

INFORME TECNICO Y DE GESTIÓN FINAL

EJECUTOR:

Nombre	Universidad Santo Tomás
Giro	Universidad
Rut	
Representante	Jaime Vater Gutierrez

NOMBRE DEL PROYECTO: Inmunoestimulantes para la industria salmonera a partir de cultivos sustentables de microalgas

CODIGO: PYT 2016-0339

Nº INFORME: FINAL

PERIODO: desde 30/06/2016 hasta 31/08/2016

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

Nombre	Katia Nicole Ehrenfeld Stolzenbach
Rut	
Firma	



1 CONTENIDO

2	RESUMEN EJECUTIVO	5
3	TEXTO PRINCIPAL	6
3.1	Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.	6
4	Cumplimiento de los objetivos del proyecto	8
4.1	Descripción breve de los resultados ESPERADOS VERSUS LOS OBTENIDOS, comparación con los objetivos planteados, y razones que explican las discrepancias (ANÁLISIS DE BRECHA)	8
4.2	Descripción breve de los impactos obtenidos	8
5	Aspectos metodológicos del proyecto:	9
5.1	Objetivo 1: Establecer las condiciones de cultivo en que las microalgas seleccionadas generan mejores tasas de producción de β -glucano en sistemas intensivos.	9
5.2	Objetivo 2: Obtener biomasa de microalga producida en condiciones semi-industriales con características bromatológicas y bioquímicas aceptadas por el mercado y con efecto inmunoestimulante probado en salmónidos.	14
5.2.1	Objetivo 2.1.- Obtener biomasa de microalga producida en condiciones semi-industriales con características bromatológicas y bioquímicas aceptadas por el mercado.....	14
5.2.2	Objetivo 2.2.- Pruebas del efecto inmunoestimulante de la biomasa microalgal en salmónidos.....	15
5.3	Objetivo 3: Obtener un prototipo comercial de inmunoestimulante en base a microalgas para salmónidos	22
6	Descripción de las actividades PROGRAMADAS y tareas EJECUTADAS para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias. (ANÁLISIS DE BRECHA).	25
7	Resultados del proyecto: descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión; utilizando gráficos, tablas, esquemas y figuras y material gráfico que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.....	28
7.1	Logro de Hitos. Se deberá hacer un completo y detallado análisis y reflexión en cuanto al avance, cumplimiento o eventual atraso del hito definido para el periodo. (ANÁLISIS DE BRECHA DE HITOS) 28	
7.2	Actualizar análisis económico con y sin proyecto	30

7.3	Análisis de impacto logrado a la fecha	32
7.4	Resultados e impactos	35
7.4.1	Resultados Esperado 3.7. Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de B-glucano con actividad inmunoestimulante por gramo de microalga	35
7.4.2	Resultado Esperado 3.8. Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de biomasa microalgal con actividad inmunoestimulante.....	38
7.4.3	Resultado Esperado 3.9. Un protocolo optimizado de cultivo de bajo costo a escala productiva (5000 m3 = 5 Ha estanque).....	40
7.4.4	Resultado Esperado 4.10. Biomasa de microalgal producida bajo condiciones optimizadas de producción.....	41
7.4.5	43
7.4.6	Resultado Esperado 4.11. Especies de microalgas que permitan obtener una mayor sobrevivencia de alevines de salmón respecto del grupo control en un ensayo de desafío con P.salmonis, tras haber sido alimentadas con una dieta suplementada con soya.....	43
7.4.7	Resultado Esperado 4.12. Especie de microalgas con capacidad de mejorar el fitness de peces alimentados con una dieta estresante en soya, comparado con el producto de β -glucano comercial.....	49
7.4.8	Resultado Esperado 5.13. A escala productiva, producción de una biomasa rentable de microalga seca para desarrollar el prototipo comercial.....	60
7.4.9	Resultado Esperado 5.14. Reuniones comerciales con posibles clientes de la industria salmonera y de alimentos para animales.....	62
7.4.10	Resultado Esperado 5.15. Empresas de la industria salmonera demuestran su interés en este producto y nos solicitan cotizaciones comerciales.....	63
7.4.11	Resultado Esperado 5.1.6. Producto comercial con un precio menor o igual al de β -glucanos de levadura actualmente comercializada	64
7.5	Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.....	64
8	Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.	
	66	
8.1	Charla.....	66
8.2	Prensa escrita	72

8.3	Publicaciones científicas	74
8.4	Productores participantes.....	76
9	Conclusiones	77
10	Recomendaciones	78
11	Otros aspectos de interés	78
12	Anexos	79
13	Bibliografía Consultada.....	79

2 RESUMEN EJECUTIVO

El proyecto FIA PYT 2016-0339 tenía como objetivo evaluar la factibilidad de utilizar las microalgas como fuente sustentable de inmunoestimulantes para la industria salmonera. El proyecto estaba basado en la capacidad de las microalgas de sintetizar y acumular el polímero de glucosa con enlaces tipo beta (β -glucano), polímero que es utilizado por la industria salmonera y actualmente es incluido en las dietas, pero es obtenido desde levadura de cerveza. Los resultados obtenidos sugieren que la microalga seleccionada por acumular mayores cantidades de β -glucano (A1), no presentó un efecto inmunoestimulante en los peces y de hecho, en ensayos de engorda, mostró tener un efecto negativo sobre el aumento de peso de truchas, respecto a las otras dietas evaluadas.

Una segunda especie de microalga evaluada, la cual que no acumulaba β -glucanos (A2), fue incluida en dietas de salmónidos, basándonos en resultados previos obtenidos en el modelo biológico de laboratorio pez cebra. En peces de Salmón atlántico alimentados con una dieta que contenía esta especie y proteína de soya, observamos un efecto de protector intestinal. A su vez, en un ensayo de desafío con el patógeno *P. salmonis*, este mismo grupo de peces se comportó igual al control, es decir, la microalga no induce efectos negativos sobre los peces. Finalmente, en ensayos de engorda realizados en trucha arcoíris, encontramos que los grupos alimentados con la dieta que contenía esta especie tuvieron un mejor rendimiento en crecimiento y engorda que la dieta que contenía el β -glucano comercial.

En paralelo, se realizaron pruebas de producción de las microalgas a nivel productivo, en asociación con la Universidad de Antofagasta. Los resultados obtenidos sugieren que es posible producir la microalga a un costo de USD 13/kg de biomasa seca. Por la posología evaluada y los costos de producción de la biomasa microalgal, el producto inmunoestimulante basado en microalgas no logra ser competitivo, ya que su costo de producción supera en 50 veces el precio de venta del β -glucano comercial. Serán necesarias nuevas pruebas para evaluar si con menores cantidades de microalga es posible generar un efecto similar en peces y/o bajar los costos productivos de microalgas, para lograr contar con un producto interesante para el mercado.

3 TEXTO PRINCIPAL

3.1 BREVE RESUMEN DE LA PROPUESTA, CON ÉNFASIS EN OBJETIVOS, JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO, METODOLOGÍA Y RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS.

En Chile la industria salmonera se viene levantando luego de sufrir una grave crisis sanitaria debido al brote de ISAv. En cultivos intensivos de salmónidos, la manipulación, el confinamiento y las condiciones químicas y físicas propias del sistema producen estrés fisiológico y daño físico a los peces, aumentando el riesgo de mortalidad por microorganismos oportunistas o agentes patógenos.

Uno de los focos de atención de la industria acuícola está en la prevención de estas enfermedades estimulando el sistema inmune del pez, ya sea a través de vacunas, pre/pro-bióticos o inmunoestimulantes. Uno de los compuestos descritos por su capacidad de estimular el sistema inmune innato de los peces y que es actualmente utilizado en la industria acuícola es el β -glucano extraído de la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae*. La aplicación de profilácticos como los β -glucanos durante las etapas tempranas de desarrollo mejora la salud de los peces, estimulando principalmente al sistema inmune no-específico para crear una defensa contra patógenos virales, bacterianos y fúngicos. En la naturaleza estos β -glucanos pueden ser encontrados en distintos organismos. Sin embargo, las microalgas pueden acumular más cantidad que las levaduras y según estudios preliminares, tendrían mayor efecto inmunoestimulante que sus homólogos de levadura.

Así nace el proyecto “Inmunoestimulantes para la industria salmonera a partir de cultivos sustentables de microalgas” financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) del ministerio de Agricultura de Chile.

En el marco de este proyecto, se seleccionaron especies de microalgas acumuladoras de β -glucanos y se estandarizaron las condiciones de cultivo para optimizar el rendimiento en biomasa y β -glucano. Con estas mejores condiciones, se ensayaron cultivos masivos para evaluar el rendimiento real y los costos de la producción de las microalgas. Además, se realizaron ensayos en laboratorio utilizando el modelo de pez cebra y posteriormente pruebas en alevines de trucha y de salmón atlántico, evaluando la capacidad inmunoestimulante de estos productos microalgales.

El desarrollo de la tecnología de producción de las microalgas se llevó a cabo con el apoyo de la Universidad de Antofagasta, con amplia experiencia en la producción de microalgas. Además, contamos con el apoyo de Salmones Antártica S.A., quienes producen hoy salmones a gran escala sin uso de antibióticos, basándose principalmente en mejores manejos de los cultivos y la incorporación de aditivos nutricionales en toda la vida del pez.

Los resultados obtenidos sugieren que se identificó una especie de microalga que fue capaz de inducir una positiva respuesta inmunitaria en peces medida a través de la expresión de genes asociados a inmunidad, cuantificados mediante qPCR y que mostró una tendencia similar o superior a la observada utilizando el β glucano comercial obtenido desde levadura de cerveza. A su vez, la dieta que contenía esta microalga no afectó el proceso de engorda y factor de conversión de los peces evaluados. Al realizar un ensayo de desafío con la bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis* en alevines de salmón atlántico, obtuvimos igual mortalidad que el control sin microalga.

Este proyecto buscó generar un nuevo y mejor producto inmunoestimulante basado en microalgas, para fortalecer el desempeño de salmones y otros animales de alta producción, frente a enfermedades patógenas y manejo de estrés. Nuestros resultados sugieren que la inclusión de biomasa microalgal en el alimento de alevines genera una respuesta inmunitaria en el pez, alcanzando niveles similares a los registrados con el inmuno-estimulante comercial. Sin embargo, los costos de producción de microalgas calculados dentro del proyecto señalan que aún es necesario trabajar en la tecnología de producción y obtención de biomasa microalgal, para que este producto llegue a ser económicamente competitivo en relación a la alternativa existente en el mercado.

4 CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

4.1 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS RESULTADOS ESPERADOS VERSUS LOS OBTENIDOS, COMPARACIÓN CON LOS OBJETIVOS PLANTEADOS, Y RAZONES QUE EXPLICAN LAS DISCREPANCIAS (ANÁLISIS DE BRECHA)

Este proyecto PYT 2016-0339 abarcó principalmente la validación final de especies de microalgas previamente seleccionadas en el proyecto PYT 2013-0015 por tres criterios: tasas de crecimiento, acumulación de β -glucanos y actividad inmunoestimulante sobre el modelo biológico de laboratorio pez cebra. Considerando estos tres factores, se seleccionaron dos especies (A1 y A2), principalmente por su efecto de mejora de la respuesta de defensa frente a la enterobacteria *Edwardsiella tarda* en pez cebra. Para ambas especies se cumplía que el subgrupo de peces alimentado con la microalga presentaba una menor mortalidad en el tiempo que el grupo control, así fuera con alimento en base a harina de pescado, o un alimento con una inclusión significativa de harina de soya (50%). De estas especies, A1 acumulaba cantidades significativas de β -glucanos (hasta un 8% en condiciones *in vitro*), en cambio A2 no acumulaba β -glucanos, pero sí otros azúcares de naturaleza desconocida, presumiblemente con estructuras poliméricas, presumiblemente con estructuras poliméricas.

Con el objetivo de poder generar un producto inmunoestimulante basado en estas especies microalgales, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer las condiciones de cultivo en que las microalgas seleccionadas generan mejores tasas de producción de β -glucano en sistemas intensivos
2. Obtener biomasa de microalga producida en condiciones semi-industriales con características bromatológicas y bioquímicas aceptadas por el mercado y con efecto inmunoestimulante probado en salmónidos.
3. Obtener un prototipo comercial de inmunoestimulante en base a microalgas para salmónidos.

4.2 DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS IMPACTOS OBTENIDOS

A nivel de laboratorio, fuimos capaces de establecer las condiciones de cultivo en que se acumula mayor concentración de β -glucanos en la especie A1.

En colaboración con la Universidad de Antofagasta, fuimos capaces de establecer cultivos semi-continuos de ambas especies, con rendimientos de biomasa que

alcanzaron las metas propuestas, y productividades de β -glucano en la especie A1 que alcanzó el 27% de la meta sugerida al comienzo del proyecto.

Los ensayos en alevines de salmónidos sugirieron que la especie A2 tendría un efecto de protección intestinal frente a agentes inductores de irritación como la soya y adicionalmente gatillarían una respuesta inmune en estos teleósteos, determinada mediante el nivel de expresión génica (qPCR). Sin embargo, esta respuesta no lograría un efecto protector frente al patógeno *Pisirickettsia salmonis*. Esta misma especie lograría un crecimiento y factor de conversión superior a la dieta con B-glucano comercial en alevinas de trucha arcoíris.

Finalmente, los análisis sugieren que la producción de esta biomasa inmunoestimulante presenta un costo al menos 50 veces superior al inmunoestimulante de uso actual (β -glucano de levadura), considerando la incorporación de cantidades de producto con efecto similar.

5 ASPECTOS METODOLÓGICOS DEL PROYECTO:

Los aspectos metodológicos del proyecto se desarrollarán según objetivo.

5.1 OBJETIVO 1: ESTABLECER LAS CONDICIONES DE CULTIVO EN QUE LAS MICROALGAS SELECCIONADAS GENERAN MEJORES TASAS DE PRODUCCIÓN DE **B**-GLUCANO EN SISTEMAS INTENSIVOS.

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada

La producción constante de biomasa microalgal de la cepa A1 en sistema de cultivo abierto (7 m³) se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de Antofagasta con el objetivo de determinar la producción de biomasa (g * L⁻¹), calidad en concentración de β -Glucano (%w/w) y estimar el costo de producción a L * Ha de cultivo. Para ello, se inició el escalamiento desde el cultivo a nivel de laboratorio en botellones de 18 L (fig.1), traspasando a sistemas de cultivo cerrado de 0,4 y 1 m³ de capacidad (fig.2 y 3) y terminando su escalamiento en sistema de cultivo abierto tipo raceway de 7,7 m³ de capacidad (fig.4). En las etapas de crecimiento en condiciones outdoor se realizó el monitoreo para estimar la producción en batch y se cosecharon muestras durante el tiempo para analizar la biomasa microalgal en % w/w β -glucano, proteínas, cenizas, lípidos y ácidos grasos.

- Principales problemas metodológicos enfrentados

Se trataron principalmente a problemas ajenos a la metodología, como fue la avería de centrífuga, sistema de secado y la toma de las instalaciones de la Universidad de Antofagasta por los alumnos.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

Los estudios previos en laboratorio nos indicaron que la productividad de β -glucano era mayor cuando la microalga alcanzaba la fase de crecimiento estacionario, en este caso, 4 días posterior al agotamiento de nitrógeno del medio de cultivo. Sin embargo, tras conversar con los colegas de la Universidad de Antofagasta y volver a revisar los niveles de producción de β -glucano, se decidió evaluar en la prueba a gran escala, la productividad en un sistema semi-continuo. Esta decisión fue tomada considerando principalmente los tiempos y costos de producción de cada batch nuevo a generar, como sería el caso de realizar el ensayo esperando la fase estacionaria.

- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

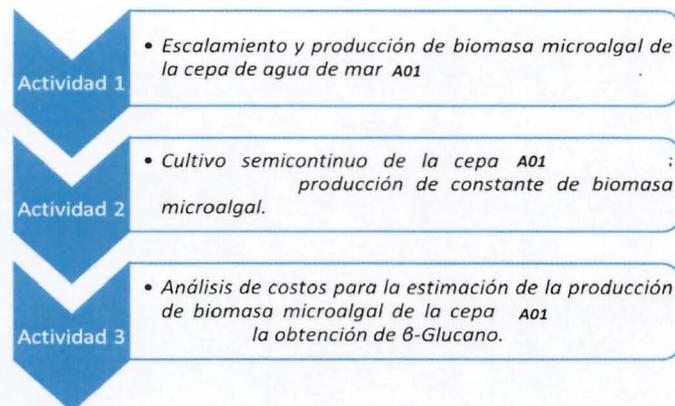


Figura 1. Flujo de actividades en escalamiento de especies de microalgas.

