alimentados con dietas con Carophyll Pink solubilizado en CARRIER comparando con el método convencional EWOS (Flex Coating).

Usando Aquasta la tasa de fijación de astaxantina en el músculo no tuvo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el alimento preparado con pigmento natural añadido con CARRIER o por el método de pre-extrusión empleado por EWOS.

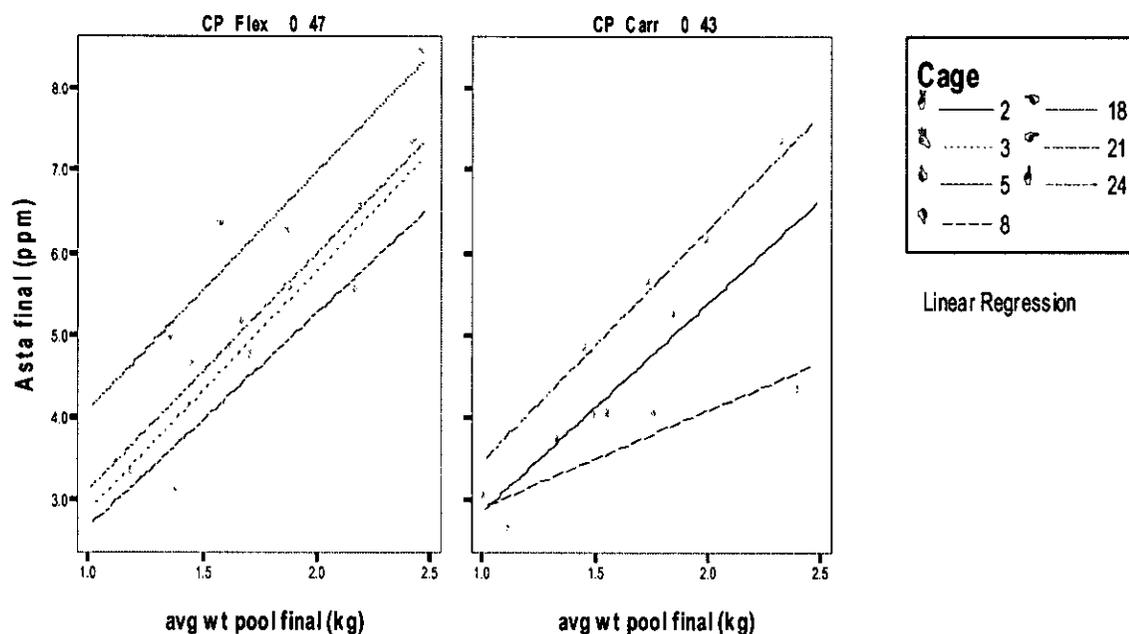
Se puede concluir, que el CARRIER evaluado en este estudio no mejora la retención de astaxantina en el músculo.

Diagrama 2



## PIGMENTO SINTETICO Y CARRIER.

La interacción entre tratamiento y peso de los peces es significativa ( $p = .04$ ), lo cual significa que los peces alimentados con una dieta en la cual el pigmento fue adicionado con CARRIER tendieron a aumentar los niveles de astaxantina sintetica en músculo a una tasa mas lenta que en el caso de la adición convencional de EWOS (flex coating).



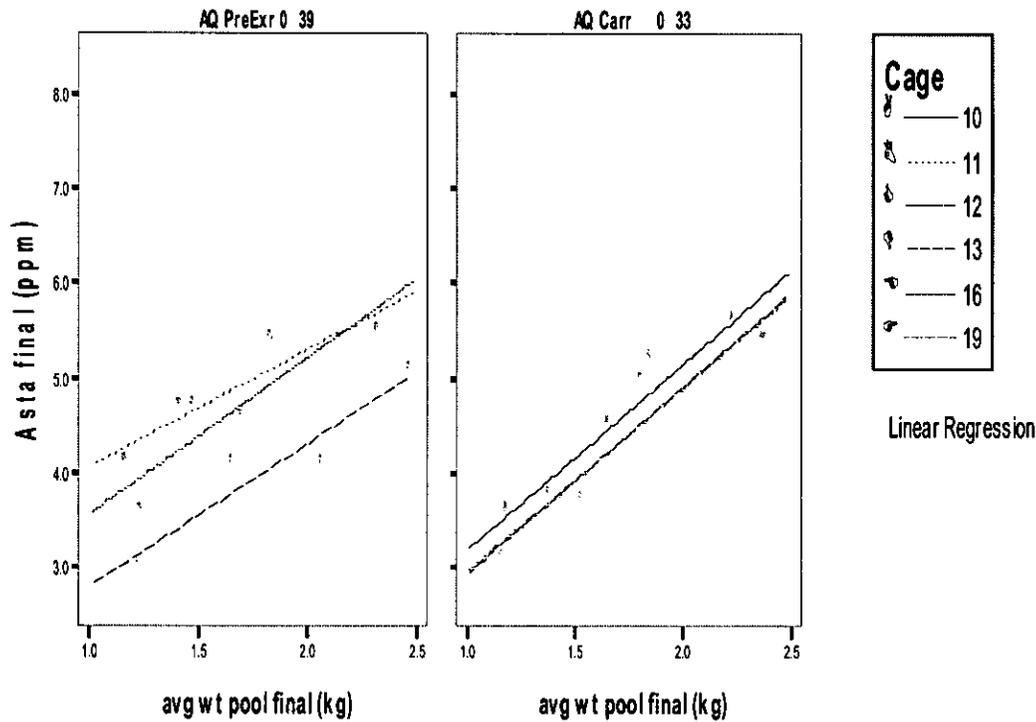
Type III Tests of Fixed Effects(a)

Source	Numerator df	Denominator df	F	Sig.
Intercept	1	6.1	132.9	.000
Treatment	1	6.1	.0	.877
poolwtkgfinal12	1	19.4	130.0	.000
Treatment * poolwtkgfinal12	1	19.4	4.8	.040

a Dependent Variable: Asta final (ppm).

**PIGMENTO NATURAL Y CARRIER:**

En esta comparación, no se ve un efecto significativo ni para tratamiento ( $p = .346$ ) ni para la interacción ( $p = .100$ ). Por lo tanto, cuando se adiciona Aquasta (pigmento natural), los peces acumulan astaxantina en el músculo a una misma tasa ya sea si el pigmento se adiciona pre-extrusión o vía un carrier.



**Type III Tests of Fixed Effects(a)**

Source	Numerator df	Denominator df	F	Sig.
Intercept	1	5.8	382.0	.000
Treatment	1	5.8	1.0	.346
poolwtkgfinal12	1	16.2	117.3	.000
Treatment * poolwtkgfinal12	1	16.2	3.0	.100

a Dependent Variable: Asta final (ppm).

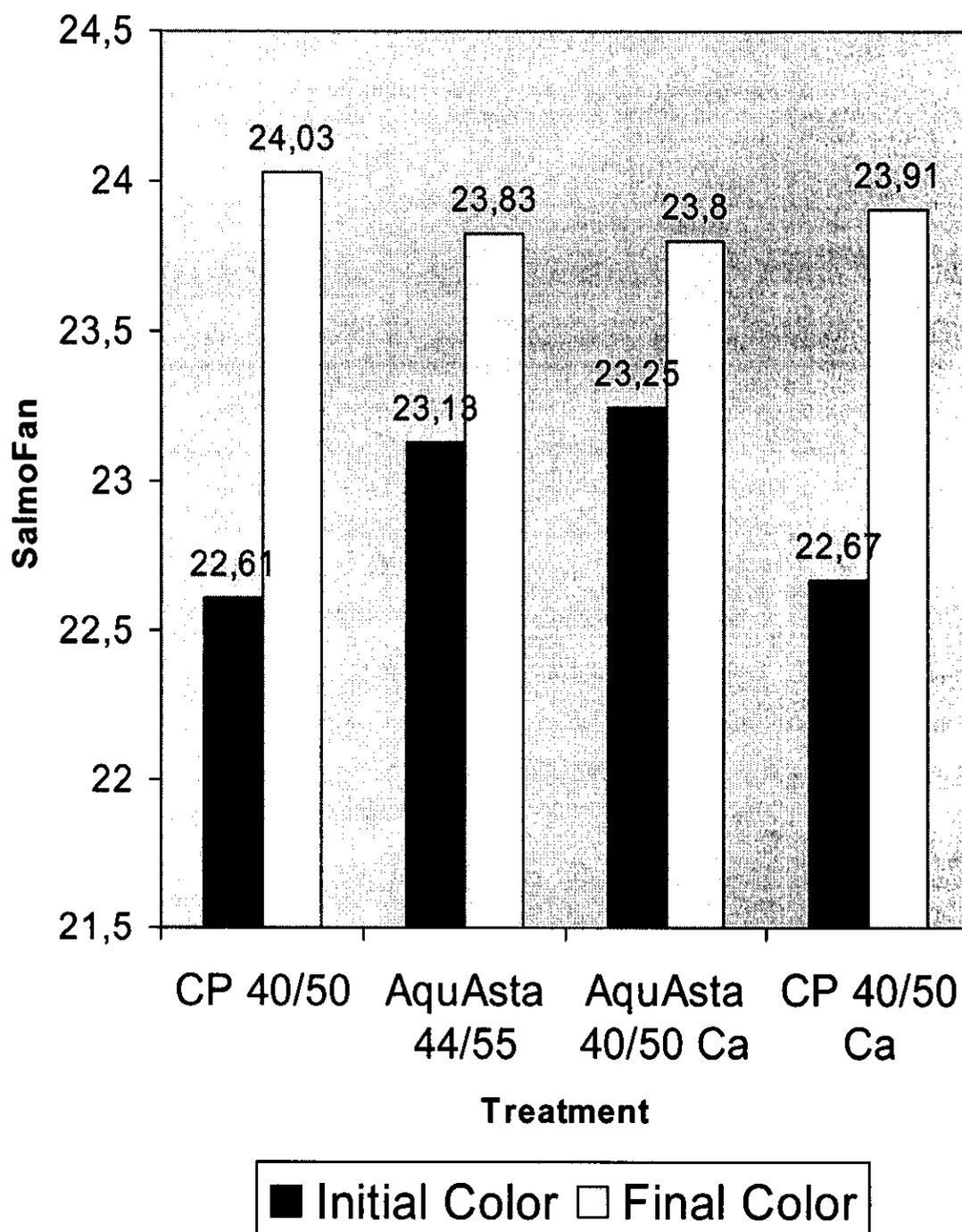
Medición de Color:

Las mediciones de color (Salmofan y el instrumental Minolta) realizado sobre el NQC (el Corte de Calidad noruego) no mostraron ninguna diferencia significativa entre tratamientos ( $p > .05$ )

Tabla 2: Medidas instrumentales en color en NQC al final del primer período de crecimiento

	CP 40/50	AquAsta 44/55	AquAsta 40/50 Carrier	CP 40/50 Carrier
L	39.83	38.71	39.23	40.13
a	7.68	7.57	7.30	7.53
b	9.84	8.90	9.35	10.15
Chroma	12.53	11.72	11.89	12.67
Hue	52.18	49.67	52.08	53.65

Diagrama 3



Se observa que la estabilidad del pigmento en los alimentos preparados con adición de CARRIER es mayor que la observada con otros métodos, de la misma manera la perdida de pigmento es menor.

Tabla 3: Estabilidad de la astaxantina en el alimento

Week of Storage	Treatments			
	CP 40/50	AquAsta 44/55	AquAsta 40/50 Carrier	CP 40/50 Carrier
0	48.2 ± .45	40.0 ± 1.22	34.0 ± 1.73	45.0 ± 1.87
2	46.0 ± .71	40.4 ± 1.52	33.4 ± 1.14	40.6 ± 3.44
4	43.6 ± 2.97	39.6 ± .55	34.0 ± 2.0	41.8 ± 2.05
6	43.2 ± .45	40.0 ± .71	32.4 ± .89	42.0 ± 1.22
8	43.2 ± 1.1	36.8 ± 1.48	32.2 ± .84	41.6 ± 1.82
12	39.4 ± .89	35.0 ± .71	31.8 ± 1.1	39.6 ± 1.52
% loss	18.26	12.5	6.47	12.0

## CONCLUSIONES GENERALES

1. La preparación de alimentos pelletizados para salmonideos, es posible con la previa solubilización de los pigmentos sintéticos o naturales en el vehículo lipídico CARRIER.
2. En la preparación de alimentos pelletizados para salmonideos, es posible eliminar la etapa de inclusión de los pigmentos naturales o sintéticos en la etapa de extrusión, y emplear la etapa de aceitado como etapa de adición de los pigmentos.
3. La preparación de alimentos pelletizados para salmonideos, con la previa solubilización de los pigmentos sintéticos o naturales en el vehículo lipídico CARRIER reduce la pérdida de astaxantinas sintéticas o naturales tanto a temperatura ambiente como a temperaturas superiores cercanas a los 40°C.
4. La preparación de alimentos pelletizados para salmonideos, con la previa solubilización de los pigmentos sintéticos o naturales en el vehículo lipídico CARRIER reduce la pérdida de ácidos grasos Omega-3 EPA y DHA, indispensables para la alimentación apropiada de los salmonideos.
5. La preparación de alimentos pelletizados para salmonideos, con la previa solubilización de los pigmentos sintéticos o naturales en el vehículo lipídico CARRIER no afecta las variables de indicadores productivos.
6. El alimento en el cual la astaxantina fue incorporada previa dilución en un vehículo de origen lipídico tiende a disminuir la tasa de crecimiento de los peces sin embargo, este efecto no se debe a un menor consumo de alimento, sino a que las dietas con incorporación de CARRIER presentan menor energía total, ya que en las pruebas realizadas, se les redujo el contenido de aceite en la proporción incluida de CARRIER.
7. La adición de astaxantina sintética o natural, solubilizada en el vehículo lipídico no influye positiva o negativamente en el color obtenido por los peces.
8. La forma de administrar la astaxantina natural en los alimentos, no induce diferencias en el contenido de astaxantina en músculo de los peces.