El escalamiento se realizó creciendo la microalga en 3 tipos de sistemas de cultivo, dos cerrados y uno abierto tipo raceway. Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, aireación constante (60 L/min) y fotoperiodo en condiciones ambientales (1/2 día solar en promedio $2500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

La concentración de biomasa (C_b , g/L) se midió filtrando 100 mL de cultivo en un filtro de 47 mm de diámetro y $3 \mu\text{m}$ de poro, secados a 105°C por 2 h. La Productividad volumétrica (P_b , g/Ldía) fue calculada dividiendo la diferencia de C_b por el tiempo de cultivo. La composición del agua de los cultivos fue monitoreada en fosforo por espectrofotometría del complejo fosfo-vanado-molibdato a 882 nm. Los nitratos utilizando el método espectrofotométrico a 220 y 275 nm y el amonio se midió por el método espectrofotométrico a 690 nm.

La biomasa fue recolectada centrifugada y liofilizada, la materia prima y el producto obtenido post cosecha se analizó mediante análisis proximal. El contenido de ceniza se cuantificó mediante gravimetría en una mufla a $550^\circ\text{C} \pm 25^\circ\text{C}$ durante 4 h. Para la cuantificación de lípidos, se utilizará el método Bligh and Dyer según Kochert, (1978). El contenido de proteínas se determinó por el método Lowry modificado por Herbert en 1971 en distintas fases de cultivo, batch y semicontinuo. Cuando el cultivo semicontinuo mantuvo una producción constante (g/L), se utilizó para estimar el costo del producto a un tamaño de planta de 1 Ha, lo cual representa un volumen de producción de 2000 m^3 .



Figura 2. Cultivo inoculo en condiciones de laboratorio - botellones de 20 litros



Figura 3. Fotobiorreactores cerrados 0,4 m³ de capacidad en condiciones outdoor



Figura 4. Fotobiorreactores cerrados 1 m³ de capacidad en condiciones outdoor



Figura 5. Sistema de cultivo abierto tipo raceway – 7,7 m³ de capacidad.

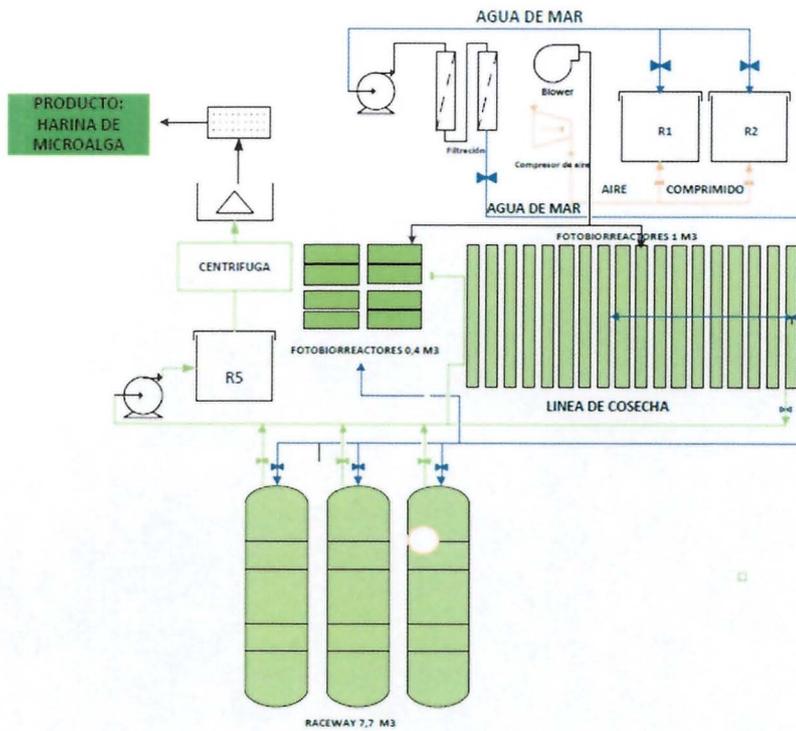


Figura 6. Diagrama del proceso de cultivo y obtención de producto.

5.2 OBJETIVO 2: OBTENER BIOMASA DE MICROALGA PRODUCIDA EN CONDICIONES SEMI-INDUSTRIALES CON CARACTERÍSTICAS BROMATOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS ACEPTADAS POR EL MERCADO Y CON EFECTO INMUNOESTIMULANTE PRUBADO EN SALMÓNIDOS.

El objetivo 2 se puede separar en dos suβ-objetivos:

2.1.- *Obtener biomasa de microalga producida en condiciones semi-industriales con características bromatológicas y bioquímicas aceptadas por el mercado*

2.2.- *Obtener biomasa de microalga producida en condiciones semi-industriales con efecto inmunoestimulante probado en salmónidos.*

A continuación, se desarrolla cada uno de los suβ-objetivos, del objetivo 2.

5.2.1 Objetivo 2.1.- Obtener biomasa de microalga producida en condiciones semi-industriales con características bromatológicas y bioquímicas aceptadas por el mercado

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada

Desde cultivos de 1000 L se obtuvo biomasa seca de las especies A1 y A2 seleccionadas desde el ensayo en pez cebrá. La biomasa fue producida por U. Antofagasta (ex DesertBioenergy), quien nos entregó 2 Kg de microalga secada con el sistema spray.

A su vez, enviamos biomasa para realizar análisis proximal en tres distintos laboratorios de Santiago.

- Principales problemas metodológicos enfrentados

Internamente realizamos los análisis de cuantificación de β-glucanos y adicionalmente solicitamos un segundo análisis, el cual fue realizado externamente por la empresa Granotec, quien usaría el mismo kit de cuantificación Megazyme® pero con diferencias metodológicas respecto a los tratamientos previos, dado que su protocolo está enfocado en granos y no en microalgas. Todos los valores obtenidos por Granotec estuvieron todos bajo los límites, lo que valida la metodología generada durante este proyecto.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

No se generaron.

- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

Las metodologías utilizadas para el análisis bromatológico se encuentran publicadas para cada uno de los laboratorios seleccionados y se ajustan a certificaciones establecidas en el sistema internacional oficial de métodos de análisis A.O.A.C. (www.aoac.org).

5.2.2 Objetivo 2.2.- Pruebas del efecto inmunoestimulante de la biomasa microalgal en salmónidos.

Separamos el objetivo 2.2 en 3 etapas:

2.2.1.- Generación del alimento para alevines

2.2.2.- Ensayo de alimentación de *Salmo salar* con las dietas D1-D3 y posterior desafío con *Piscirickettsia salmonis*

2.2.3.- Ensayo de alimentación Centro Acuícola y Pesquero de Investigación Aplicada (CAPIA) de la Universidad Santo Tomás- Pto. Montt

5.2.2.1 *Etapas 2.2.1.- Generación del alimento para alevines*

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada

El alimento para las pruebas en alevines fue elaborado por el Dr. Adrián Hernández Arias, del Núcleo de Investigación en producción alimentaria de la Universidad Católica de Temuco.

Salmones Antártica, asociado en este proyecto FIA, entregó las dietas bases armadas y las envió hasta Temuco. Luego, en la extrusora de la Universidad de Temuco se realizó la producción de los pellets de un tamaño que oscilaban entre los 2,5 y 5,0 mm, adecuado para los peces de 50 g, y se introdujo el aditivo microalgal en la fase de aceitado.

Dentro de la nueva programación del proyecto, se estipuló la necesidad de contar con un alimento control con el β -glucano utilizado comercialmente. Este producto fue donado gentilmente por Salmofood. Con la colaboración de SASA, se generó la misma mezcla descrita anteriormente en la tabla V y se generaron dos nuevas dietas con soya al 15%: una que incluyera el producto β -glucano comercial y una segunda dieta que incluyera la especie A01 que contaba con mayores cantidades de β -glucano.

- Principales problemas metodológicos enfrentados

Dado a que el proceso de extrusión es realizado utilizando altas temperaturas de trabajo y en general los polisacáridos, como el β -glucano, pierde sus características bajo estas condiciones, definimos incorporar la biomasa microalgal en la fase de aceitado del alimento. Esto nos permitiría mantener las propiedades fisicoquímicas de nuestra materia prima. Sin embargo, este proceso permitió la incorporación de sólo hasta un 1,0% (w/w) de harina de microalga por Kg de alimento, por lo que todas las pruebas posteriores tuvieron esta limitación.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

Los porcentajes de microalga evaluados en alevines de las etapas 2.2.2 y 2.2.3 alcanzaron porcentajes máximos de 1,0% (w/w) de biomasa microalgal sobre el Kg de alimento. No fue posible evaluar mayores concentraciones de microalga, debido a limitaciones tecnológicas que presentaba la metodología seleccionada para la incorporación de la biomasa microalgal en el pellet.

- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

Se utilizó un proceso de extrusión similar al utilizado en la industria de alimentos. El equipo utilizado fue una extrusora de doble tornillo Clextral que permite replicar las condiciones de equipos industriales pero en menores volúmenes. Durante la extrusión, la mezcla de ingredientes se convierte en una fusión para lo que se emplea una combinación de alta temperatura (120-130 °C), alta presión (20-30 bar) y las fuerzas de corte. Esta transformación de los ingredientes se lleva a cabo en el cañón de la extrusora. El secado se llevó a cabo en un secador-extractor de 25 kg de capacidad COMIND, Chile a una temperatura constante de 50°C. El aceitado se hizo en un equipo similar al descrito en Morken y colaboradores (2012). Se adicionó el

aceite a los pellets secos en cantidades de 200-260g Kg⁻¹ utilizando un equipo de vacío (Dinnissen, Sevenum, The Netherlands). El envasado se hizo en sacos de volúmenes de 20 Kg. La comida fue guardada a 4°C hasta el 20 de diciembre de 2015, cuando fue enviado al centro CAPIA en Pto. Montt. Esto para conservar la calidad fisicoquímica de los ingredientes.

Tabla I. Detalle de dietas generadas

Dieta		Descripción
D1	5% Soya	Control alimento standard
D2	15% Soya	Control alta soya
D3	15% Soya + 1% microalga A2	Evaluar efecto especie A2 comparado con dietas D1 y D2
D4	15% Soya + 0,5 % microalga A2	Evaluar efecto especie A2 y comparar con β -glucano comercial
D5	15% Soya + 0,5 % microalga A1	Evaluar efecto especie A1 y comparar con β -glucano comercial
D6	15% Soya + 0,05% β -glucano comercial	Ver efecto β -glucano comercial

5.2.2.2 *Etapa 2.2.2.- Ensayo de alimentación de Salmo salar con las dietas D1-D3 y posterior desafío con Pisirickettsia salmonis*

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada

Este ensayo se desarrolló bajo la tutela del Dr. Ricardo Enríquez, especialista en enfermedades de peces del Laboratorio de Biotecnología y Patología Acuática, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Austral de Chile.

La prueba se realizó en Salmon Clinical Trials en un modelo por cohabitación. La piscicultura experimental posee 24 estanques de 1,0 m³, de los que se utilizaron 6 ubicados separadamente, en 2 sistemas hidráulicos.

- Principales problemas metodológicos enfrentados

Establecer una alianza con laboratorios con experiencia en la cuantificación de la respuesta inmune en peces a través de técnicas moleculares e histoquímicas.

Finalmente, las muestras fueron evaluadas por el laboratorio externo Pathovet de amplia experiencia y prestigio dentro de la industria salmonera. Al ser un laboratorio externo nos aseguramos también el manejo objetivo de los datos.

Elegir la fecha adecuada para las pruebas con salmónidos. Las dos instalaciones seleccionadas no contaban con sistemas de climatización en el área de la piscicultura, por lo que durante el verano se alcanzaban temperaturas de hasta 18-20°C en los estanques, lo que generaba una mayor demanda de oxígeno. Además, por ser época estival, se suscitaban mayores problemas en el seguimiento de los peces, por las vacaciones del personal.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

Por temas presupuestarios se adquirieron los peces de entre 40 y 60 g durante diciembre del 2015. Sin embargo, por temas de manejo de temperatura y oxigenación de los estanques, las pruebas no fueron comenzadas hasta marzo de 2016, lo que significó que los peces alcanzaran tallas de entre 80 y 100 g a esa fecha. Es decir, que las pruebas se realizaran en especímenes con un estado de desarrollo más avanzado, menos dependiente del sistema inmune innato.

- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

La piscicultura experimental de la UACH posee 24 estanques de 1 m³, de los que se utilizarán 6 ubicados separadamente, en 2 sistemas hidráulicos.

Los peces utilizados fueron

Peces: Salmón del Atlántico (*S. salar*) no vacunados

Cepa: desove nacional

Rango de peso: parr SO de 80-100 g

Densidad de cultivo: a definir, entre 12-18 Kg/m³

Réplicas: ensayo en duplicado

Peces controles: peces hermanos del mismo grupo

Inóculo: *Piscirickettsia salmonis* del cepario del Lab de Biotecnología y Patología Acuática.

Condiciones del ensayo: normales de producción agua dulce, se incorpora 15-17% gradual de salinidad hasta el momento del desafío.

- Temperatura: rango 11-14 °C

- Fotoperíodo: 24 horas luz

- Alimentación: Los peces serán alimentados con las dieta indicadas y ofrecida a los peces al 2,0 % de su peso corporal/día, la cantidad de alimento no consumido será cuantificada. Esta se ofrecerá a los peces en ensayo en ración AM y PM.

- Tasa de alimentación: calculada al 2,0 %/día para la fase de alimentación y al 1,0 % en la fase de desafío.

Se medirán los parámetros ambientales diariamente, considerando al menos los rutinarios de SCT, como la temperatura, oxígeno, salinidad y amonio en agua.

Protocolo básico

3 estanques de peces alimentados con tres dietas durante 30 días. Luego los peces de cada dieta serán separados en dos estanques, serán aclimatados y se realizará el desafío por cohabitación (30% de “troyanos”) (Figura 7).

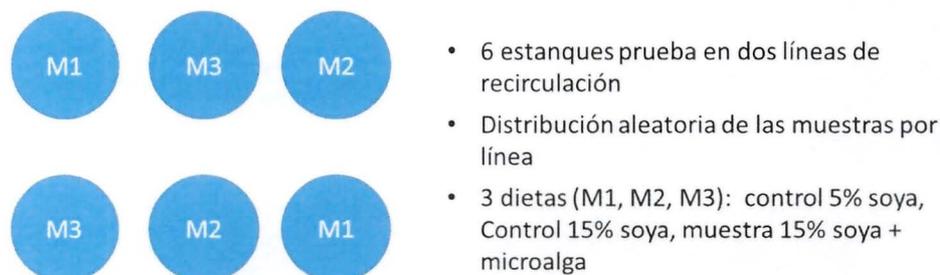


Figura 7. Representación esquemática de los estanques en la prueba UACH. La microalga que se evaluará será la especie A2 al 1% (D3, tabla I).

Medición de parámetros

Medición de parámetros productivos: se midió la tasa de mortalidad diaria, diferenciando la mortalidad general y la causada por *P. salmonis*, a través de diagnóstico clínico y exámenes de laboratorio. Se calcularon las tasas de mortalidad y sobrevivencia y el porcentaje relativo de sobrevivencia.

Medición de parámetros del sistema inmune: se midieron los niveles de la expresión génica por qPCR en peces tratados y controles. La toma de muestras se realizó en los días 0, 7, 14 y 28 de alimentación (figura 8). El día 32 se introdujo un 30% de peces troyanos infectados intraperitoneal con *P. salmonis* para lograr la infección por co-habitación. Durante este proceso no se tomaron muestras, ya que esto afectaría los datos de mortalidad. El ensayo finalizó al lograr un 50% de mortalidad de los peces no troyanos.

Además, de las muestras de qPCR, a los tiempos 0, 7, 14 y 28 de alimentación, se tomaron muestras de intestino anterior y posterior para ver la morfología y largo de las vellosidades intestinales, y tener una idea del efecto protector que podría tener la microalga en estos tejidos en presencia de soya.



Figura 8. Esquema de toma de muestras e infección de todos los estanques.

5.2.2.3 Etapa 2.2.3.- Ensayo de alimentación Centro Acuícola y Pesquero de Investigación Aplicada (CAPIA) de la Universidad Santo Tomás- Pto. Montt

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada

El desarrollo de este ensayo fue liderado por el profesor René Vega Albistur, Biólogo Marino e investigador del CAPIA. Se evaluaron 4 dietas en 8 estanques. Se utilizaron truchas de 80 g promedio y se tomaron muestras para qPCR e histología los días 0, 30 y 60 días de alimentación. En cada evento se tomaron 2 peces por estanque, es decir 4 peces por dieta.