9. El empleo del vehículo de origen lipídico disminuye la tasa de retención de astaxantina sintética, y no influye en la tasa de retención de la astaxantina natural. A pesar de lo anterior, esta menor retención no se traduce en un menor color de la carne.
10. El vehículo de origen lipídico utilizado para adicionar la astaxantina al alimento no influye sobre la mortalidad, porcentaje de crecimiento, factor de condición de los peces, peso eviscerado y contenido de grasa o humedad corporal de los peces.
11. La disminución en los valores de TBA es menor en las dietas con presencia de vehículo lipídico, lo que evidencia una mayor estabilidad oxidativa y una menor formación de compuestos de oxidación secundaria para estos tratamientos.

## **AHORROS ESTIMADOS PARA LA INDUSTRIA DE ALIMENTO CON LA UTILIZACION DE VEHICULO LIPIDICO.**

### **1. PRODUCCION DE ALIMENTOS**

Cálculos comparativos para una producción de alimentos de la industria salmonera de 800.000 toneladas de alimento por año, con un valor de USD 200 por kilo de pigmento con 10% de astaxantina.

### **2. TASAS DE INCORPORACION DE CARRIER EN FUNCION DEL TIPO DE PIGMENTO**

#### **1. Incorporación de pigmentos sintéticos solubles en agua (ROCHE y BASF)**

De acuerdo a las experiencias realizadas en la preparación de los alimentos destinados a la fase de agua dulce del proyecto FONTEC, se tiene que la relación de 4: 1 entre carrier y pigmento es apropiada para la correcta disolución de la astaxantina contenida en el pigmento y su posterior incorporación en el aceite del alimento.

#### **2. Incorporación de pigmentos sintéticos no solubles en agua (ROCHE).**

En este caso y aplicando la misma formulación de carrier que para pigmentos solubles en agua, la relación de carrier y pigmento se sitúa en un valor de 10:1.

#### **3. Incorporación de pigmentos naturales no solubles en agua (IGENE).**

El uso de pigmentos naturales esta restringido principalmente a aquellas formulaciones de carácter "natural" o con bajo contenido de astaxantina (40 ppm y menos) debido a la baja concentración de astaxantina disponible en el pigmento natural (1% máximo). En este caso y aplicando la misma formulación de carrier que para pigmentos solubles en agua, la relación de carrier y pigmento será de 10:1.

## CONSUMO DE CARRIER VERSUS CONSUMO DE PIGMENTOS

1. Costo de la incorporación de pigmentos sintéticos solubles en agua con 10% de astaxantina (ROCHE y BASF)

Dieta con X ppm astaxantina	Pigmento (xTon alimento) KGS	Costo pigmento (xTon. Alimento) USD	Carrier (xTon. Alimento) KGS
50	0,5	100	2,0
60	0,6	120	2,4
70	0,7	140	2,8
<b>80</b>	<b>0,8</b>	<b>160</b>	<b>3,2</b>
90	0,9	180	3,6
100	1	200	4,0

Si se considera una dieta media de 80 ppm y una producción de solo de 800.000 Toneladas de alimento por año, se tiene que se gastarían aproximadamente 128 millones de dólares, por concepto de pigmento para la formulación de estas dietas y se incorporarían unas 640 toneladas de pigmento al año.

2. Costo de la incorporación de pigmentos sintéticos no solubles en agua con 10% de astaxantina (ROCHE)

Ppm astaxantina	Pigmento (xTon alimento)  KGS	Costo pigmento (xTon. Alimento)  USD	Carrier (xTon. Alimento)  KGS
50	0,5	100	4,0
60	0,6	120	4,8
70	0,7	140	5,6
<b>80</b>	<b>0,8</b>	<b>160</b>	<b>6,4</b>
90	0,9	180	7,2
100	1	200	8,0

Si siguiendo el mismo esquema que en el caso 1, si se considera una dieta media de 80 ppm y una producción de 800.000 Toneladas de alimento por año, se tiene que se gastarían aproximadamente 128 millones de dólares, por concepto de pigmento para la formulación de estas dietas y se incorporan 640 toneladas de pigmento al año.

De acuerdo a la tabla anterior, para solubilizar esta cantidad de pigmento se necesitarán **5.120 toneladas de carrier** al año (426 ton/mes)

- **PERDIDAS DE ASTAXANTINA POR PROCESO Y ALMACENAMIENTO**

1. **PERDIDA DE PIGMENTO POR PROCESO DE EXTRUSION**

Una de las pérdidas de pigmento que se produce durante la fabricación del alimento es la provocada por la temperatura durante el proceso de extrusión. Esta pérdida esta calculada en alrededor de un 10%. Por lo tanto, para asegurar la disponibilidad de 80 ppm en el alimento final se deberá agregar un exceso de un 10%, vale decir formular el alimento con 88 ppm.

2. **PERDIDA DE PIGMENTO POR ALMACENAMIENTO DEL ALIMENTO**

Una vez preparado el alimento, se producirá una pérdida de pigmento por almacenamiento del pellet, que esta calculada en promedio en unos 0,25 ppm por día para una concentración de 80 ppm. Vale decir, para una producción de 15 días entre la fabricación y el consumo, tendremos en promedio una pérdida de 3,75 ppm de astaxantina, es decir alrededor de un 4,7% del valor inicial.

- **AHORRO DE PIGMENTO POR LA INCORPORACION DEL CARRIER**

Considerando una eliminación de los puntos 1 y 2 de estas pérdidas con la adición del carrier, se lograra un 14,7% de ahorro en astaxantina.

Por una parte se elimina la pérdida por extrusión, toda vez que la astaxantina disuelta en el carrier es adicionada post- extrusión, adicionalmente se ha demostrado que la adición del carrier aumenta la estabilidad de la astaxantina en el alimento, eliminando las pérdidas por almacenamiento.

- MENORES COSTOS DE PRODUCCION DE ALIMENTO CON PIGMENTOS SINTETICOS CON 10% DE ASTAXANTINA E INCORPORACION DE CARRIER

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, actualmente para lograr una dieta que a los 15 días de fabricación tenga 80ppm de astaxantina, se deberá formular un alimento con 93 ppm de astaxantina (0,93 Kgs de pigmento por tonelada de alimento). Ya que en este alimento se perderán 9,3 ppm por extrusión y 3,70 ppm por pérdida de estabilidad a los 15 días

Con la utilización del carrier, para formular la misma dieta y tener los mismos resultados de pigmentación final, deberíamos formular solo con 82 ppm (0,82 Kgs de pigmento por tonelada de alimento), considerando que no tendremos perdida por extrusión, ni por almacenamiento. Por lo tanto el ahorro que se producirá por tonelada por concepto de menor consumo de pigmento es de USD 41,32 por tonelada de alimento.