- Principales problemas metodológicos enfrentados

Elegir la fecha adecuada para las pruebas con salmónidos. Las dos instalaciones seleccionadas no contaban con sistemas de climatización en el área de la piscicultura, por lo que durante el verano se alcanzaban temperaturas de hasta 18-20°C en los estanques, lo que generaba una mayor demanda de oxígeno. Además, por ser época estival, se suscitaban mayores problemas en el seguimiento de los peces, por las vacaciones del personal.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

Por temas presupuestarios se adquirieron los peces de entre 40 y 60 g durante diciembre del 2015. Sin embargo, por temas de manejo de temperatura y oxigenación

de los estanques, las pruebas no fueron comenzadas hasta marzo de 2016, lo que significó que los peces alcanzaran tallas de entre 80 y 100 g a esa fecha. Es decir, que las pruebas se realizaran con especímenes con un estado de desarrollo más avanzado, menos dependiente del sistema inmune innato.

La prueba original estaba planificada hasta los 90 días de alimentación. Sin embargo, por el mayor tamaño de los peces y fallas humanas, a los 60 días se produjeron problemas de oxigenación de algunos estanques lo que significó que varios estanques se vieran afectados con altas mortalidades, afectando la representatividad por dieta, por lo que decidimos terminar el experimento en el día 60 de alimentación.

- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

Se evaluaron 4 dietas en 8 estanques. Las dietas fueron todas con 15% (w/w) de soya: con β -glucano comercial (0,05%), sin nada, con microalga al 1 y al 0,5%. Esto nos permitiría evaluar si existe diferencia al incluir la microalga al 0,5 o al 1% y poder estimar mejor nuestra competitividad en el mercado.

Tabla II. Detalle de dietas ensayo CAPIA

Dieta		Descripción
D1	15% Soya	Control alta soya
D2	15% Soya + 0,5 % microalga A2	Evaluar efecto especie A2 y comparar con β -glucano comercial
D3	15% Soya + 0,5 % microalga A1	Evaluar efecto especie A1 y comparar con β -glucano comercial
D4	15% Soya + 0,05% β -glucano comercial	Ver efecto β -glucano comercial

Peces utilizados

Peces: Trucha (*Oncorhynchus mykiss*) no vacunados

Cepa: desove nacional

Rango de peso: parr SO de 80-100 g

Densidad de cultivo: a definir, entre 10-15 kg/m³

Réplicas: ensayo en duplicado

Peces controles: peces hermanos del mismo grupo

Las condiciones del ensayo fueron las normales de producción agua dulce, incorporando 15-17% de salinidad para evitar contaminaciones con hongos.

- Temperatura: rango 11-14 °C

- Fotoperíodo: 16 horas luz, 8 horas oscuridad

- Alimentación: Los peces fueron alimentados con las dietas definidas y ofrecida a los peces de forma gradual, partiendo al 1% de su peso corporal/día para favorecer que se acostumbren al alimento rico en soya. Al mes de alimentación se aumentó la ración en un 0,5% para llegar al 1,5% de su peso. Todo el alimento era consumido y era ofrecido a los peces en ensayo en ración AM y PM.

Se midieron los parámetros ambientales diariamente, considerando al menos los rutinarios de SCT, como la temperatura, oxígeno, salinidad y amonio en agua.

Se tomaron muestras para qPCR e histología los días 0, 30 y 60 días de alimentación. En cada evento se tomaron 2 peces por estanque, es decir 4 peces por dieta.

5.3 OBJETIVO 3: OBTENER UN PROTOTIPO COMERCIAL DE INMUNOESTIMULANTE EN BASE A MICROALGAS PARA SALMÓNIDOS

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada

A escala productiva, producción de una biomasa rentable de microalga seca para desarrollar el prototipo comercial evaluando la productividad volumétrica de biomasa (Qc) de microalga a escala productiva (5.000 L)

- Principales problemas metodológicos enfrentados

Este objetivo fue desarrollado por la Universidad de Antofagasta. Los principales problemas enfrentados fueron 3: fallas técnicas de equipo de primera necesidad en la producción de microalgas, como centrífuga y liofilizador. En segundo lugar la demora en la entrega de los fondos por parte de FIA retrasó el comienzo de la ejecución de estos cultivos. Tercero, una toma de la Universidad por parte de alumnos, impidió el correcto monitoreo de los cultivos, lo que significó un nuevo retraso en la generación de la biomasa.

- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta

Las instalaciones existentes en la Universidad de Antofagasta para mayores volúmenes de cultivo consideran sistema de crecimiento tipo Raceway de 8,8 m³. Es decir, la diferencia se generó en que la generación de biomasa a escala productiva se realizó en sistemas de 7,7 m³ y no de 5 m³ como estaba originalmente planteado.

- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad.

Con el objeto de determinar el costo de producción de una harina microalgal de la cepa A01, se realizó el cultivo semicontinuo a una escala de 7,7 m³, conociendo la concentración de biomasa en producción constante podremos estimar los kilos mensuales y los costos asociados, realizando posteriormente una estimación de costos a 1 Ha de 2000 m³ de cultivo.

El cultivo semicontinuo a una tasa de dilución de 0,07 1/día se realizó en un sistema de cultivo abierto tipo raceway de 7,7 m³. Las cosechas continuas se realizaron durante 30 días, con ello determinamos que a esta escala de cultivo la concentración de biomasa.

Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, agitación mediante sistema de paletas y fotoperiodo en condiciones ambientales (1/2 día solar en promedio 1500 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). La concentración de biomasa (Cb, g/L) se midió filtrando 100 mL de cultivo en un filtro de 47 mm de diámetro y 3 μm de poro, secados a 105°C por 2 horas. La Productividad volumétrica (Pb, g/Ldía) en el cultivo semicontinuo fue calculada multiplicando la concentración de biomasa (cb) por la tasa de dilución. La composición del agua de los cultivos fue monitoreada en fosforo por espectrofotometría del complejo fosfo-vanado-molibdato a 882 nm. Los nitratos utilizando el método espectrofotométrico a 220 y 275 nm y el amonio se midió por el método espectrofotométrico a 690 nm.

La biomasa es recolectada centrifugada y liofilizada, la materia prima y el producto obtenido post cosecha se analizará mediante análisis proximal. El contenido de ceniza se cuantificó mediante gravimetría en una mufla a 550 °C + / - 25 ° C durante 4 horas. Para la cuantificación de lípidos, se utilizará el método Bligh and Dyer según Kochert, 1978. El contenido de proteínas se determinó por el método Lowry modificado por Herbert en 1971 en distintas fases de cultivo, batch y semicontinuo.



Figura 9. Escalamiento del cultivo de A1 a nivel piloto de 7,7 m³ de capacidad de cultivo.

6 DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES PROGRAMADAS Y TAREAS EJECUTADAS PARA LA CONSECUCCIÓN DE LOS OBJETIVOS, COMPARACIÓN CON LAS PROGRAMADAS, Y RAZONES QUE EXPLICAN LAS DISCREPANCIAS. (ANÁLISIS DE BRECHA).

Actividades Programadas	Tareas Ejecutadas	Comparación y análisis brecha
3.7. Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de β -glucano con actividad inmunoestimulante por gramo de microalga	Cultivo en sistema de 0,4 m ³ ; 1 m ³ y 7,7 m ³ hasta obtener un cultivo semi continuo. Análisis de β -glucano obtenido en sistema semi-continuo.	Se cumplió el objetivo a nivel productivo, pudiendo alcanzar un 27% de la meta propuesta en productividad de β -glucano. Sin embargo, no se cumplió el efecto inmunoestimulante propuesto para esta especie (A1), dado que no obtuvimos este efecto en los ensayos en peces.
3.8. Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de biomasa microalgal con actividad inmunoestimulante.	Cultivo en sistema de 0,4 m ³ ; 1 m ³ y 7,7 m ³ hasta obtener un cultivo semi continuo. Cálculo de biomasa y productividad del sistema.	Se cumplió el objetivo a nivel productivo, pudiendo alcanzar un 100% de la meta propuesta en productividad de Biomasa microalgal. Una de las especies evaluadas (A2) cumplió el efecto protector intestinal, no presentó efectos negativos en el crecimiento de los peces, y los resultados de qPCR sugieren que estaría induciendo la respuesta inmune en <i>Salmo salar</i> .
3.9. Un protocolo optimizado de cultivo de	Se aplicó un protocolo de producción semi-continua	No se aplicó el protocolo optimizado en un cultivo

<p>bajo costo a escala productiva (5000 m³ = 5 Ha estanque).</p>	<p>a una escala de 7,7 m³. En función de estos resultados, se extrapolaron los costos de producción a una escala productiva de 10.000 m³.</p>	<p>productivo de 5 Ha de estanque, porque no existen dichas instalaciones en Chile. Lo que se hizo fue extrapolar los datos obtenidos en 7,7 m³ hasta esa dimensión productiva. Los resultados sugieren que el costo de producción de biomasa sería del orden de USD 13/Kg de alga seca, con lo que no se cumplió la meta de USD 3,7/Kg de alga seca.</p>
<p>4.10 Biomasa de microalga producida bajo condiciones optimizadas de producción semi-industrial con las cualidades bromatológicas y microbiológicas necesarias para su uso como inmunoestimulante.</p>	<p>Se produjo la cantidad necesaria de biomasa en condiciones optimizadas de producción semi-industrial. Los análisis bromatológicos y microbiológicos realizados a las especies dieron positivos.</p>	<p>No tenemos brecha. Se cumplió el 100% del indicador.</p>
<p>4.11. Especies de microalgas que permitan obtener una mayor sobrevida de alevines de salmón respecto del grupo control en un ensayo de desafío con <i>P.salmonis</i>, tras haber sido alimentadas con una dieta suplementada con soya.</p>	<p>Se produjo alimento que incluyera las microalgas en una base suplementada con soya. Se alimentaron alevines de <i>Salmo salar</i> de 100 g por 28 días con las dietas respectivas. Se desafiaron estos peces alimentados con las dietas al incluir peces cohabitantes infectados</p>	<p>Se cumplieron las actividades planteadas en el objetivo. Los resultados sugieren que la especie de microalga A2 tendría un efecto de protección intestinal, pero no aumentaría la sobrevida de los peces desafiados, comparado con la dieta sin microalga.</p>

	con <i>P. salmonis</i> .	
4.12. Especie de microalgas con capacidad de mejorar el fitness de peces alimentados con una dieta estresante en soya, comparado con el producto de β -glucano comercial.	Se preparó dieta control con soya 15% y variantes que contengan β -glucano comercial o biomasa microalgal. Se realizaron cultivos de Trucha arcoíris alimentados con 4 distintas dietas. Todas las dietas incluían un 15% soya, pero variaban en la presencia o no de aditivos.	Se realizaron las actividades programadas en este objetivo. La única brecha estaría en el tiempo del ensayo, que había sido programado para 90 días y por problemas externos se desarrolló sólo por 60 días. Los resultados obtenidos sugieren que no habría un mejoramiento del fitness de los peces al ser alimentados con las dietas con microalgas. En general, las cuatro dietas evaluadas dieron resultados similares de factores de conversión y engorda.
5.13. A escala productiva, producción de una biomasa rentable de microalga seca para desarrollar el prototipo comercial.	Se evaluaron los costos de producción de microalgas. Se realizó un análisis de costo de producto en función de la posología utilizada en el alimento y su costo de producción.	No se generó un cultivo de 5 Ha, porque no existen instalaciones de estas dimensiones en Chile. Se estimaron los costos de estas dimensiones, basado en los resultados obtenidos con 7,7 m ³ .
Reuniones comerciales con posibles clientes de la industria salmonera y de alimentos para animales.	Nos reunimos con 3 empresas del rubro que mostraron interés en el producto	El concepto del producto les pareció interesante.
Empresas de la industria salmonera demuestran su interés en este producto y nos solicitan	No se solicitaron cotizaciones por parte de la empresa.	Por el alto precio de producción del producto, no se solicitaron cotizaciones al respecto. Haciendo una

cotizaciones comerciales.		autocrítica, faltó una estrategia comercial más robusta.
Producto comercial con un precio menor o igual al de β -glucanos de levadura actualmente comercializada	Se realizó una comparación de costos respecto a los B-glucanos de levadura.	Los resultados sugieren que utilizando la posología evaluada y los costos de producción obtenidos, el inmunoestimulante basado en microalgas no sería rentable, comparado con la alternativa que existe hoy en el mercado.

7 RESULTADOS DEL PROYECTO: DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS PRINCIPALES RESULTADOS DEL PROYECTO, INCLUYENDO SU ANÁLISIS Y DISCUSIÓN; UTILIZANDO GRÁFICOS, TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS Y MATERIAL GRÁFICO QUE PERMITAN PODER VISUALIZAR CLARAMENTE LOS ANTECEDENTES QUE SUSTENTAN LAS CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES RELEVANTES DEL DESARROLLO DEL PROYECTO.

7.1 LOGRO DE HITOS. SE DEBERÁ HACER UN COMPLETO Y DETALLADO ANÁLISIS Y REFLEXIÓN EN CUANTO AL AVANCE, CUMPLIMIENTO O EVENTUAL ATRASO DEL HITO DEFINIDO PARA EL PERIODO. (ANÁLISIS DE BRECHA DE HITOS)

Hitos críticos definidos	Fecha programada de cumplimiento	Cumplimiento (SI / NO)
Obtención de alimento con efecto inmunoestimulante	Febrero 2016	SI
Prueba en peces de actividad inmunoestimulante de nuestro producto	Junio 2016	SI

Producción a gran escala de microalga seleccionada y definición de producto comercializable	Mayo 2016	NO
---	-----------	----

El primer hito crítico definido tenía relación con la obtención de alimento que incluyera las microalgas en estudio, para posteriormente utilizarlos en las pruebas en alevines. Asumiendo que el alimento tendría un efecto inmunestimulante, al hito se lo llamó “obtención de alimento con efecto inmunoestimulante”.

Como se describe en la parte de metodología (objetivo 2.1), el alimento fue generado en las instalaciones de la Universidad Católica de Temuco, a cargo del Dr. Adrián Hernández. Para la generación del alimento, se contó con el apoyo del socio del proyecto Salmones Antártica, quien facilitó la materia prima y su experiencia en la formulación de las dietas para alevines. Se generaron 6 dietas distintas para los dos ensayos en alevines (Tabla I, Objetivo 2.1). Al evaluar en *Salmo salar* la dieta que contenía la especie de microalga A2, se observó una protección intestinal y la inducción de un aumento en la respuesta inmune de los peces que se alimentaron con ella (medido a nivel de expresión génica por qPCR). En Trucha arcoíris los resultados no fueron concluyentes. Creemos que esto se debió a que la dieta generada no produjo irritación en trucha, y por tanto no fue posible diferenciar entre los controles y las dietas suplementadas. Pero basados en la respuesta observada en Salmón del atlántico, definimos el hito como cumplido.

El segundo hito consideraba realizar la prueba en peces de actividad inmunoestimulante de nuestro producto. Para ello, se realizaron dos ensayos en alevines de salmónidos: en la UACH-Valdivia con salmón del atlántico (*Salmo salar*) y en el centro CAPIA-UST- Pto. Montt con ejemplares de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*), como se describe en el objetivo 2.2. En ambos casos se evaluó la capacidad de protección intestinal y la capacidad de activar el sistema inmune de los peces a través de la expresión de genes relacionados con inmunidad. Por lo tanto, se concluye que se realizó la prueba en peces de actividad inmunoestimulante de nuestro producto.

El tercer hito de producción a gran escala de microalga seleccionada y definición de producto comercializable no fue posible realizarlo. La definición de gran escala del proyecto fue planteada de forma errónea en sistemas de cultivo de 5 Ha. En Chile, no existen instalaciones de cultivo de microalgas de estas dimensiones, por lo que fue imposible realizar esta prueba, por lo que el hito no fue cumplido. Sin

embargo, se generó un escalamiento virtual de los costos de producción y productividades, basados en los datos obtenidos a escala de 7,7 m³. Esta aproximación nos permitió definir que el costo de producción para 5 Ha estaría entre USD 13-15 /Kg de alga seca. Este valor es el doble de la meta propuesta inicialmente en el proyecto de USD 3,7 /Kg de alga seca y además es alrededor de 50 veces superior al valor de β-glucano comercializado actualmente. De esta forma, los datos obtenidos por extrapolaciones sugieren que el producto tendría un costo muy alto para el mercado salmonero, por lo que tampoco pudimos definir el producto comercializable.

7.2 ACTUALIZAR ANÁLISIS ECONÓMICO CON Y SIN PROYECTO

Las características de la alimentación en la industria acuícola han cambiado mucho en los últimos años, debido a la disponibilidad y las alzas experimentadas en el precio de la harina y aceites de pescado, dando oportunidades a nuevas fuentes de alimentos, como las harinas de origen vegetal que sustituyen un porcentaje importante de la harina de pescado, esperándose un reemplazo de hasta el 90% en un futuro.