Ppm astaxantina	Pigmento (xTon alimento) KGS	Costo pigmento (xTon. Alimento) USD	Carrier (xTon. Alimento) KGS
93	0,93	182,95	0,0
82	0,82	161,31	2,88
<b>AHORRO</b>	<b>0,11</b>	<b>21,64</b>	

Para las 800.000 toneladas de alimento producidas anualmente, se tendrá un ahorro por este concepto de más de 17 millones de dólares, que deberán ser distribuidos entre ahorro real para el productor de alimento y el gasto por el consumo de 2.304 toneladas de carrier (192 ton/mes)

## REFERENCIAS

A.O.A.C. Association of Oficial analytical Chemist. 1995. Methods of Analysis. 16<sup>th</sup> Edition, AOAC International. Virginia, USA.

SAS Institute, 1985, SAS® User's Guide: statistics, 5º edit. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Steel, R., y J.H. Torrie, 1980. Principles and Procedures of statistic a Biometrical Approach, 2<sup>nd</sup> De. McGraw-Hill Book Co.

CARES, R., H. LOPEZ. 1997. Evaluación de la eficiencia de pigmentación a diferentes concentraciones en alimento peletizado de trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss* cultivada en agua dulce. Universidad de Los Lagos. 60p.

CHOUBERT, G., T. STOREBAKKEN. 1989. Dose response to astaxanthin and canthaxanthin pigmentation of rainbow trout fed various dietary carotenoid concentrations. *Aquaculture* 81: 69-77.

CHOUBERT, G., T. STOREBAKKEN. 1996. Digestibility of astaxanthin and canthaxanthin in rainbow trout as affected by dietary concentration, feeding rate and water salinity. *Ann Zootech* 45: 445-453.

CHRISTIANSEN, R., G. STRUKSNAES, R. ESTERMANN, O. J. TORRISSEN. 1995. Assessment of flesh colour in atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Aquaculture Research* 26: 311-321.

FOSS, P., T. STOREBAKKEN, K. SCHIEDT, S. LIAAEN-JENSEN, E. AUSTRENG, K. STREIFF. 1984. Carotenoids in diets for salmonids. I. Pigmentation of rainbow trout with the individual optical isomers of astaxanthin in comparison with canthaxanthin. *Aquaculture* 41: 213-226.

HARDY, R., E. CASTRO, A. CAPDEVILLE. 1994. Pigmentations of salmonids: sources, retention, programs and regulations. Documento Técnico Fundación Chile. Santiago, Chile.

MARCH, B. E., C. MACMILLAN. 1996. Muscle pigmentation and plasma concentrations of astaxanthin in rainbow trout, chinook salmon, and atlantic salmon in response to different dietary levels of astaxanthin. *The Progressive Fish-Culturist* 58: 178-186.

NICKELL, D. C., N. R. BROMAGE. 1997. Problems of pigmentation: lipids and maturation. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Stirling FK9 4LA.

NICKELL, D. C., N. R. BROMAGE. 1998. The effect of timing and duration of feeding astaxanthin on the development and variation of fillet colour and efficiency of pigmentation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 169: 233-246.

.A.S. STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. 1996. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

SINNOTT, R. 1989. Keep them in the pink to stay competitive. *Fish Farmer* 12: 23, 26.

SMITH, B. E., R. W. HARDY, O. J. TORRISSEN. 1992. Synthetic astaxanthin deposition in pan-size coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 104: 105-119.

SOKAL, R. R., F. J. ROHLF. 1969. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Ed: W.H. Freeman and Company. San Francisco, E.E.U.U.

STOREBAKKEN, T., G. CHOUBERT. 1991. Flesh pigmentation of rainbow trout fed astaxanthin or canthaxanthin at different feeding rates in freshwater and saltwater. *Aquaculture* 95: 289-295.

STOREBAKKEN, T., P. FOSS, I. HUSE, A. WANDSVIK, T.B. LEA. 1986. Carotenoids in diets for salmonids. III. Utilization of canthaxanthin from dry and wet diets by atlantic salmon, rainbow trout and sea trout. *Aquaculture* 51: 245-255.

TELLEZ, V. M. A. 1998. Dinámica de pigmentación en *Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo salar* en fase marina de cultivo. Tesis, M.V. Universidad Austral de Chile, Facultad Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.

**AGOSTO 2006-08-07**

**SPES S.A.**

**INFORMACION COMPLEMENTARIA**

**PROYECTO FONTEC**

**EVALUACION DE UN VEHÍCULO DE ORIGEN  
LIPIDICO PARA ADICIONAR EL PIGMENTO  
ASTAXANTINA EN LA DIETA DE SALMONES.**

**CÓDIGO 203-3566**

**INFORMACION COMPLEMENTARIA**

**1.- COSTOS DE LA ETAPA DE AGUA DE MAR**

Para la realización de la última etapa del proyecto, proyectada en agua de mar, SPES se encontró ante la dificultad de contar con un centro experimental que se adecuara debidamente a las condiciones de la prueba. El lugar escogido debía contar con jaulas de experimentación, con monitoreo instrumental y personal idóneo.

Luego de una búsqueda, se comprobó que la única instalación que reunía estos requisitos era la de EWOS Innovation, ubicado a las afueras de la ciudad de Puerto Montt.

Otras posibilidades consistían en la realización de la prueba en unidades productivas como la de Pacific Star u otras salmoneras, que mostraron su interés, pero no cuentan con unidades experimentales sino solo con unidades de producción intensiva.

Ante este escenario, se adoptó la decisión de realizar la prueba en las instalaciones experimentales de EWOS, con la condición que la prueba sería manejada por personal de EWOS y que los resultados obtenidos serían de ambas compañías.

El diseño experimental de la prueba, debía además adecuarse a criterios tales que, ambas Compañías pudieran obtener los resultados de su interés.

Para el diseño experimental, se adoptó el criterio que se probaría el efecto del Carrier en dietas clásicas de EWOS, en que se contrastara su metodología de preparación de alimento habitual contra el uso del Carrier, para Astaxantinas naturales como sintéticas.

Se acordó además que los análisis de las muestras serían realizados por EWOS en sus laboratorios, y que los alimentos empleados serían fabricados en EWOS Concepción bajo supervisión de personal de SPES.

La ventaja de este esquema de trabajo, es que los gastos de esta etapa se ven fuertemente reducidos, ya que todo es absorbido por EWOS a excepción de los viajes que contemplan la preparación de los alimentos en Concepción.

La desventaja de este tipo de acuerdo es que el acceso a la información es bastante restringido, incluso al solicitar fotografías correspondientes a la segunda experimental estas aun no han sido entregadas.

## 2.- DETALLE DE GASTOS EFECTUADOS EN ÚLTIMA ETAPA

La realización de la prueba de agua de mar en el centro experimental de EWOS Innovation, se efectuó en el marco de cooperación mutua de ambas empresas, EWOS y SPES, en que cada una de ellas aportó sus conocimientos, infraestructura y materiales, con la finalidad de encontrar un producto de beneficio mutuo, que permita la reducción de costos en la pigmentación de salmones.

Dentro de este esquema, el aporte de EWOS Innovation, consistió en:

1. Preparación del protocolo de prueba en acuerdo con SPES
2. Adquisición de los peces necesarios para la prueba
3. Alimento necesario para la alimentación de los peces en el periodo de la prueba.
4. Control sanitario de los peces
5. Disposición de personal idóneo para el control de la prueba.
6. Disposición de jaulas de experimentación y sus instalaciones anexas por el periodo de prueba.
7. Análisis inicial de los peces: condición general, pigmento en el musculo, color, peso inicial.
8. Análisis final de los peces: condición general, pigmento en el musculo, color, ganancia de peso en el periodo.
9. Entrega de resultados obtenidos a SPES.

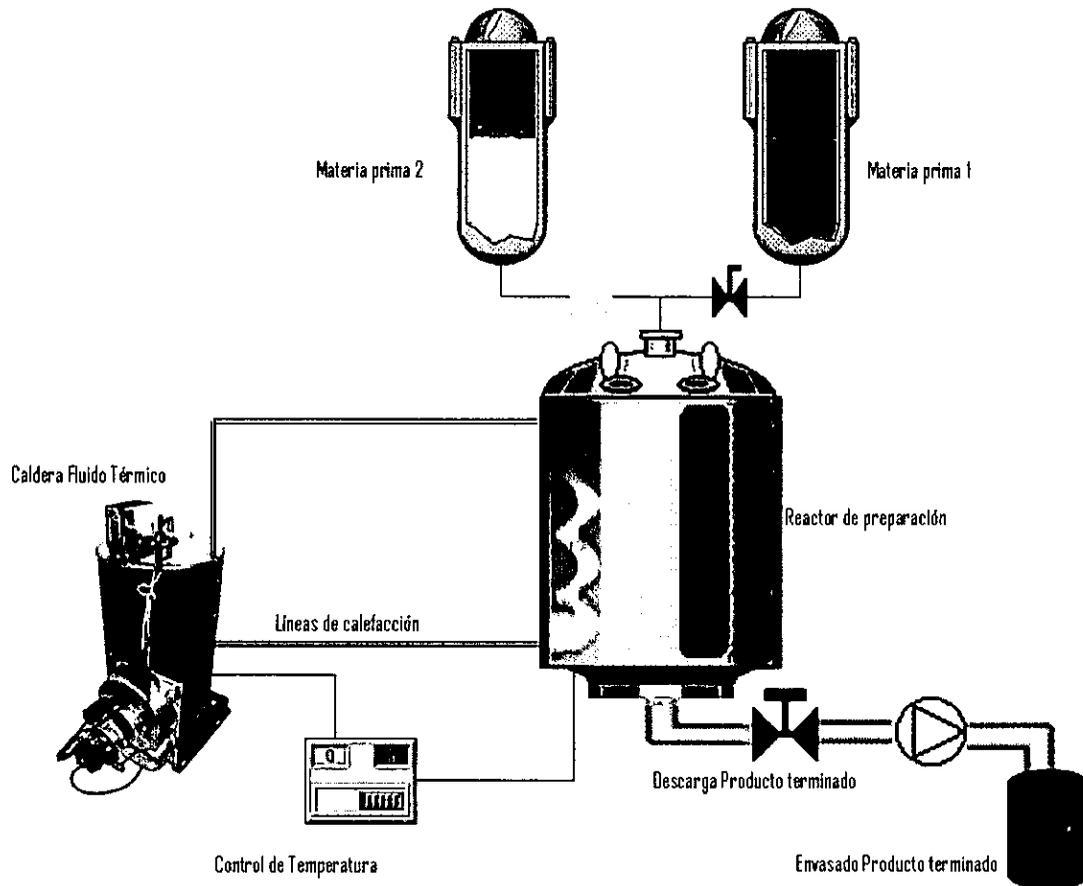
El aporte de SPES dentro de este esquema consistió en:

1. Preparación del protocolo de prueba con aprobación de EWOS
2. Costos de viajes a Concepción para supervisión de la preparación del alimento en planta alimentos EWOS Concepción.
3. Instalaciones necesarias para fabricación de Carrier
4. Carrier necesario para el alimento a prepara para la prueba.
5. Cargos de envío a planta EWOS, Concepción del agitador- dispersador apropiado para mezcla de carrier y pigmento.
6. Análisis de los alimentos preparados a temperatura ambiente y a 40°C: Contenido de astaxantina, contenido de vitamina E, contenido de EPA, contenido de DHA, Índice de Tiobarbitúrico.
7. Costos de viajes a Puerto Montt para discusión de resultados de la prueba.

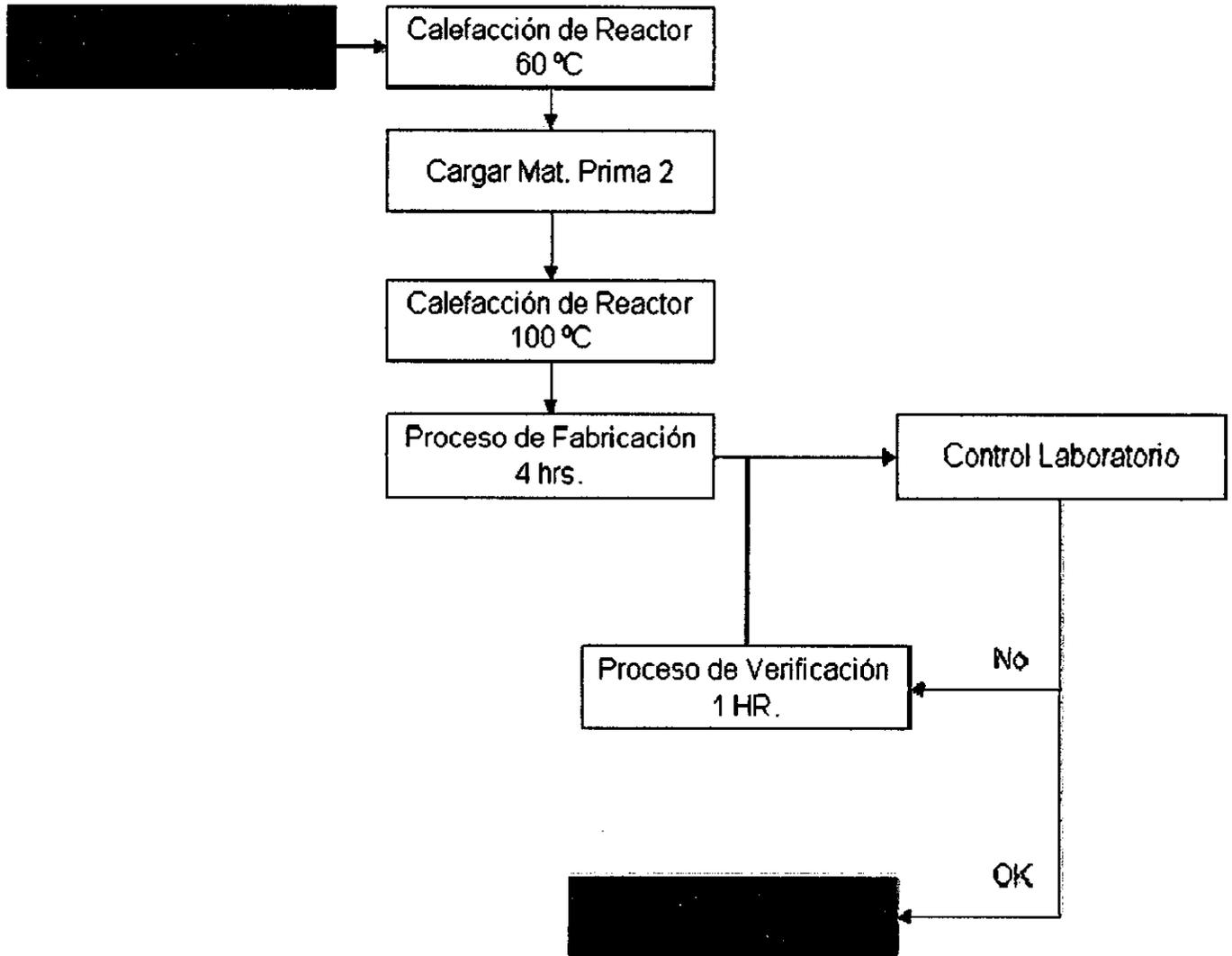
De acuerdo a esto, los gastos de la etapa de agua de mar, fueron financiados de acuerdo a lo informado en el siguiente cuadro, cuyo detalle se encuentra en el informe final presentado por SPES S.A.