El mercado chileno de alimentos para salmón y trucha, es liderado por las firmas Ewos, Biomar y Skretting con un 32%, 26,8% y 22,8% de participación respectivamente, seguido por la empresa Salmofood que produce un 6,6%, Los Fiordos con un 7,1% y Salmones Antártica con un 4,7% del mercado nacional correspondientes a un total de 1.053.030 toneladas de alimento comercializadas durante el año 2011 correspondiente a un valor de US\$ 1.136 millones. El costo del producto varía en función de las materias primas utilizadas en su elaboración, siendo como mencionamos la harina de pescado y el aceite de pescado las más importantes en cuanto a precio.

Durante el año 2011, se comercializó un total de 1.053 miles de toneladas de alimento para salmones en Chile, a un valor promedio de US\$3,2 por Kilogramo. De este total, aproximadamente un 5% correspondió a alimentos funcionales, siendo este un mercado en dinámico crecimiento dadas las condiciones de la industria actuales, en que existe la necesidad instalada de nuevas herramientas que sean alternativa a los antibióticos y potenciadoras o complementarias a las vacunas, que apunten a la prevención y control de enfermedades en producción intensiva. De acuerdo a estimaciones del mercado, existe un requerimiento de por parte de las empresas salmoneras de un volumen de 255 Toneladas anuales sólo de inmunoestimulantes, considerando que se utiliza alrededor del 0,2% del alimento (Chile Progreso 2010, Informe final Fondef D0711095).

Precios

En conversaciones directas con EWOS, nos comentaron que el precio aproximado que se paga es de USD 180 por Kg de aditivo, utilizando 50 g por tonelada de alimento. Así mismo, por información entregada de Salmofood supimos que el B-glucano de levadura se comercializa a USD 15/Kg y se utiliza a concentraciones de 0,01-0,005% dentro del alimento.

Por comunicación personal de productores de salmón y trucha, tales como Salmones Antártica, Salmones Camanchaca y Blumar, la cantidad de alimento funcional consumido respecto al porcentaje de alimento total sería alrededor de un 5%.

El número total de smolts ingresados desde enero del 2012 a febrero del 2013 alcanzó las 50.996.411 unidades, incluyendo las especies Coho, Salmo Salar y trucha. En biomasa cosechada a febrero de 2013, se estima un total de 178.323 toneladas. Se reportó para este período un total de 15% de mortalidad promedio entre las tres especies, lo que se traduce en otras 26.748 toneladas de biomasa que consumió alimento. Si se asume que la cantidad de alimento utilizada en etapa de engorda, considera una tasa de consumo de alimento de 1,4% Peso vivo (Tasa promedio), se obtiene:

(Total Biomasa x 1.4%) = Total de alimento consumido.

(178.323 biomasa cosechada + 26.748 biomasa mortalidad promedio) x 1.4% = 2.871 toneladas totales de alimento consumido diariamente.

Si consideramos un ciclo promedio de las tres especies de 15 meses, es decir 450 días

2.871 toneladas diarias X 450 días= 1.291.950 toneladas de alimento

Obtenemos un total de alimento consumido para el período de 1.291.950 toneladas.

1.291.950 toneladas de alimento consumido x 5% correspondiente a alimento funcional = 64.597 toneladas de alimento funcional

Obtenemos 64.597 toneladas de alimento funcional consumido. De este modo, la demanda de alimentos funcionales para salmonicultura alcanzaría las 52.395 T/año con un crecimiento estimado de acuerdo al histórico de un 15%. La planificación inicial del proyecto consideraba cubrir un 20% del mercado de alimentos funcionales, por ejemplo, mediante un acuerdo comercial con una planta de alimentos como Ewos, y una inclusión por tonelada de alimento de 0,5 Kg de producto a un precio de materia seca de microalgas sin procesar de entre 20-50

USD/Kg, el mercado potencial a captar es entre MMUSD 0,1 y MMUSD 0,3 anuales con una biomasa de producto comercializada de 6.460 Kg anuales.

Los resultados del proyecto indican que esta estimación de mercado sería correcta, considerando que el aditivo generado compitiera a nivel de precio y efecto con los aditivos que actualmente existen. Nuestros resultados en trucha sugieren que la respuesta de los peces obtenida al agregar 0,5% de biomasa microalgal al alimento es similar a la respuesta con el β -glucano comercial incluido a 0,05% en el alimento. Sin embargo, los resultados obtenidos en este proyecto indican que el precio del producto microalgal no sería competitivo. El β -glucano comercial cuesta USD15/Kg puesto en el mercado y según nuestras estimaciones la biomasa microalgal tiene un costo de producción similar. Es decir, puesta en el mercado sería a lo menos, el doble (USD30/Kg). Además, es necesario considerar que la cantidad de β -glucano utilizado por Kg de alimento es de 0,05-0,1% y la cantidad de biomasa microalgal evaluada en este proyecto fue de 0,5%, es decir, 5-10 veces más biomasa microalgal por Kg de alimento. De esta forma, nuestro producto tendría un precio de comercio 50-100 superior al β -glucano de levadura utilizado actualmente. Tras este análisis, no es posible que el producto generado compita a nivel comercial con las alternativas actuales de inmunoestimulantes, hasta que se evalúe su efectividad a menores posologías o los costos de producción sean disminuidos.

7.3 ANÁLISIS DE IMPACTO LOGRADO A LA FECHA

De acuerdo a los resultados esperados planteados, se presentan los impactos obtenidos para cada uno.

N°	Resultado Esperado	Impacto	Comentarios
3.7.	Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de β -glucano con actividad inmunoestimulante por gramo de microalga.	Los ensayos presentados serían los primeros resultados conducentes a la caracterización de carbohidratos poliméricos en estas especies de microalga.	En la actualidad nos encontramos refinando la estructura de estos polímeros en cada especie, utilizando análisis fisicoquímicos y estructurales como STEM, DRX, NMR, TGA y DSC. Tenemos plena confianza en que estos resultados podrán ser publicados en revistas de alto impacto del área química.

3.8.	Un protocolo optimizado de cultivo a escala semi-productiva para obtener una productividad diaria conveniente de biomasa microalgal con actividad inmunoestimulante.	La productividad en biomasa alcanzada fue superior a la línea base, y a los 33 días de cultivo semi-continuo sería posible alcanzar la meta de 0,15 g/L/día propuesta del indicador.	A pesar de que se alcanzaron las metas productivas, los resultados posteriores de costos sugieren que éstos aún están altos. Será necesario seguir trabajando en mejores productividades para lograr un producto competitivo.
3.9.	Un protocolo optimizado de cultivo de bajo costo a escala semi-productiva.	No fue posible cumplir la meta para la producción de microalgas marinas. El mínimo valor calculado por la Universidad de Antofagasta sugiere un costo de 13 USD/Kg de microalga seca, valor muy superior a la meta de 3,7 USD/Kg de alga seca. Este resultado impacta directamente la posibilidad de este negocio.	Sería necesario realizar un análisis combinado que evalúe si la producción de lípidos, B-glucanos y/o otros subproductos de la microalgas en su conjunto pueden generar un producto completo que sea competitivo a nivel de costos.
4.10.	Biomasa de microalga producida bajo condiciones optimizadas de producción semi-industrial con las cualidades bromatológicas y microbiológicas necesarias para su uso como inmunoestimulante	La biomasa microalgal generada cumplió con los atributos de calidad bromatológica y microbiológica, lo que permitió la generación de alimento para salmones y las pruebas posteriores en estos.	Lograr este nivel de calidad certifica además que el proceso de producción se está ejecutando bien y que la biomasa microalgal generada podría ser utilizada para alimentación animal e incluso humana.
4.11.	Especies de microalgas que permitan obtener una mayor sobrevida de alevines de salmón respecto del grupo control en un ensayo de desafío con <i>P.salmonis</i> , tras haber sido alimentadas con una dieta suplementada con soya.	A nivel de protección intestinal, se pudo observar que la dieta que incluye la microalga A2 tendría un efecto sobre el largo de las vellosidades de los peces analizados, respecto a la dieta sin la microalga. Sin embargo, la inclusión de esta microalga en la dieta no induciría una respuesta de resistencia a la infección con <i>P.salmonis</i> .	Los resultados sugieren que se podría evaluar la utilización de la biomasa microalgal como suplemento alimenticio que permita la inclusión de otras proteínas de origen no marino, que actualmente se ven limitadas, por efecto de inflamaciones intestinales. Nuevas pruebas serán necesarias para validar esta alternativa.
4.12.	Especie de microalgas con capacidad de mejorar el fitness de peces alimentados con una dieta estresante en soya, comparado con el producto de β -glucano comercial	Los peces alimentados con la dieta 4, que contenía la microalga A1, mostraron un menor aumento en peso respecto a la dieta control sólo con soya (dieta 1). Los peces alimentados con la dieta 2, que	La dieta que contiene la microalga A2 es también aquella que presenta una protección intestinal en Salmones atlántico, por lo que se define como aquella con

		<p>contenía el B-glucano comercial, presentaron un menor factor de conversión que la dieta 1. Sólo la dieta 3 con la microalga A2, presentó valores similares de peso y conversión comparado con la dieta control.</p>	<p>mayor valor comercial.</p>
5.13.	<p>A escala productiva, producción de una biomasa rentable de microalga seca para desarrollar el prototipo comercial.</p>	<p>Los costos de producción de la microalga y/o la mayor cantidad de biomasa que es necesario incluir en el alimento, hacen que el valor comercial del producto generado NO sea competitivo con las alternativas de la competencia que presentan una respuesta similar en peces a la observada con nuestro producto.</p>	<p>En la actualidad no existen centros de cultivo de microalgas de 5 Ha, que era la dimensión comercial estipulada inicialmente en el proyecto. Con los resultados obtenidos, será difícil conseguir fondos para lograr armar una plataforma productiva de este tamaño y realizar las pruebas de costo reales.</p>
5.14.	<p>Reuniones comerciales con posibles clientes de la industria salmonera y de alimentos para animales.</p>	<p>Nuestro producto requiere de estudios posterior para lograr un precio competitivo.</p>	<p>Existe interés de parte de la industria frente a nuevas fuentes de inmunoestimulantes. Sin embargo, deben ser alternativas que compitan en precio y calidad con las ya existentes en el mercado.</p>
5.15.	<p>Empresas de la industria salmonera demuestran su interés en este producto y nos solicitan cotizaciones comerciales.</p>	<p>Con los resultados obtenidos, no se logró generar cotizaciones por el producto. Será necesario a futuro evaluar si el producto posee efectos más contundentes en peces más pequeños y también evaluar maneras de bajar los costos de producción.</p>	<p>Existen diversas alternativas de inmunoestimulantes para la industria salmonera y el principal factor de selección tiene que ver con precio y diferenciación. Se debe mejorar el precio comercial del producto microalgal para encantar a la industria.</p>
5.16.	<p>Producto comercial con un precio menor o igual al de β-glucanos de levadura actualmente comercializada</p>	<p>El impacto negativo principal es para la industria de las microalgas, para la cual una nueva oportunidad de producto se ve limitada por costos de producción.</p>	<p>La conclusión para los B-glucanos, de forma similar a lo que ha sido para el biodiesel y los omega 3, es que es necesario bajar los costos de producción de la biomasa microalgal para poder competir en la actualidad con los productos de similares efectos ya ofrecidos en la industria.</p>

7.4 RESULTADOS E IMPACTOS .

Se organizó esta sección siguiendo los resultados esperados definidos en el plan operativo original, para una mejor comparación y evaluación de los impactos obtenidos.

7.4.1 Resultados Esperado 3.7. Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de B-glucano con actividad inmunoestimulante por gramo de microalga.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance FINAL
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	7	Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de β-glucano con actividad inmunoestimulante por gramo de microalga.	Productividad específica de β-glucano en cultivo de microalgas a escala semi-productiva (5.000 litros)				Mayo 2016	27%

Esta actividad fue desarrollada en la Universidad de Antofagasta por el grupo del Dr. Jorge Riquelme. Sólo la especie A1 acumula β-glucano, por lo que los cálculos de este resultado se refieren a esta especie. Se realizó el crecimiento de la especie A1 en estanques de 0,4 m³, 1m³ y 7,7 m³. La cantidad de β-glucano medida desde el cultivo de 7,7 m³ correspondió a 2,16 g/100g de alga seca para la especie A1, a los 17 días que comienza el cultivo semi-continuo. Asumiendo una biomasa de 0,4 g/L, la productividad corresponde a 1,27 mg/g/día. Tomando como base 1 mg/g/día definido en el plan operativo, el avance corresponde a un 27% (= (1,27-1) / (2-1)*100).

En paralelo, se caracterizó a nivel fisicoquímico los polisacáridos presentes en las especies A1 y A2. Para ello, se montó un protocolo de extracción de carbohidratos totales desde ambas especies, utilizando la estrategia de Daou y Zhang, 2012; Xia y cols., 2014. Los rendimientos son mostrados en la Tabla III. Para el caso de la microalga A1, a partir de los 10 g de biomasa seca se obtuvieron 415 mg de β-Glucanos (producto liofilizado), equivalentes a un rendimiento en peso seco del 4,2 %. Luego de determinar la pureza de la muestra obtenida mediante el uso del kit enzimático de Megazime®, se determinó una masa de 320,67 mg de β-Glucanos, equivalente a una pureza del 77,3%. Para el caso de la microalga A2, se logró obtener a partir de los 10 g iniciales de biomasa seca, 522 mg de carbohidratos poliméricos (CP) totales, equivalentes a un rendimiento en peso seco del 5,2 %. Estos CP, fueron ensayados para determinar la pureza utilizando el mismo kit enzimático de Megazime®. Sin

embargo, no fue posible su determinación (Nd), debido a que el CP extraído desde A2 no tuvo reacción frente al ensayo enzimático, por lo cual, deducimos que el CP, estructuralmente no estaría estabilizado por los enlaces glucosídicos del tipo β -1-3, que es capaz de detectar y escindir específicamente el ensayo montado en nuestro laboratorio.

Tabla III. Rendimiento de extracción de β -Glucanos y carbohidratos poliméricos desde las microalgas estudiadas.

	A1	A2
Rendimiento a producto seco	4,2%	5,2%
Rendimiento a producto puro	3,1%	Nd*
Pureza (%)	77,3%	Nd*

*Nd: no determinada

Para determinar las características de estos carbohidratos poliméricos, se realizaron una serie de pruebas físico-químicas al producto extraído. A continuación, se presenta una comparación de los resultados obtenidos tras analizar β -glucanos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Euglena gracilis* y las especies de microalga A1 y A2 utilizando la metodología Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR).

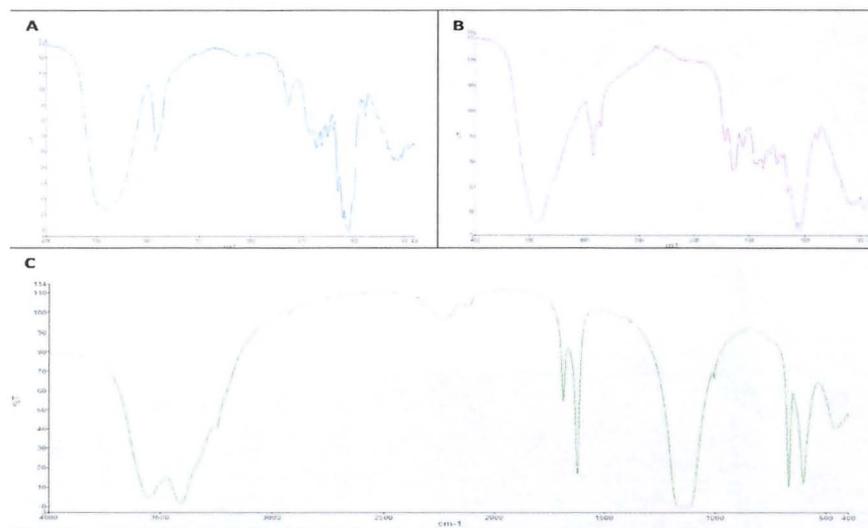


Figura 9. Espectros infrarrojos de A) β -glucano levadura ramificado (β 1-3; β 1-6), B) β -glucano de microalga de estructura lineal (1-3) y C) β -glucano extraído desde A1.

La fig. 9A (líneas azules), presenta el patrón de señales arrojado por un β -glucano de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* adquirido comercialmente, estabilizado con enlaces β 1-3, en la cadena principal y con ramificaciones estabilizados por enlaces del tipo β 1-6. La fig. 9B (líneas rojas) presenta las señales correspondientes a un β -glucano de *Euglena* sp, estabilizado por enlaces glucosídicos del tipo β 1-3 en la cadena principal, el cual carece de ramificaciones. La fig 9C (líneas verdes) correspondiente al β -glucano de A1, emite señales claras y de mayor resolución en 3400 cm^{-1} y en los 2240 cm^{-1} , al igual que ambos estándar de β -glucanos, indicando el enlace CO del grupo alcohol. En

todas las muestras, se observan señales de banda de vibración asimétrica y simétrica de estiramiento de grupos OH ancha a los 355 cm^{-1} y 3408 cm^{-1} y evidencian claramente una banda de emisión a los 891 cm^{-1} , lo cual es indicativo de un enlace anomérico β -glucosídico (enlaces β 1-3) indicando la presencia de polisacáridos.

Tanto el β -glucano de A1, como el de *Saccharomyces cerevisiae* presentan una fuerte señal en los 1639 cm^{-1} , esta banda correspondiente a un enlace de tipo β 1-6 indicado por resonancia del tipo C-OH, la banda en esta señal no fue evidenciada en la muestra de *Euglena sp.*, concordando con los patrones estructurales. Por la intensidad de las bandas emitidas por los OH (2921 y 2924 cm^{-1}), de los β -glucanos comerciales, indicaría una mayor asociación de puentes de hidrógenos y por lo tanto de una molécula de mayor tamaño, versus el β -glucano de A1, el cual sería más pequeño.

Con respecto, a los CP extraídos desde la microalga A2, los resultados son presentados en la Figura 10.

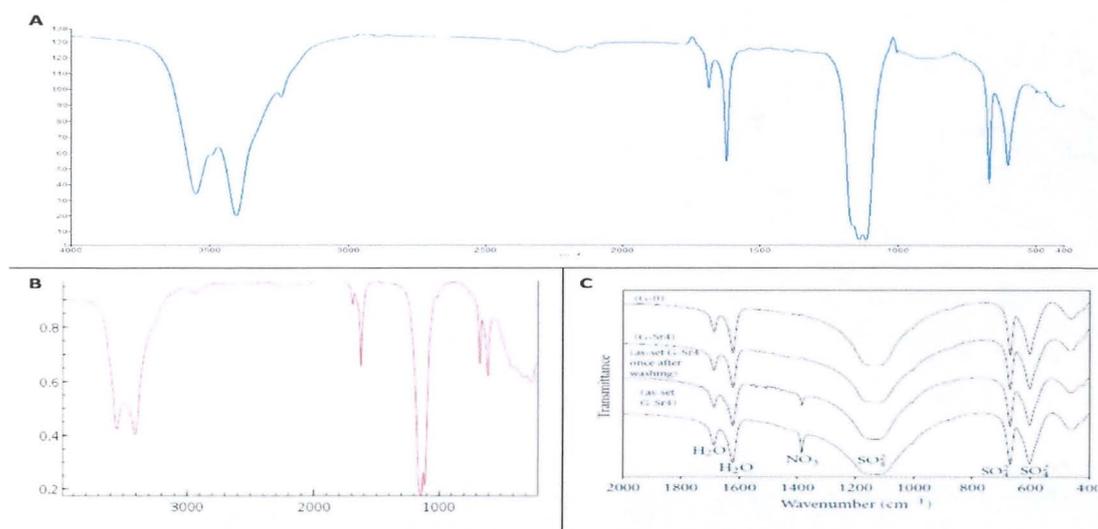


Fig 10: Espectro Infrarrojo de A) carbohidratos poliméricos extraídos desde A2, B) Sulfato de calcio (estándar) y C) Gypsum: Sulfato de calcio hidratado (figura obtenida desde Pouria y cols., 2012)

La figura 10 muestra las señales características de los hidratos de carbono, la cual pueden ser reconocidos por picos de mayor intensidad en los números de onda de $1058\text{-}1040\text{ cm}^{-1}$ (enlace CO del grupo alcohol), y el OH estiramiento en los 3400 cm^{-1} . A diferencia del β -glucano extraído desde A1 la transmitancia es leve y atenuada en la señal de $891\text{-}903\text{ cm}^{-1}$, indicando un enlace principalmente del tipo alfa (α). Este CP, no muestra una banda resueltas entre las señales de 2856 cm^{-1} a 1734 cm^{-1} , por lo que el proceso de purificación doble, acoplada a la UF, también resulta eficiente, por lo que la muestra carece de contaminación con otras macromoléculas.

Interesante resultan las señales observadas entre los 600 y 780 cm^{-1} , lo cual mediante búsqueda bibliográfica, comparado con la literatura y lo observado en sulfato de calcio hidratado reportado en la literatura (Pouria y cols., 2012) el cual es mostrado en la figura 10C, correspondería a grupos sulfato

(SO₄⁻²), los cuales estaría unidos covalentemente a la estructura primaria de la molécula. Estos resultados validarían la ausencia de B-glucanos en la microalga A2.

IMPACTO: Los ensayos presentados serían los primeros resultados conducentes a la caracterización de carbohidratos poliméricos en estas especies de microalga. En la actualidad nos encontramos refinando la estructura de estos polímeros en cada especie, utilizando análisis fisicoquímicos y estructurales como STEM, DRX, NMR, TGA y DSC. Tenemos plena confianza en que estos resultados podrán ser publicados en revistas de alto impacto del área química.

Cabe destacar que a través de este trabajo, se desarrollaron las metodologías para cuantificar y aislar β-glucanos desde la especie A1. Nuestros resultados posteriores en peces, sugieren que esta especie no tendría un mayor impacto a nivel del sistema inmune. Sin embargo, registros en otras especies sugieren que el efecto sería mayor cuando se utiliza biomasa previamente molida, lo que permitiría una mejor biodisponibilidad de los principios activos de la microalga, los cuales, se encuentran poco disponibles para el pez cuando se suministran microalgas integrales estructuralmente. Los β-glucanos se ubican intracelularmente, tras la gruesa pared celular de celulosa. Nuevos estudios serían necesarios para validar esta hipótesis.

Con respecto a la especie A2, la cual no sintetizaba β-glucanos pero sí se observó una respuesta inmune en peces, los resultados obtenidos representan las primeras descripciones respecto a carbohidratos presentes en esta especie. Hasta la fecha, no podemos establecer si el carbohidrato polimérico es el responsable de la actividad inmunoestimulante. Será necesario validar el efecto de este carbohidrato polimérico purificado sobre peces, para establecer esta relación.

7.4.2 Resultado Esperado 3.8. Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de biomasa microalgal con actividad inmunoestimulante.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	8	Un protocolo optimizado de cultivo a escala semiproductiva para obtener una productividad diaria conveniente de biomasa microalgal con actividad inmunoestimulante	Productividad volumétrica de biomasa microalgal (Qc) a escala semi-productiva (5000 L)				Julio 2016	100%

Este objetivo fue desarrollado en la Universidad de Antofagasta por el grupo del Dr. Jorge Riquelme. Para la especie A1 en sistemas tipo raceway de 7,7 m³, a los 17 días se logra generar un cultivo semicontinuo, con una tasa de crecimiento de entre 0,4 – 0,5 g/L, cosechando el 7% del volumen

diariamente (616 L) y obteniendo 180 g de biomasa seca al día, tras tener pérdidas del 15% en el proceso de centrifugación y de secado. Si consideramos los 17 días necesarios para el establecimiento de este tipo de cultivo la productividad es de 0,017 g/L/día el día 17 y de 0,1526 g/L/día para el día 33 de cultivo (Tabla IV). Utilizando estos valores y tomando como base 0,04 g/L/día definido en el plan operativo, el avance corresponde a -21% al día 17 ($= (0,017-0,04) / (0,15-0,04)*100$) y de 102% al día 33 de producción ($= (0,1526-0,04) / (0,15-0,04)*100$).

Tabla IV. Proyección de producción de la especie A1.

días	Produc- ción (g/L)	Litros cosechados	biomasa (g)	15% pérdida centrifuga	15% perdida secado	biomasa acumulad a (g)	Produc- tividad (g/L/día)	% Avance
17	0,41	616	252,56	215	182	182	0,0174	-21
18	0,41	616	252,56	215	182	365	0,0329	-6
19	0,41	616	252,56	215	182	547	0,0468	6
20	0,41	616	252,56	215	182	730	0,0592	17
21	0,41	616	252,56	215	182	912	0,0705	28
22	0,41	616	252,56	215	182	1095	0,0808	37
23	0,41	616	252,56	215	182	1277	0,0902	46
24	0,41	616	252,56	215	182	1460	0,0987	53
25	0,41	616	252,56	215	182	1642	0,1066	61
26	0,41	616	252,56	215	182	1825	0,1139	67
27	0,41	616	252,56	215	182	2007	0,1207	73
28	0,41	616	252,56	215	182	2190	0,1270	79
29	0,41	616	252,56	215	182	2372	0,1328	84
30	0,41	616	252,56	215	182	2555	0,1382	89
31	0,41	616	252,56	215	182	2737	0,1433	94
32	0,41	616	252,56	215	182	2920	0,1481	98
33	0,41	616	252,56	215	182	3102	0,1526	102
34	0,41	616	252,56	215	182	3285	0,1568	106
35	0,41	616	252,56	215	182	3467	0,1608	110
36	0,41	616	252,56	215	182	3649	0,1646	113
37	0,41	616	252,56	215	182	3832	0,1681	116
38	0,41	616	252,56	215	182	4014	0,1715	120
39	0,41	616	252,56	215	182	4197	0,1747	122
40	0,41	616	252,56	215	182	4379	0,1777	125

Para el caso de la especie A2, la productividad calculada es de 0,02g/L/día, alcanzado a los 14 días de cultivo, es decir, 0,4-0,5 g/L a los 14 días, valores similares a los alcanzados por A1 a los 17 días. Dada esta similitud entre especies, los valores productivos serán tratados como similares para ambas especies.

IMPACTO: La productividad en biomasa alcanzada fue superior a la línea base, y a los 33 días de cultivo semi-continuo sería posible alcanzar la meta propuesta del indicador.

7.4.3 Resultado Esperado 3.9. Un protocolo optimizado de cultivo de bajo costo a escala productiva (5000 m³ = 5 Ha estanque).

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
3	9	Un protocolo optimizado de cultivo de bajo costo a escala productiva (5000 m ³ = 5 Ha estanque).	Costos de producción de microalga productora de β-glucano				Mayo 2015	0%

Porque no existen instalaciones de cultivo de microalga de 5 Ha en Chile, lo que se realizó en esta actividad fue una estimación de los costos de escalamiento del proceso, basados en los costos calculados con las dimensiones actuales que alcanzan la 0,1 Ha. En función de estas actividades desarrolladas por la Universidad de Antofagasta, a continuación se detallan los costos de producción:

Tabla V. Detalle del costo del producto harina microalgal de origen marino

N° RW	Capacidad de planta (Ha)	Ton Biomasa/año	RRHH U\$/kg	Costo Nutrientes \$US/kg	Energía U\$/kg	Costo total (U\$/kg)
1	0,1	1,3	74	1,9	10	86
10	1	13	15	1,87	10	27
50	5	66	4	1,47	10	16
100	10	131	3	1,47	10	14
400	40	524	1	1,47	10	13

IMPACTO: No fue posible cumplir la meta para la producción de microalgas marinas. El mínimo valor calculado por la Universidad de Antofagasta sugiere un costo de 13 USD/Kg de microalga seca, valor muy superior a la meta de 3,7 USD/Kg de alga seca.

7.4.4 Resultado Esperado 4.10. Biomasa de microalgal producida bajo condiciones optimizadas de producción.

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha	
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcanc e meta		
4	10	Biomasa de microalga producida bajo condiciones optimizadas de producción semi-industrial con las cualidades bromatológicas y microbiológicas necesarias para su uso como inmunoestimul ante.	Biomasa de microalga para ensayos bromatológicos					Enero 2016	100%
			Análisis proximal que reporte los gramos de: humedad, cenizas, proteínas, grasa cruda, fibra cruda e hidratos de carbono presentes en 100 gramos de muestra de microalga.						
			Biomasa de microalga para ensayos bromatológicos						
			Informe Microbiológico favorable (presencia de microorganismos patogénicos dentro de la norma)						

Se generó biomasa microalgal para la formulación de alimento de salmones, la que previamente fue analizada a nivel bromatológico en tres distintos laboratorios. En el indicador se muestran los valores

promedios obtenidos para las especies A1 y A2, ambas producidas por la U. Antofagasta. A nivel de humedad, los valores obtenidos son mejores a la meta. En cenizas, la especie A01 presentó mayores valores que la meta. A nivel de proteínas estuvieron de acuerdo o superior a la meta. En materia grasa, ambas estuvieron dentro de la meta, aunque A02 en el límite inferior. A nivel de fibra, ambas cumplieron la meta y a nivel de hidratos de carbono, ambas estuvieron por sobre la meta. A nivel microbiológico, los 2 Kg de biomasa entregada por la U. Antofagasta cumple con las normas y con las metas al contar con < 100 UFC de *E.coli* y *Salmonella*, además de ausencia de *S. aureus*..

Aunque existe variabilidad entre los datos obtenidos en distintos laboratorios utilizados, en general los valores bromatológicos obtenidos se encuentran en los rangos estimados en la meta (ver tabla VI y VII). Por lo tanto, concluimos que ambas especies cumplen o mejoran la meta propuesta y se cumple un 100% en este resultado.

Tabla VI. Análisis proximal y microbiológico especie A1. Valores porcentuales.

A1	CECTA		Dictuc	Analab	Promedio	Desv. Est.
	M1	M2	M1	M1		
Humedad	5,2	5,1	5,3	5,6	5,3	0,2
Proteínas (%Nx6,25)	24,4	24,3	25,8	23,9	24,6	0,7
Lípidos (grasas totales)	10,7	10,7	2,7	5,5	7,4	3,4
Cenizas	43	43,01	44,8	42,9	43,4	0,8
Fibra cruda	nd	nd	0,4	3,9	2,2	1,8
Extracto no nitrogenado	16,7	16,08	nd	18,2	17,0	0,9
Energía (Kcal/100g)	261	261	214	169	226,3	38,2
Hidratos carbono disponibles	nd	nd	21,5	21,5	21,5	0,0
azúcares reductores totales	nd	nd	1,6	5,3	3,5	1,9
Recuento <i>E. coli</i> en petrifilm UFC/g	<100	<100	nd	nd	<100	
Detección de <i>Salmonella</i> en 25 g	ausencia	ausencia	nd	nd	ausencia	
Recuento de <i>St. aureus</i> coagulasa positiva UFC/g	<100	<100	nd	nd	<100	

Nd: no determinado. Para CECTA se enviaron dos muestras ciegas (M1 y M2).

Tabla VII. Análisis proximal y microbiológico especie A2. Valores porcentuales.

A2	CECTA		DICTUC	ANALAB	promedio	desv. Est.
	M1	M2	M1	M1		
Humedad	8,9	9,2	10	10,2	9,58	0,54
Proteínas (%Nx6,25)	29,5	29,3	30,8	28,8	29,60	0,74
Lípidos (grasas totales)	4,4	5,9	1,1	9,1	5,13	2,88

Cenizas	21,6	21,7	30,8	21,1	23,80	4,05
Fibra cruda	Nd	Nd	0,2	3,2	1,70	1,50
Extracto no nitrogenado	35,6	33,9	nd	27,6	32,37	3,44
Energía (Kcal/100g)	300	306	280	245	282,75	23,83
Hidratos carbono disponibles	Nd	nd	36,6	24,3	30,45	6,15
azúcares reductores totales	Nd	nd	0,7	5,5	3,10	2,40
Recuento <i>E. coli</i> en petrifilm UFC/g	<100	<100	nd	nd	<100	
Detección de <i>Salmonella</i> en 25 g	ausencia	ausencia	nd	nd	ausencia	
Recuento de <i>St. aureus</i> coagulasa positiva UFC/g	<100	<100	nd	nd	<100	

Nd: no determinado. Para CECTA se enviaron dos muestras ciegas (M1 y M2).

IMPACTO: La biomasa microalgal generada cumplió con los atributos de calidad bromatológica y microbiológica, lo que permitió la generación de alimento para salmones y las pruebas posteriores en estos. Lograr este nivel de calidad certifica además que el proceso de producción se está ejecutando bien y que la biomasa microalgal generada podría ser utilizada para alimentación animal e incluso humana.

7.4.5

7.4.6 Resultado Esperado 4.11. Especies de microalgas que permitan obtener una mayor sobrevivencia de alevines de salmón respecto del grupo control en un ensayo de desafío con *P.salmonis*, tras haber sido alimentadas con una dieta suplementada con soya.