ITEM	UNIDAD	FINANCIADO POR
<b>Etapas 5: Prueba de Jaulas (Fase Piloto)</b>		
Peces	Unid.	EWOS
Vacunas IPN	Unid.	EWOS
Viajes 2 personas		
Viaje Santiago -Concepcion	Unid.	SPES
Estadia	Dias	SPES
Comida Movilizacion	Dias	SPES
Viaje Santiago -Puerto Montt	Unid.	SPES
Estadia	Dias	EWOS
Comida Movilizacion	Dias	EWOS
Alimento para peces	Kilos	EWOS
Análisis peces		
Color	Análisis	EWOS
HPLC pigmento	Análisis	EWOS
Humedad	Análisis	EWOS
Grasa	Análisis	EWOS
Análisis alimento		
HPLC pigmento	Análisis	SPES
Químico proximal	Análisis	SPES

2.- ESQUEMA DE PLANTA DE PREPRACION DE CARRIER LIPIDICO



3.- DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESO



4.- INFORME ORIGINAL RESULTADOS EWOS

**EWOS**

***Innovation***

knowledge makes the difference

**Use of a lipid base carrier for the inclusion  
of dietary natural astaxanthin  
after extrusion**

Javier Gonzalez  
EWOS Innovation Chile  
April 12, 2006

**Objectives**

- Evaluate if a locally produced lipid-based carrier for astaxanthin is a suitable vehicle for the addition of natural astaxanthin (AquAsta) after extrusion.
- Study if the synthetic astaxanthin retention in the flesh is improved by the use of the lipid-based carrier.
- Compare the stability of the astaxanthin in the feed when added through a lipid-based carrier versus the EWOS coating system.

**EWOS**

***Innovation***

## Materials and Methods

- Fish: ATS (*S. salar*); 0.9 kg to 1,7 kg
- Trial period: started: 19-25/10/05; finished: 4-11/01/06
- Location: Colaco exp.unit (sea cages); 1000 fish per cage.
- Sea water conditions: temperature: 13° C (average)
- Treatments: 4 treatments; 4 (T1) and 3 (T2, T3 and T4) replicate cages each.

Table 1: Description of treatments:

	Treatments			
	1	2	3	4
Carophyll Pink (1%), ppm asta (Omega 600/1500)	40/50			
Carophyll Pink (8%), ppm asta (Omega 600/1500)				40/50
AquAsta .8%, ppm asta (Omega 600/1500)		44/55	40/50	
Lipid Carrier, %	-	-	4.5	0.45
Pigment added through	Coater EWOS Standard	Mixer/Pre- Extrusion Standard EWOS	Coater/After dissolving pigment in carrier	Coater/After dissolving pigment in carrier

## Materials and Methods (cont')

- Description of treatments:
  - Treatment 1: the feed was manufactured under standard EWOS Chile procedures. The astaxanthin source used was Carophyll Pink® 8%.
  - Treatment 2: AquAsta® (.8%) (Phaffia yeast) from Igene was used as a natural source of astaxanthin and added pre-extrusion with a 10% extra inclusion rate. This is the standard EWOS Chile procedure for natural asta inclusion into the feed.
  - Treatment 3: AquAsta® (.8%) was incorporated into the Oilmix after thoroughly mixing the pigment with a lipid based carrier. The amount of carrier used was equivalent to 4.5 and 5.6% of the diet for the Omega 600 and 1500, respectively.
  - Treatment 4: Carophyll Pink® 8% was thoroughly mixed and dissolved in the lipid based carrier under investigation before inclusion into the Oilmix. The amount of carrier used was equivalent to .45 and .56 % of the diet for the Omega 600 and 1500, respectively.
- The feeds were assayed for astaxanthin content at 0 days after manufacture and thereafter at weeks 2, 4, 6, 8 and 12. During this period the feeds were maintained at room temperature (aprox. 20° C) in sealed but not vacuum packed black polyethylene bags.
- Astaxanthin stability in the feed was determined by calculating the percentage loss of the pigment in the feed after 12 weeks of storage.

## Materials and Methods (cont´)

- Initial and Final Sampling:
  - 120 fish per replicate for individual weight.
  - 40 fish per replicate for NQC sampling. The NQC were pooled by fish weight for further analysis.
- Variables Calculated
  - WG, SGR, FCR.
  - NQC: Astaxanthin content (mg/kg), color (Salmofan), Minolta (L, a, b, chroma and Hue), % lipid and % humidity.

**EWOS***Innovation*

## Statistical Analysis

- The data for fish performance and color in muscle were submitted to ANOVA. The Least Significant Difference (LSD) test was used for treatment mean comparisons when  $p < .05$ .
- In the case of the pigment analysis in feed during storage, each treatment and sub-sample combination measured over 6 dates was treated as a repeated measure. Data was analysed using SPSS v13.0, mixed models and was expressed as the log of the amount of astaxanthin remaining at each time as a percent of the amount found at week 0 for that time and subsample combination.
- The data for astaxanthin deposition in muscle was analyzed by a GLM model using the weight of the fish in the pool as a covariate.