Nº	RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)				% de avance final	
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)		Fecha alcance meta
4	11	Especies de microalgas que permitan obtener una mayor sobrevivencia de alevines de salmón respecto del	% de protección intestinal efecto microalga				Junio 2016	100%

	grupo control en un ensayo de desafío con <i>P.salmonis</i> , tras haber sido alimentadas con una dieta suplementada con soya.	% Variación de sobrevivencia (VPS)				Junio 2016	21,6%
		% Variación de la expresión de genes marcadores de respuesta inmune innata				Junio 2016	58%

Esta experiencia fue desarrollada en la Universidad Austral desde el 15 de marzo del presente año.

Por estanque, se recolectaron 4 peces, es decir por dieta, para analizar las vellosidades intestinales y la respuesta inmune a través de expresión de genes por qPCR. Las muestras para histología fueron tomadas a los 0, 7, 14 y 28 días de alimentación con cada dieta. Los valores promedios de largo de vellosidades se presentan en la tabla VIII.

Tabla VIII. Largo vellosidades (μm) de intestino anterior medidas desde muestras de *S. salar* alimentados con las distintas dietas.

Dieta	Composición	día 0	día 7	día 14	día 28
dieta 1 (c)	5% Soya	534 \pm 62	424 \pm 34	403 \pm 24	401 \pm 36
dieta 2 (b)	15% Soya	561 \pm 59	405 \pm 36	378 \pm 40	443 \pm 36
dieta 4 (a)	15% Soya + 1% microalga A2	544 \pm 35	431 \pm 58	411 \pm 55	460 \pm 13

Se puede observar en la tabla VIII que el largo de las vellosidades parte en valores cercanos a los 550 μm para el día 0 y disminuyendo más de 100 μm desde el día 7 de alimentación para todas las dietas.

Se realizó el cálculo del % de protección intestinal por efecto del alga, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla IX. Cálculo del % de protección intestinal por día utilizando los datos de la tabla VIII

	día 0	día 7	día 14	día 28
c-b	-27,3	19,3	25,1	-42,0
a-b	-16,9	26,8	33,3	17,0
(a-b/c-b)*100	62,1	138,8	132,5	-40,4

Como se observa en los valores de la tabla XX, los días 7 y 14, la microalga si estaría protegiendo el intestino anterior del proceso de irritación observado con las otras dos dietas. El día 28 la longitud de las vellosidades del intestino anterior en los peces alimentados con la dieta que incluía la microalga (dieta 4), era superior a las otras dos dietas. Sin embargo, el valor de la dieta con soya 15% (dieta 2), también aumentó respecto a la dieta control con 5% harina de soya (dieta 1). Por esta razón, el índice del día 28 entrega un valor negativo. En general, esperábamos que la dieta con menor porcentaje de soya incluida, generara una menor inflamación intestinal, comportamiento que NO fue observado en las muestras tomadas. Según estos resultados, concluimos que la dieta con microalga estaría teniendo un efecto de protección sobre el intestino anterior de *Salmo salar*.

Los valores de mortalidad para los ensayos de desafío con *P.salmonis* en *Salmo salar* a los 30 días fueron de: 60.95 ± 19.87 para el control soya 5%; 28.5 ± 4.95 para la dieta soya 15% y de 35.5 ± 13.72 para la dieta de soya 15% + la microalga al 1 %. Con estos valores, el indicador del estado actual del efecto de la dieta con soya es de 21,57%. Los resultados obtenidos no se adecuan a las expectativas iniciales planteadas, ya que en la muestra control, elaborada con menor porcentaje de soya incluida (5%), en donde esperábamos observar un comportamiento mejor debido a que no debiera haber inflamación intestinal. Finalmente, con la dieta al 5% soya se observó una menor longitud en las vellosidades intestinales (mayor inflamación) y además, se obtuvo una mayor mortalidad que en las muestras con 15% de soya. Esto hace que sea imposible que en la fórmula se alcance el 100%. Luego, en la comparación entre las muestras con o sin microalga (ambas al 15%), los resultados sugieren que no habría diferencia, principalmente por la alta variación entre muestras (desviación estándar).

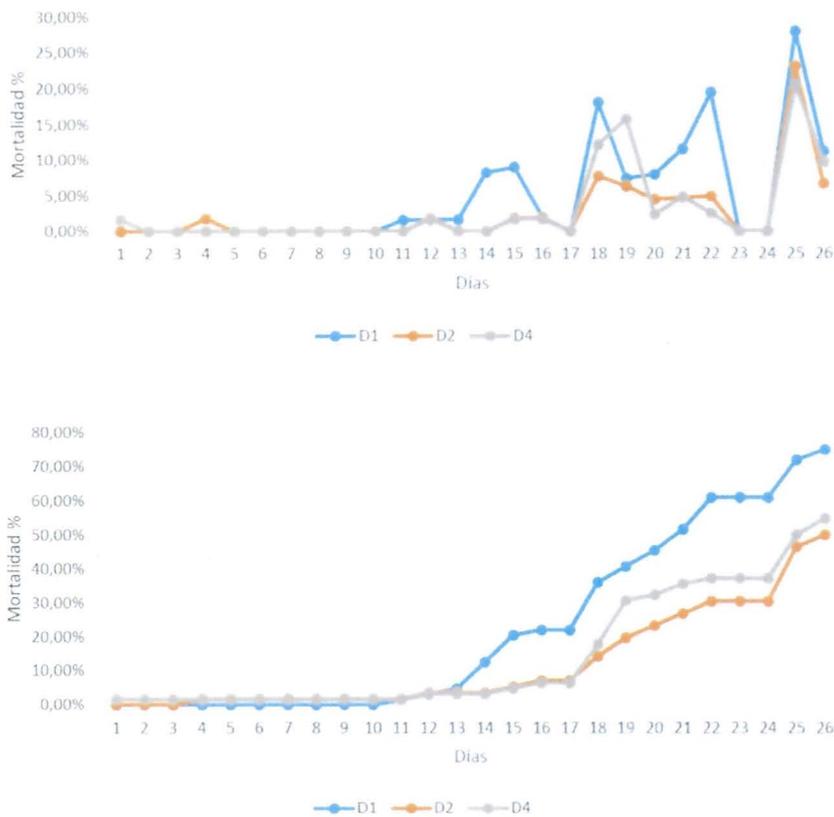


Figura 11. Mortalidad diaria (figura superior) y mortalidad acumulada (figura inferior) en *S. salar* tras los días de cohabitación con peces infectados con *P. salmonis*.

Llama la atención que la dieta con 5% soya tenga una mayor mortalidad que las dietas con 15% soya. Creemos que esto pueda deberse a que, como la soya es un irritante, estimula de forma inespecífica el sistema inmune, y por esta razón podría estar actuando como "inmunoestimulante" sobre los peces. Sin embargo, sería necesario validar esta afirmación con nuevas pruebas.

A nivel de expresión génica, fueron cuantificados los niveles de los linfocitos CD4 y CD8b, cuales forman parte del sistema inmune inducido, y los genes del interferón gama (INFg), las interleuquinas 12 y 18 (IL-12b e IL-18), como representantes del sistema inmune innato. Como patrón de referencia se utilizó el gen codificante para el factor de elongación 1 (ELF1a).

Se calcularon las expresiones relativas de cada gen, normalizando el valor de expresión contra el valor obtenido en el gen de referencia y además, comparando la expresión con aquella obtenida al comenzar el experimento, es decir, en el tiempo 0.

Luego, se calculó el porcentaje de variación expresión de genes marcadores de respuesta inmune y la respuesta obtenida se presenta en la tabla X.

Tabla X. Porcentaje de variación de la expresión de genes en respuesta a los días de alimentación con la dieta que incluía microalga A2.

	día 7	día 14	día 28
CD4	-108,16	78,39	722,01
CD8b	241,61	-22,43	34,28
INFg	128,76	137,45	14,91
IL-12b	70,55	127,32	58,39
IL-18	107,14	100,66	-74,13

La expresión génica puede ser mayor o menor al valor determinado en el tiempo 0. Cuando hay mayor expresión, la diferencia de expresión entre la dieta de prueba y/o la dieta control vs la dieta con 15% soya entrega un valor positivo. Si hay menor expresión, el valor de la diferencia entrega un valor negativo. Se observa en la tabla X que para el día 28 de alimentación, sólo el gen para los linfocitos tipo CD4 presentan un % de variación sobre la meta (100%). Para el día 14, observamos valores en el rango esperado en todos los genes de respuesta inmune innata y para el día 7 de alimentación se observa una respuesta esperada en los genes CD8, INFg e IL-18.

Al analizar el detalle de las expresiones génicas, observamos que los genes de respuesta inmune adquirida se encuentran activados comparados con el tiempo 0 en todas las dietas, excepto en la dieta 4 para el día 28 para el gen CD4 (Figura 12), lo que explica el alto valor obtenido en el porcentaje de variación en la tabla X. En especial, destaca el nivel de inducción del gen CD8b para todas las dietas, en todos los tiempos. Sin embargo, no se observa una diferencia entre dietas que sea significativa debido a la alta desviación estándar.

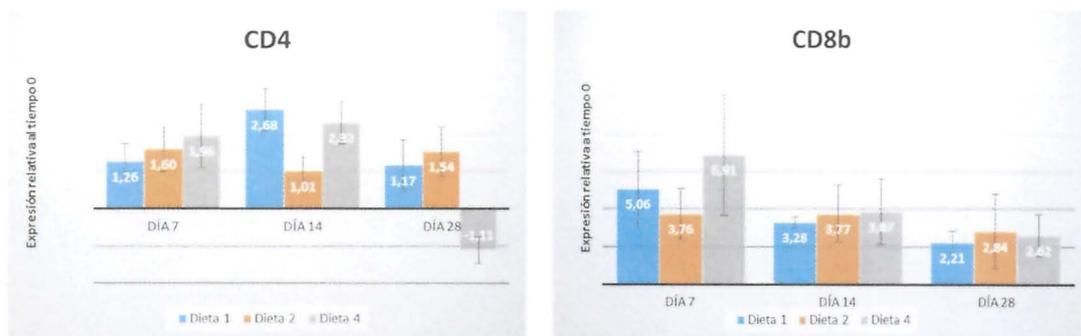


Figura 12. Expresión génica relativa de los genes de respuesta inmune adquirida CD4 y CD8 en función de la dieta y el día de alimentación con cada dieta.

Luego, en los genes de respuesta inmune innata se observa un comportamiento particular, según el gen que se analice. IL-12b presenta una inhibición de la expresión en todos los días y para todas las dietas, respecto del tiempo 0. En cambio, IL-18 presenta un comportamiento dispar según día y según dieta, pasando de una leve inducción al día 7 a una represión en todas las dietas el día 28 (figura 13). Finalmente, el gen para INFg presenta una inducción en casi todos los días y dietas evaluadas, excepto para la dieta 2 (15% soya) en el día 7.

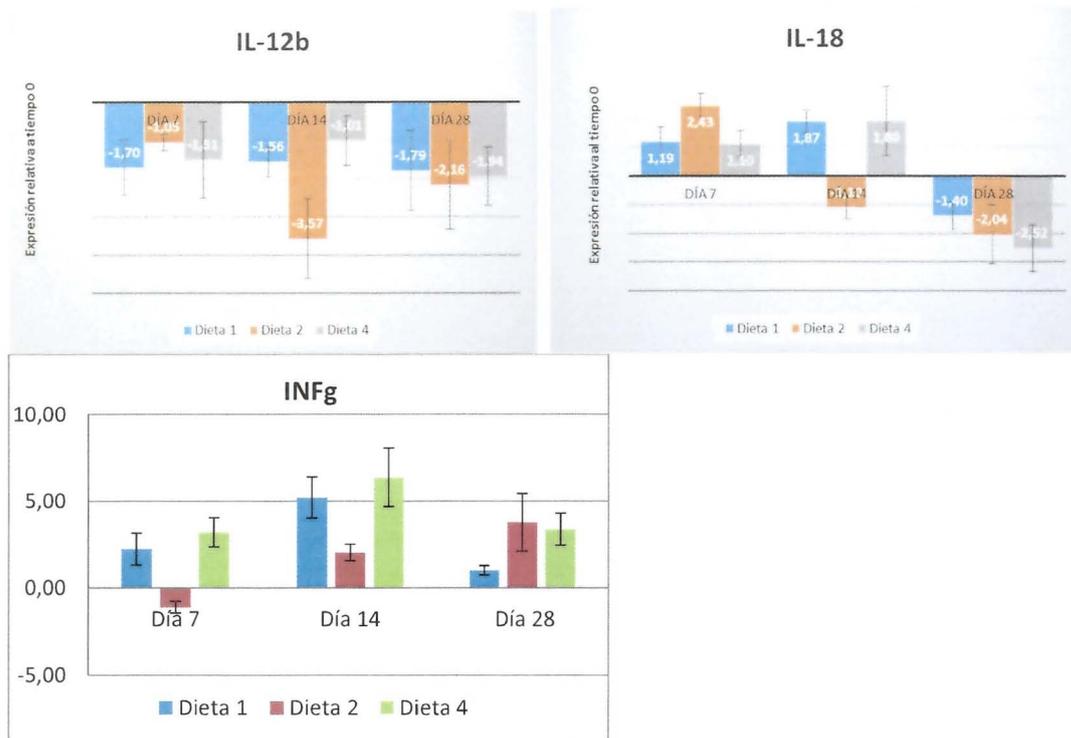


Figura 13. Expresión génica relativa de los genes de respuesta inmune innata IL-12b e IL-18 en función de la dieta y el día de alimentación con cada dieta.

Como se trata de datos de relaciones relativas, nos fue imposible aplicarle un test estadístico a estos análisis. Sin embargo, a nivel de tendencias podríamos argumentar que en la respuesta inmune innata, el comportamiento en expresión génica de los peces alimentados con la dieta con microalga (dieta 4) fue similar a los peces alimentados con la dieta 1 (soya 5%). Sin embargo, como se observa en la figura XY, esta tendencia en la expresión de genes no se relaciona con el comportamiento observado frente a la infección con *P.salmonis*, en que se observa que la dieta 1 fue más susceptible a la infección con *P. salmonis* que las dietas 2 y 4.

IMPACTO: A nivel de protección intestinal, se pudo observar que la dieta que incluye la microalga A2 tendría un efecto sobre el largo de las vellosidades de los peces analizados, respecto a la dieta sin la microalga. Sin embargo, la inclusión de esta microalga en la dieta no induciría una respuesta inmune a nivel de expresión génica y/o a nivel de resistencia a la infección con *P.salmonis*.

Los resultados obtenidos alimentando alevines de Salmón atlántico con dietas que incluían soya y microalgas, sugieren que la microalga tendría un efecto de protector intestinal en los primeros días de alimentación. Sin embargo, esta protección no generaría una sobrevida mayor frente al desafío con *P. salmonis*.

7.4.7 Resultado Esperado 4.12. Especie de microalgas con capacidad de mejorar el fitness de peces alimentados con una dieta estresante en soya, comparado con el producto de β -glucano comercial.

N°	RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcanc e meta	
4	12	Especie de microalgas con capacidad de mejorar el fitness de peces alimentados con una dieta estresante en soya, comparado con el producto de β -glucano comercial.	% de protección intestinal efecto microalga				Junio 2016	0%
			% Variación de la expresión de genes marcadores de respuesta inmune innata				Junio 2016	100%

			% Variación de Supervivencia (VPS)					Junio 2016	0%
--	--	--	------------------------------------	--	--	--	--	------------	----

Esta experiencia fue desarrollada en el Hatchery de la sede Pto. Montt de la Universidad Santo Tomás, desde el 15 de marzo del presente año. Eran dos estanques por dieta y en total 8 estanques con truchas de un promedio de 100 g.

Por estanque, 2 peces fueron recolectados, es decir 4 peces por cada tipo de dieta, a los cuales se les analizó las dimensiones de las vellosidades intestinales y la respuesta inmune a través de expresión de genes por qPCR. Las muestras fueron tomadas a los 0, 30 y 60 días de alimentación con cada dieta. Los valores promedios de largo de vellosidades se presentan en la tabla XI.

Tabla XI. Largo vellosidades (μm) de intestino anterior medidas desde muestras de truchas alimentados con las distintas dietas.

Dieta	Composición	día 0	día 30	día 60
Dieta 1 (b)	Soya 15%	588 \pm 96	530 \pm 46	739 \pm 65
Dieta 2 (c)	Soya 15% + 0,05% B-glicano	588 \pm 96	529 \pm 30	623 \pm 68
Dieta 3 (a)	Soya 15% + 0,5% A2	588 \pm 96	589 \pm 87	644 \pm 138
Dieta 4 (a)	Soya 15% + 0,5% A1	588 \pm 96	511 \pm 29	669 \pm 93

Se puede observar en la tabla XI que el largo de las vellosidades parte en valores cercanos a los 588 μm para el día 0, sin disminuir de forma significativa el día 30 y aumentando su largo para el día 60 de alimentación en todas las dietas, en especial aquella que sólo incluía soya 15% (dieta 1).