**EWOS***Innovation*

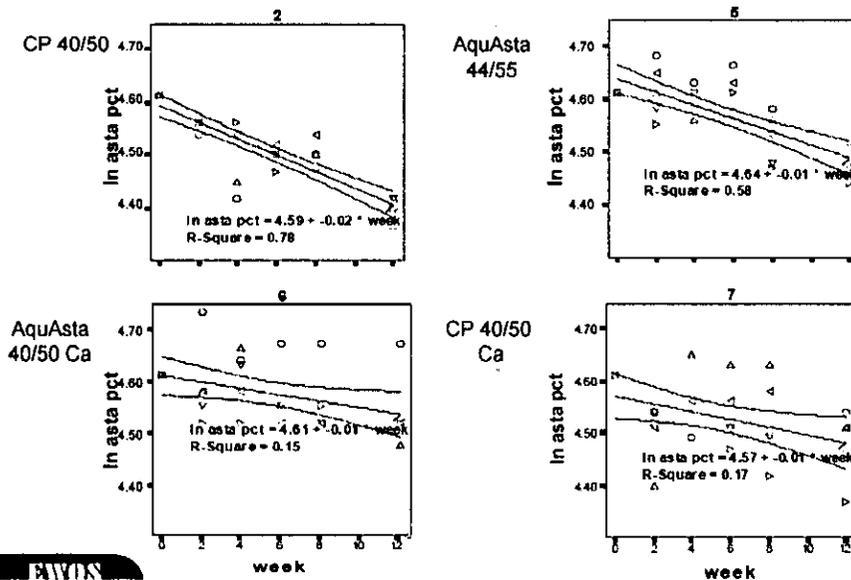
Table 4: Stability of astaxanthin in the feed (Omega 600)<sup>1</sup>:

Week of Storage	Treatments			
	CP 40/50	AquAsta 44/55	AquAsta 40/50 Carrier	CP 40/50 Carrier
0	48.2 ± .45	40.0 ± 1.22	34.0 ± 1.73	45.0 ± 1.87
2	46.0 ± .71	40.4 ± 1.52	33.4 ± 1.14	40.6 ± 3.44
4	43.6 ± 2.97	39.6 ± .55	34.0 ± 2.0	41.8 ± 2.05
6	43.2 ± .45	40.0 ± .71	32.4 ± .89	42.0 ± 1.22
8	43.2 ± 1.1	36.8 ± 1.48	32.2 ± .84	41.6 ± 1.82
12	39.4 ± .89	35.0 ± .71	31.8 ± 1.1	39.6 ± 1.52
% loss	18.26	12.5	6.47	12.0

Note: Statistical analysis not performed yet.  
<sup>1</sup>Values ± SD



Figure 1: Best fit curve for astaxanthin levels in feed during 12 weeks storage for different pigment regimes<sup>1</sup>:



<sup>1</sup>Data was expressed as the log of the amount of astaxanthin remaining at each time as a percent of the amount found at week 0 for that time and subsample combination.

## ¿Reduce el carrier la tasa de degradación de astaxantina en el alimento?

- En relación a la diapositiva anterior (Figura 1), el análisis estadístico indica que el carrier no influye significativamente ( $p = 0.566$ ) en la tasa de degradación de astaxantina en el alimento al compararlo con Carophyll Pink o Aquasta.
- Aún cuando numéricamente si se aprecia una diferencia en favor del carrier, la alta variabilidad en los datos aumenta el error y hace que esta diferencia no sea significativa ( $p > 0.05$ ).

EWOS

Innovation

**Table 5:** Performance results of *Salmo salar* fed diets supplemented with different sources of astaxanthin and pigment application technologies:<sup>1</sup>

	CP 40/50	AquAsta 44/55	AquAsta 40/50 Carrier	CP 40/50 Carrier
Initial weight, kg	.909 ± .06	.931 ± .03	.944 ± .05	.863 ± .03
Final weight, kg	1.671 ± .09	1.724 ± .09	1.675 ± .003	1.694 ± .13
Weight gain, kg	.761 ± .03	.793 ± .09	.732 ± .05	.831 ± .10
SGR	.794 ± .02	.803 ± .08	.749 ± .07	.877 ± .06
FCR	1.080 ± .04	1.101 ± .07	1.137 ± .13	.980 ± .10

<sup>1</sup>Values ± SD  
NS  $p > 0.05$

EWOS

Innovation

Figure 2: Results for SGR (tasa de crecimiento específico) y FCR (conversión de alimento):

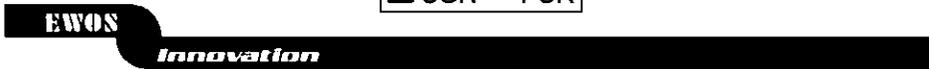
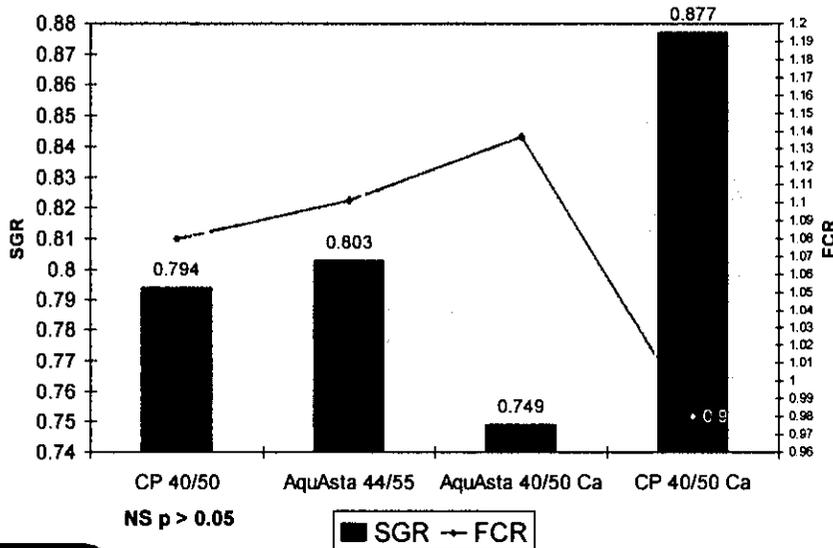
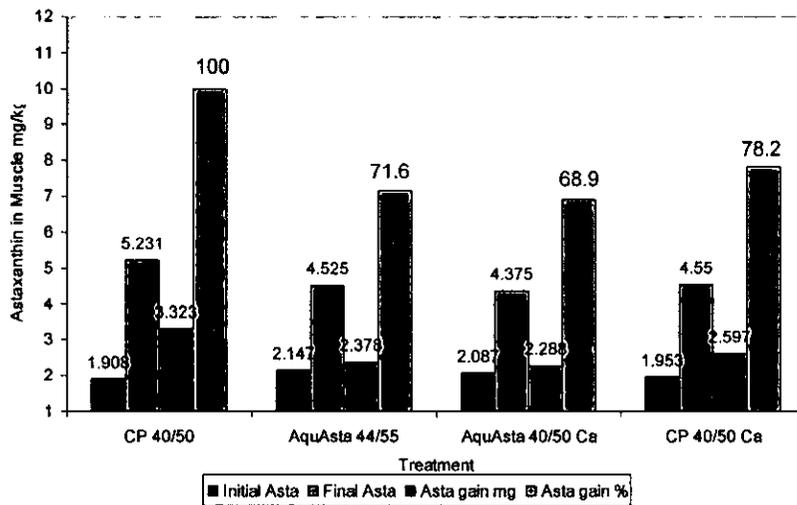
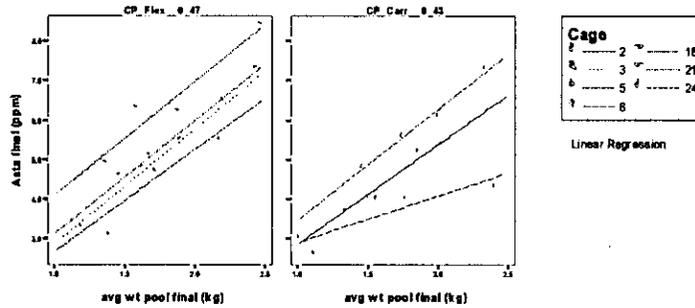


Figure 3: Astaxanthin content (mg/kg) and retention (%) in muscle:



¿Hay alguna diferencia entre la adición de pigmento por Flex Coating y Carrier para Carophyll Pink en la concentración de astaxantina en músculo (ppm) al final del estudio?



La interacción entre tratamiento y peso de los peces es significativa ( $p = .04$ ), lo cual significa que los peces alimentados con una dieta en la cual el pigmento fué adicionado con carrier tendieron a aumentar los niveles de astaxantina en músculo a una tasa mas lenta que en el caso de la adición convencional (flex coating).

Type III Tests of Fixed Effects(a)

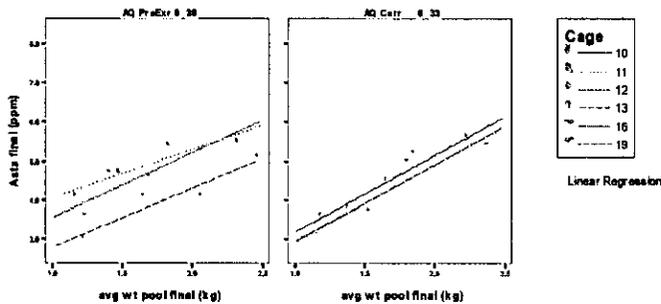
Source	Numerator df	Denominator df	F	Sig.
Intercept	1	6.1	132.9	.000
Treatment	1	6.1	.0	.877
poolwtgfinal12	1	19.4	130.0	.000
Treatment * poolwtgfinal12	1	19.4	4.8	.040

a. Dependent Variable: Asta final (ppm).

EWOS

Innovation

¿Hay alguna diferencia entre la adición de AquAsta pre-extrusión y el uso del carrier en la concentración de astaxantina (ppm) en músculo al final del estudio?



En esta comparación, no se ve un efecto significativo ni para tratamiento ( $p = .346$ ) ni para la interacción ( $p = .100$ ). Por lo tanto, cuando se adiciona Aquasta, los peces acumulan astaxantina en el músculo a una misma tasa ya sea si el pigmento se adiciona pre-extrusión o vía un carrier.

Type III Tests of Fixed Effects(a)

Source	Numerator df	Denominator df	F	Sig.
Intercept	1	5.8	382.0	.000
Treatment	1	5.8	1.0	.346
poolwtgfinal12	1	16.2	117.3	.000
Treatment * poolwtgfinal12	1	16.2	3.0	.100

a. Dependent Variable: Asta final (ppm).

EWOS

Innovation

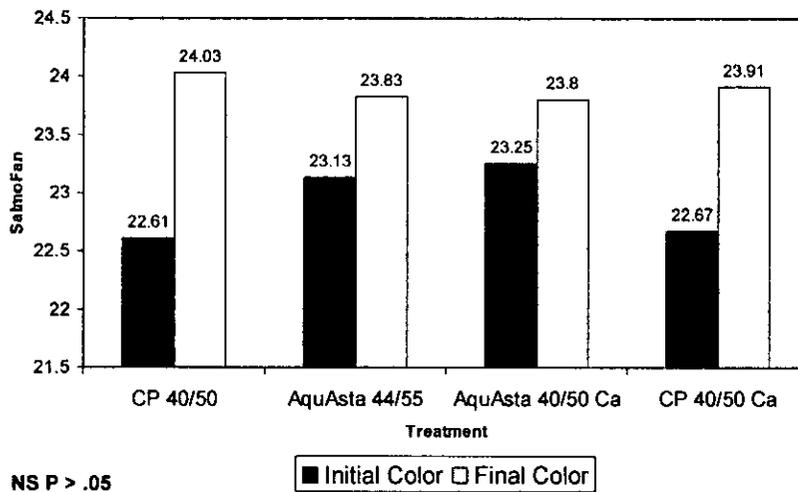
Table 6: Instrumental color measurements in NQC at the end of the first growing period:

	CP 40/50	AquAsta 44/55	AquAsta 40/50 Carrier	CP 40/50 Carrier
L	39.83	38.71	39.23	40.13
a	7.68	7.57	7.30	7.53
b	9.84	8.90	9.35	10.15
Chroma	12.53	11.72	11.89	12.67
Hue	52.18	49.67	52.08	53.65

P > 0.05 NS



Figure 4: Color measurements in muscle (SalmoFan):



NS P > .05

■ Initial Color □ Final Color



### Resultados y Discusión

- The performance of fish (SGR and FCR) did not differ significantly ( $p > .05$ ) between treatments. However, the SGR was numerically lower and the FCR less efficient in the treatment where the lipid based carrier was included at 4.5 to 5.6% of the diet ( $p > .05$ ). The chemical composition of the carrier is not known by EWOS, however, it is supposed to be a mixture of lipid emulsifiers. At high inclusion rates in replacement of the OilMix, the carrier may have lowered the DE of the diet, what would explain the results observed in fish performance.
- The rate of astaxanthin deposition in muscle was significantly lower ( $p < 0.05$ ) for fish fed diets supplemented with Carophyll Pink added by the lipid based carrier as compared to conventional EWOS method (Flex Coating). When using Aquasta the rate of astaxanthin deposition in muscle was not different ( $p > 0.05$ ) between the pigment added through a carrier or pre-extrusion. Thus, it can be concluded that the lipid based carrier evaluated in this study does not improve asta retention in muscle.
- The stability of asta in the feed was not significantly improved ( $p > 0.05$ ) by the carrier. Although the data shows numerical differences in favor of the use of the carrier, the high variability in the results makes this difference not significant.
- The color measurements (Salmofan and Minolta instrumental) performed on the NQC (Norwegian Quality Cut) did not show any significant difference between treatments ( $p > .05$ ).

**EWOS***Innovation*