Se realizó el cálculo del porcentaje de protección intestinal por efecto del alga, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla XII. Cálculo del porcentaje de protección intestinal por día utilizando los datos de la tabla XI.

	Microalga A1		Microalga A2	
	día 30	día 60	día 30	día 60
a-b	59	-96	-19	-70
c-b	-1	-117	-1	-117
(a-b/c-b)*100	-9057,69	81,99	2907,69	59,97

Al analizar los datos crudos presentados en la tabla XI, en general no hay diferencias entre las dietas. En especial, para el día 30 de alimentación, no son evidenciadas diferencias entre la dieta 1 y la dieta 2, por lo que al aplicar la resta para la obtención del porcentaje de protección intestinal obtenemos un valor muy pequeño (-1) que genera que el resultado porcentual final sea de miles, para ambas microalgas. Luego al día 60 de alimentación, el largo de las vellosidades de la dieta con soya 15% (dieta 1) es mayor que la dieta similar pero que incluye β -glucano comercial (dieta 2). Por este motivo, el valor de la resta de ambos entrega un valor negativo. Sin embargo, ocurre el mismo fenómeno para las dietas que incluyen las microalgas, y por tanto, los valores obtenidos también son negativos, con lo que el valor porcentual final es un valor positivo de 82% para la microalga A1 y de 60% para la microalga A2.

En general, se observa gran variabilidad entre los datos (alta desviación estándar), por lo que las diferencias observadas no son significativas entre si. Sin embargo, se puede sugerir que en trucha la dieta con 15% soya no produciría una inflamación intestinal seria, como si observamos en Salmón del atlántico y de hecho que a los 60 días, las vellosidades seguirían alargándose de acuerdo a lo esperado.

A nivel de expresión génica, al igual que en el ensayo con *S. salar*, en truchas se midió para el tiempo 0, 30 y 60 de alimentación, el comportamiento de los genes de los linfocitos CD4 y CD8b, como parte del sistema inmune inducido, y los genes del interferón gama (INFg), las interleuquinas 12 y 18 (IL-12b e IL-18), como representantes del sistema inmune innato. Como gen de referencia se utilizó el gen para el factor de elongación 1 (ELF1a).

Se calcularon las expresiones relativas de cada gen, normalizando el valor de expresión contra el valor obtenido en el gen de referencia y además, comparando la expresión con aquella obtenida al comenzar el experimento, es decir, en el tiempo 0.

Luego, se calculó el % de variación expresión de genes marcadores de respuesta inmune y la respuesta obtenida para cada microalga se presentan en la tabla XIII.

Tabla XIII. % de variación de la expresión de genes en respuesta a los días de alimentación con la dieta que incluía microalga A1 y A2.

Microalga A1	día 30	día 60	Microalga A2	día 30	día 60
CD4	268,87	-390,45	CD4	157,14	273,34
CD8b	5,57	99,89	CD8b	217,47	-12,71
INFg	311,64	429,38	INFg	-81,54	1179,74
IL-12b	-16,36	110,23	IL-12b	161,49	124,93
IL-18	-3,68	97,56	IL-18	98,76	113,60

La expresión génica calculada para cada gen en cada tiempo puede ser mayor o menor al valor determinado para el tiempo 0. Cuando hay mayor expresión, la diferencia de expresión entre la dieta de con microalga y/o la dieta control vs la dieta con 15% soya entrega un valor positivo. Si hay menor expresión, el valor de la diferencia entrega un valor negativo.

Revisando en detalle la tabla XIII observamos que para la microalga A2 (Dieta 3) los genes CD4, IL-12b e IL-18 presentan valores positivos a los 30 y 60 días de alimentación. Distinto es el comportamiento para la dieta que incluye la microalga A1 (Dieta 4), en que observamos valores positivos sólo para los genes CD8b e INFg.

Si revisamos el detalle de las expresiones génicas, observamos que los genes de respuesta inmune adquirida se encuentran activados comparados con el tiempo 0 en todas las dietas, excepto en la dieta 4 para el día 60 para el gen CD4 (Figura 14). Un comportamiento similar se observó para *S. salar* (Figura 12). Un comportamiento completamente diferente se observa para el gen CD8b en que se registró una menor expresión génica para todas las dietas en el día 30 en relación al día 0 y una expresión variable según dieta para el día 60, donde las dietas 1 y 3 presentan una expresión mayor al día 0 y las dietas 2 y 4 presentan una expresión inferior al día 0.

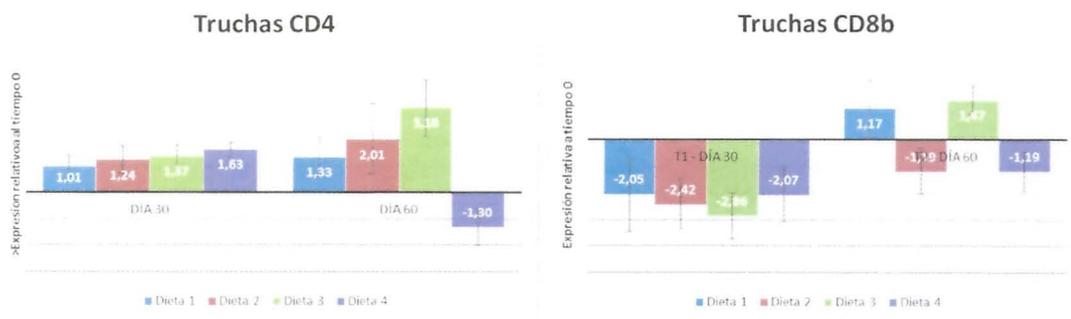


Figura 14. Expresión génica relativa de los genes de respuesta inmune adquirida CD4 y CD8 en función de la dieta y el día de alimentación con cada dieta.

Luego, en los genes de respuesta inmune innata se observa un comportamiento particular, según el gen que se analice. IL-12b presenta una inhibición de la expresión en todos los días y para todas las dietas, respecto del tiempo 0. Un comportamiento similar se observó en *S. salar* (figura 13). En cambio, IL-18 presenta un comportamiento dispar según día y según dieta, estando inhibido para la dieta 1 y la 4 (microalga A1) a los 30 días (figura 15), comportamiento que continúa sólo para la dieta 1 a los 60 días. No se presentan los datos de INFg porque las desviaciones estándar eran mayores que los valores promedio.

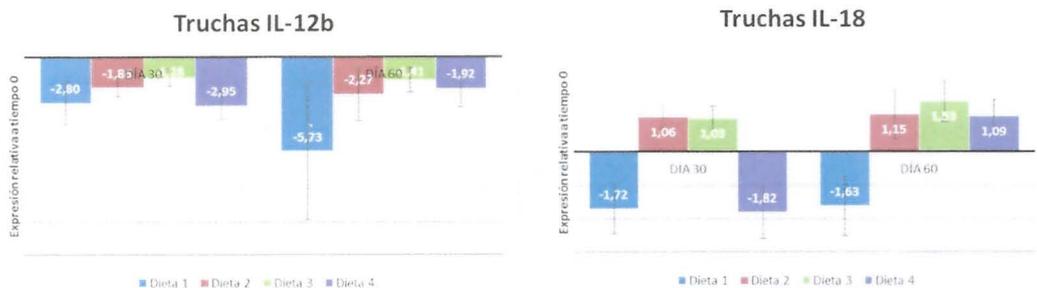


Figura 15. Expresión génica relativa de los genes de respuesta inmune innata IL-12b e IL-18 en función de la dieta y el día de alimentación con cada dieta.

En general, existe alta variabilidad en los datos, con una amplia desviación estándar. Además, como se trata de datos de relaciones relativas, nos fue imposible aplicarle un test estadístico alternativo a estos análisis. Sin embargo, al realizar un análisis de tendencias se podría argumentar que la dieta 3 que incluye la microalga A2 es la que presenta mayores valores promedio en general, comparada con el tiempo 0 y el resto de las dietas. Pero creemos que justamente debido a la alta variabilidad de las muestras, no es posible guiarse por tendencias en este caso.

Finalmente, el último indicador de esta actividad era el porcentaje de Variación de Supervivencia (VPS). Con este indicador se esperaba medir si las dietas podían tener un efecto negativo en la salud de los peces, al nivel que afectara su supervivencia. Sin embargo, no hubo mortalidad entre estanques durante los 60 días que duró el experimento. Cada estanque contaba con 47 peces al comienzo de la actividad y terminó con 43 o 42 peces al final de los 60 días, descontando los 4 peces tomados de muestra el día 30 y 60. Sólo en uno de los estanques, un pez saltó fuera de la malla de protección y no fue posible devolverlo a tiempo al agua. Pero esta mortalidad se debió a un accidente y no por condiciones físicas inducidas por la alimentación. El indicador se calcula entonces: peces al comienzo del ensayo – peces al final del ensayo (47-43 = 4), para todas las condiciones con lo que el avance es de un 0%, es decir, no hubo diferencia entre ellas.

Además de la supervivencia, en el ensayo en CAPIA se evaluaron factores productivos como aumento de talla y peso que se resumen en las figuras que se presentan a continuación.

En la **Figura 16** se puede apreciar cómo se distribuyeron los pesos de los peces alimentados con las diferentes dietas durante el ensayo en los 8 estanques utilizados (dos para cada dieta), tanto al inicio de este como al final. Como muestran las cajas de cada grupo los pesos presentaron en un inicio una distribución simétrica en la mayoría de los estanques, con una baja dispersión, exceptuando los estanques 2 y 3 que muestran asimetría negativa y positiva respectivamente. Respecto a los pesos finales de los peces los valores de mediana estuvieron casi todos cerca de los 150 g pero con una alta dispersión en los estanques 6, 8 y 9.

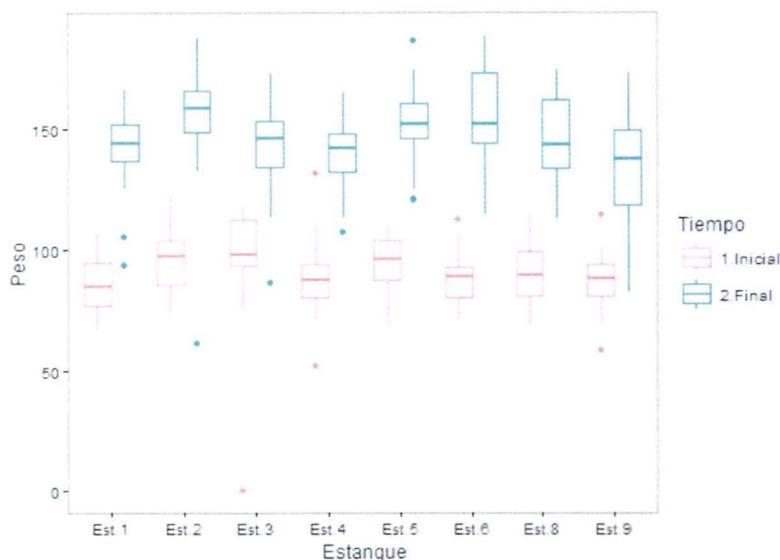


Figura 16. Resultado peso por estanque ensayo CAPIA. Boxplot de la distribución de los pesos alcanzados de los peces por estanque al inicio y al final (60 días) de la etapa de alimentación con las dietas D1 (estanque 3 y 5), D2 (estanque 1 y 6), D3 (estanque 2 y 8) y D4 (estanque 4 y 9).

En cuanto a la dispersión se calculó el coeficiente de variación ($CV=\sigma/x*100$) de los pesos alcanzados al final de la etapa para cada estanque, dando los siguientes valores:

Estanque	1	2	3	4	5	6	8	9
CV	12,91%	17,37%	10,11%	10,13%	11,49%	12,88%	12,33%	18,17%

Lo anterior nos indica que los peces del estanque 2 (Dieta 3) y 9 (Dieta 4) tienen una mayor dispersión en sus pesos al final de la etapa que los otros estanques, aunque en general todos los demás estanques tuvieron niveles bajos de dispersión.

En la **Figura 17** se muestra la distribución de los pesos al inicio y final del ensayo de los grupos de peces para cada tipo de dieta entregada. Se puede apreciar que en general los peces en cada grupo de dietas tuvieron valores de media al final del ensayo cercanas a los 150 g, siendo los peces de la Dieta 4 los que alcanzaron menores pesos. En general hubo una simetría de los pesos finales para las cuatro dietas, destacándose dos valores extremos sobre y bajo el primer y tercer cuartil para el caso de la dieta 1 y una leve asimetría negativa en la dieta 3.

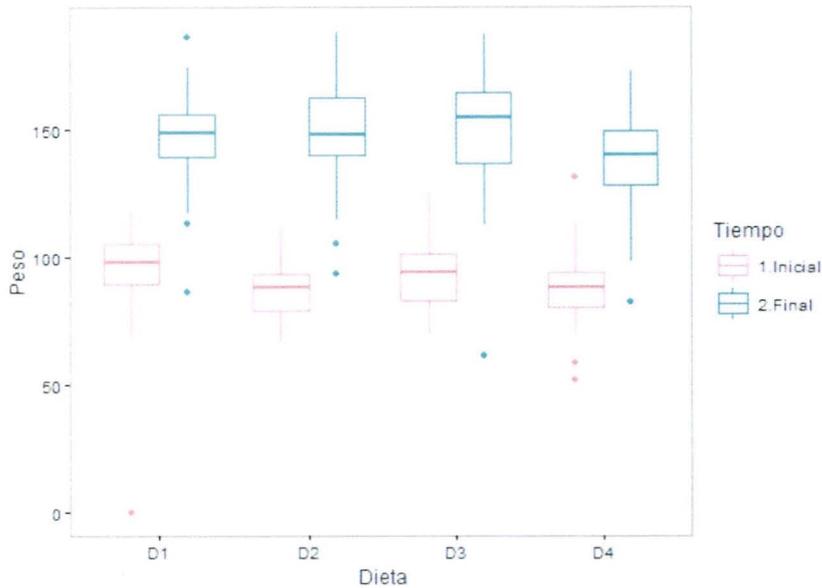


Figura 17. Resultado peso por dieta. Boxplot de la distribución de los pesos alcanzados de los peces por grupo de peces alimentados con las Dietas 1, 2, 3, y 4 al inicio y final de la etapa de alimentación.

Para ver si realmente existe una diferencia en los valores de peso entre las dietas al final de la primera etapa, es que se aplicó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis debido a que en la prueba de Shapiro Wilk ($W = 0.93148$, $p\text{-value} = 1.722e-12$) la variable peso resultó no tener una distribución normal. El resultado de la prueba fue el siguiente:

Kruskal-Wallis chi-squared = 8.9066, df = 3, p-value = 0.03056

Como refleja el numero destacado, el valor de $p=0,03$ nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$ estadísticamente significativo) en los valores de pesos alcanzados al final de la etapa para las 4 diferentes dietas. Para ver cuál es el grupo que está causando las diferencias es que se aplicó una prueba post-hoc de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni, cuyos resultados se muestran a continuación.

```
D1 D2 D3
D2 0.150 - -
D3 1.000 1.000 -
D4 0.045 1.000 0.435
P value adjustment method: bonferroni
```

El valor obtenido de la prueba post-hoc nos indica que la dieta 4, que contiene la microalga A1 presenta valores de peso final significativamente menores ($p=0,045$) que la dieta 1, por lo tanto, sería el grupo que está causando la diferencia, alcanzando un menor peso al final del ensayo.

En la Figura 18 se observa cómo se distribuyen los valores de factor de condición para los 8 estanques utilizados en el ensayo. Si bien en un inicio los valores de FC fueron parejos para la mayoría de los estanques, en el caso de la evaluación al final del ensayo se destaca que los estanques 3 y 5 (ambos

dieta 1) alcanzaron los valores más altos del factor de condición con medianas de casi 1,4, mientras que el más bajo se encontró en el estanque 4 con 1,34. Además del mayor valor del FC, los estanques 3 y 5 tuvieron la más alta dispersión de este dato junto al estanque 9.

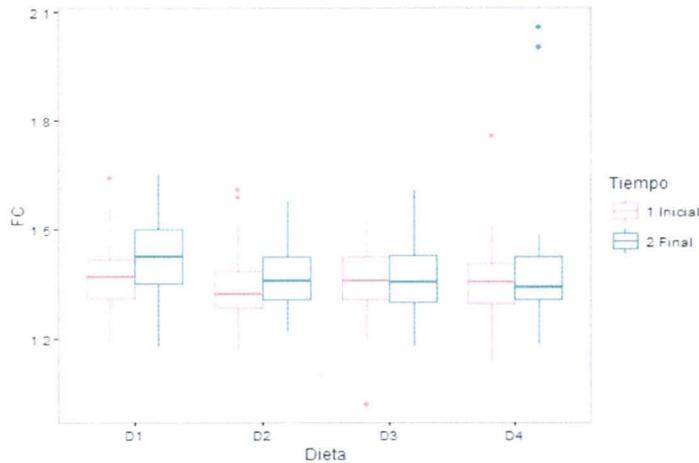


Figura 18. Gráfica factor de conversión por dieta. Boxplot de la distribución de los pesos alcanzados de los peces por grupo de peces alimentados con las Dietas 1, 2, 3, y 4 al inicio y final de la etapa de alimentación.

Respecto al coeficiente de variación ($CV = \sigma/x * 100$) del factor de condición, este arrojó los siguientes resultados:

Estanque	1	2	3	4	5	6	8	9
CV	6,07%	7,56%	8,45%	5,40%	6,68%	6,23%	7,00%	15,05%

De la tabla se puede concluir que en general la dispersión del factor de condición en los estanques fue muy baja, destacándose notoriamente que el estanque 9 (15,05%) tiene un valor casi el doble del CV que el resto de los estanques.

En la Figura 19 se muestra la distribución de los pesos al inicio y final del ensayo de los grupos de peces para cada tipo de dieta entregada. Se puede apreciar que en general los peces en cada grupo de dietas tuvieron valores de media al final del ensayo, cercanas a los 150 g, siendo los peces de la Dieta 4 los que alcanzaron menores pesos. En general hubo una simetría de los pesos finales para las cuatro dietas, destacándose dos valores extremos sobre y bajo el primer y tercer cuartil para el caso de la dieta 1 y una leve asimetría negativa en la dieta 3.

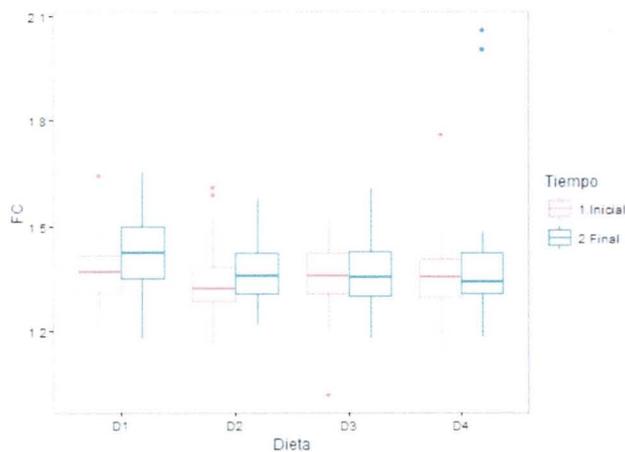


Figura 19. Boxplot de la distribución de los pesos alcanzados de los peces por grupo de peces alimentados con las Dietas 1, 2, 3, y 4 al inicio y final de la etapa de alimentación.

Para evaluar existencia de diferencias en los valores de factor de condición entre las dietas al final de la primera etapa, es que se aplicó un test no paramétrico de Kruskal-Wallis debido a que en la prueba de Shapiro Wilk ($W = 0.91255$, $p\text{-value} = 2.383e-14$) la variable peso resultó no tener una distribución normal. El resultado de la prueba fue el siguiente:

Kruskal-Wallis chi-squared = 9.8716, df = 3, p-value = 0.01969

Como refleja el número final, el valor de $p=0,01$ nos indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$ estadísticamente significativo) en los valores de factor de condición alcanzados al final de la etapa para las 4 diferentes dietas. Para ver cuál es el grupo que está causando las diferencias es que se aplicó una prueba post-hoc de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni, cuyos resultados se muestran a continuación.

```
D1 D2 D3
D2 0.016 - -
D3 0.491 1.000 -
D4 0.179 1.000 1.000
P value adjustment method: bonferroni
```

En el caso del factor de condición se aprecia que la dieta 2 ($p=0,016$) presenta valores de FC menores que la dieta 1 pero alcanza los mismos valores que la dieta 3 y 4.

Ganancia Diaria de Peso

Para evaluar el comportamiento de los peces respecto a la ganancia de peso durante el tiempo de ensayo, fueron calculadas las ganancias diarias (g) para cada estanque, arrojando los siguientes resultados:

Estanque	1	2	3	4	5	6	8	9
GDP (g)	0,72	0,74	1,25	0,67	0,73	0,90	0,74	0,61

Como se observa en la tabla, la mayor ganancia diaria de peso fue de 1,25 g del estanque 3, el cual corresponde a la dieta 1, mientras que la segunda mayor ganancia fue de 0,9 g del estanque 6 correspondiente a la dieta 2. Para el resto de los estanques las ganancias de peso fueron muy similares en torno a los 0,7 g/día.

Factor de Conversión de Alimento (FCR)

El factor de conversión de alimento (FCR, *Food Conversion Rate*) es una medida derivada de una razón matemática que expresa en general la cantidad de alimento suministrado y la biomasa generada, o en términos más simples cuantos kilos de alimento se necesitan para producir un kilo de salmón. Existen dos tipos de FCR, uno biológico y otro económico dependiendo de si la fórmula contiene los valores de biomasa muerta.

Las fórmulas para el cálculo del FCR biológico y FCR económico se muestran a continuación:

$$FCR_{bio} = \frac{\text{alimento consumido}}{\text{biomasa final} + \text{biomasa cosecha} + \text{biomasa muerta} - \text{biomasa ingreso smolt}}$$

$$FCR_{eco} = \frac{\text{alimento consumido}}{\text{biomasa final} + \text{biomasa cosecha} - \text{biomasa ingreso smolt}}$$

Para el caso de este estudio solo se calculó el FCR biológico, que es de mayor relevancia, cuyos resultados se muestran en la siguiente tabla:

Estanque	1	2	3	4	5	6	8	9
FCR biológico	10,74	11,95	5,98	7,34	10,85	7,51	10,62	10,74

Como se observa en la tabla de FCR bio, los mejores resultados se lograron en los estanques 3 (D1), 4 (D4) y 6 (D2), con valores cercanos a los 6 Kg de alimento entregado por kilo de salmón producido.

Tasa Específica de Crecimiento (SGR)

La tasa específica de crecimiento (SGR, *Specific Growth Rate*) está relacionada y definida como el porcentaje diario de ganancia de peso en los salmones. La fórmula utilizada para el cálculo fue la siguiente:

$$SGR = \left(\frac{\text{Ln peso final} - \text{Ln peso inicial}}{\text{días}} \right) * 100$$

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Estanque	1	2	3	4	5	6	8	9
SGR	0,65	0,60	0,91	0,60	0,61	0,76	0,64	0,57

Respecto a los valores de SGR obtenidos, mientras mayor sea el valor, mejores resultados de crecimiento tienen. Al igual que lo observado en FCR bio el estanque 3 (D1) fue el que mejor tasa de crecimiento presentó con un 0,91, seguido del estanque 6 (D2) con un 0,76, el resto de los estanques mostro valores| similares de SGR en torno al 0,6.

Al promediar los valores por cada estanque alimentado con la misma dieta obtenemos los valores de SGR presentados en la tabla XIV.

Tabla XIV. Valores promedio SGR y desviaciones estándar por dieta evaluada.

	Valores promedio SGR	Desviación estándar
Dieta 1 (15% soya)	0,76	± 0,212
Dieta 2 (15% soya + 0,05% B-glucano)	0,71	± 0,078
Dieta 3 (15% soya + 0,5% microalga A2)	0,62	± 0,028
Dieta 4 (15% soya + 0,5% microalga A1)	0,59	± 0,021

Conclusiones

- Respecto a las variables productivas analizadas de peso y factor de condición, las pruebas de Kruskal-Wallis arrojaron que hubo diferencias significativas entre los grupos de dietas.
- Los resultados post-hoc arrojaron que en el caso del peso, la dieta 4 fue la que presento la diferencia, donde mostró valores menores que dieta 1 ($p < 0,05$). Algo similar ocurrió con el factor de condición donde la dieta 2 mostró diferencias significativas respecto a dieta 1, teniendo esta última valores más altos de FC.
- En relación al FCR y SGR se destaca que para ambas variables el estanque 3 y estanque 6, dieta 1 y dieta 2 respectivamente fueron los grupos de peces que tuvieron mejores resultados en estas variables productivas. Sin embargo, al promediar los valores con el otro estanque de la misma dieta, no se obtuvieron diferencias entre dietas.

IMPACTO: Los peces alimentados con la dieta 4, que contenía la microalga A1, mostraron un menor aumento en peso respecto a la dieta control sólo con soya (dieta 1). Los peces alimentados con la dieta 2, que contenía el B-glucano comercial, presentaron un menor factor de conversión que la dieta 1. Sólo la dieta 3 con la microalga A2, presentó valores similares de peso y conversión comparado con la dieta control.

7.4.8 Resultado Esperado 5.13. A escala productiva, producción de una biomasa rentable de microalga seca para desarrollar el prototipo comercial.

Nº O E	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)				% de avance a la fecha	
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)		Fecha alcance meta
5	13	A escala productiva, producción de una biomasa rentable de microalga seca para desarrollar el prototipo comercial.	Productividad volumétrica de biomasa (Qc) de microalga a escala productiva (5.000 l)				Mayo 2016	100%

Como se detalla en los puntos 3.7 y 3.9, la Universidad de Antofagasta realizó el crecimiento de las microalgas a nivel de prototipo de hasta 7,7 m³ (7700 L).

En promedio para estas especies marinas en sistemas tipo raceway de 7,7 m³, a los 17 días se logra generar un cultivo semicontinuo, con una tasa de crecimiento de entre 0,4 – 0,5 g/L, cosechando el 7% del volumen diariamente (616 L) y obteniendo 180 g de biomasa seca al día, tras tener pérdidas del 15% en el proceso de centrifugación y de secado. Si consideramos los 17 días necesarios para el establecimiento de este tipo de cultivo la productividad es de 0,017 g/L/día el día 17 y de 0,1526 g/L/día para el día 33 de cultivo (Tabla XV). Utilizando estos valores y tomando como base 0,04 g/L/día definido en el plan operativo, el avance corresponde a -21% al día 17 ($= (0,017-0,04) / (0,15-0,04)*100$) y de 102% al día 33 de producción ($= (0,1526-0,04) / (0,15-0,04)*100$).

Para estimar la rentabilidad económica del producto, es necesario considerar los costos de producción y la cantidad que es necesario utilizar dentro del alimento. La dieta que entregó mejores resultados fue la dieta que incluía la microalga A2, que en S. salar generó un efecto de protección intestinal en los peces y que frente a desafío con *P. salmonis* se comportó de manera similar al control con 15% con soya. Los costos estimados de producción por la Universidad de Antofagasta para microalgas marinas se presentan en la tabla XV:

Tabla XV. Estimación de costos de producción al escalar los cultivos de microalgas.

N° RW	Capacidad de planta (Ha)	Ton Biomasa/año	RRHH U\$/kg	Costo Nutrientes \$US/kg	Energía U\$/kg	Costo total (U\$/kg)
1	0,1	1,3	74	1,9	10	86
10	1	13	15	1,87	10	27
50	5	66	4	1,47	10	16
100	10	131	3	1,47	10	14
400	40	524	1	1,47	10	13

Según los valores indicados en la tabla XV, con una superficie de 40 Ha es posible alcanzar un costo estabilizado de USD 13.- por Kg de microalga.

En conversaciones con Salmofood, ellos nos indican que en las dietas que ellos venden, el β -glucano proveniente de levadura se adiciona al 0,05%-0,1% según la dieta, acompañado de otros compuestos inmunoestimulantes como nucleótidos, vitaminas y minerales. Este β -glucano comercial se vende a USD 15.- el Kg.

Considerando que el alimento que incluía microalga contenía un 0,5% de la biomasa microalgal (5 g/ Kg; Dietas 5 y 6), el precio por el aditivo sería en el mejor de los casos de USD 0,065.- es decir 43 veces superior al costo del B-glucano comercial (Tabla XVI).

Tabla XVI. Comparación de costos de producción entre microalga y B-glucano comercial

N° Ha	Costo total microalga (USD/Kg)	posologia microalga	Costo microalga/Kg alimento (USD)	Costo B-glucano (USD/Kg)	posologia B-glucano	Costo /Kg alimento (USD)	Microalga vs B-glucano (costo por Kg alimento)
0,1	86	0,50%	0,43	15	0,01%	0,0015	287
1	27	0,50%	0,135	15	0,01%	0,0015	90
5	16	0,50%	0,08	15	0,01%	0,0015	53
10	15	0,50%	0,075	15	0,01%	0,0015	50
40	13	0,50%	0,065	15	0,01%	0,0015	43

IMPACTO: Los costos de producción de la microalga y/o la mayor cantidad de biomasa que es necesario incluir en el alimento, hacen que el valor comercial del producto generado NO sea competitivo con las alternativas de la competencia que presentan una respuesta similar en peces a la observada con nuestro producto.

7.4.9 Resultado Esperado 5.14. Reuniones comerciales con posibles clientes de la industria salmonera y de alimentos para animales.

Nº O E	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)				% de avance	
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)		Fecha alcance meta
5	14	Reuniones comerciales con posibles clientes de la industria salmonera y de alimentos para animales.	Definición de clientes				Julio 2016	75%

Se tuvieron reuniones comerciales con 3 posibles clientes de la industria salmonera y de alimentos para animales. En concreto nos reunimos con:

Lorenzo Fernández, Biólogo Marino, Salmofood www.salmofood.cl

Fernando Schulze, Médico Veterinario, MNL-Group www.maquinewliffe.com

Manuel Palma Astudillo, Senior Researcher, TEAM www.team.co

En general, la recepción del producto fue positiva, demostrando el interés que tiene la industria por alternativas amigables que fortalezcan el sistema inmune de los animales de crianza. Sin embargo, dado los resultados obtenidos en los costos del producto, no fue posible obtener documentos de interés de estos productores.

Con fecha posterior a este informe, nos reuniremos con representantes del área de Innovación de la empresa Agrosuper, para evaluar posibles aplicaciones de las microalgas en la industria porcina. Sin embargo, para el cálculo de cumplimiento consideramos sólo las 3 empresas mencionadas, por lo que se alcanzó el 75%.

IMPACTO: Existe interés de parte de la industria frente a nuevas fuentes de inmunoestimulantes. Sin embargo, deben ser alternativas que compitan en precio y calidad con las ya existentes en el mercado. Nuestro producto requiere de estudios posterior para lograr un precio competitivo.

7.4.10 Resultado Esperado 5.15. Empresas de la industria salmonera demuestran su interés en este producto y nos solicitan cotizaciones comerciales.

Nº O E	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha alcance meta	
5	15	Empresas de la industria salmonera demuestran su interés en este producto y nos solicitan cotizaciones comerciales.	Número de Cotizaciones solicitadas				Agosto 2016	0%

No se logró el resultado esperado de obtener cotizaciones por nuestro producto. Este resultado negativo creemos se debió principalmente a que los resultados como inmunoestimulante no fueron suficientemente robustos, en especial en la protección contra P. salmonis y además al elevado precio final que tiene el producto según su costo de producción y las condiciones definidas actualmente para su uso.

IMPACTO: No se logró generar cotizaciones por el producto. Será necesario evaluar si el producto posee efectos más contundentes en peces más pequeños y también evaluar maneras de bajar los costos de producción.

7.4.11 Resultado Esperado 5.1.6. Producto comercial con un precio menor o igual al de β -glucanos de levadura actualmente comercializada

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)				% de avance a la fecha	
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)		Fecha alcance meta
5	16	Producto comercial con un precio menor o igual al de β -glucanos de levadura actualmente comercializada	Competitividad del precio venta por Kg de microalga inmunestimulante				Julio 2016	0%

Como se discutió en el resultado esperado N°5.13. el producto comercial del inmunestimulante en base a microalgas no es competitivo respecto al producto actualmente utilizado por la industria. Las estimaciones iniciales indicaban un valor 3 veces superior al B-glucano comercial, sin embargo, los resultados productivos y de uso de la biomasa microalgal, sugiere que el producto comercial tendría un precio 50-100 veces superior a las alternativas ofrecidas actualmente a la industria. Con este resultado, el porcentaje de avance de este resultado esperado es de un 0%.

IMPACTO: El impacto principal es para la industria de las microalgas, para la cual una nueva oportunidad de producto se ve limitada por costos de producción. La conclusión para los B-glucanos, de forma similar a lo que ha sido para el biodiesel y los omega 3, es que es necesario bajar los costos de producción de la biomasa microalgal para poder competir en la actualidad con los productos de la competencia.

7.5 PROBLEMAS ENFRENTADOS DURANTE LA EJECUCIÓN PROYECTO (LEGAL, TÉCNICO, ADMINISTRATIVO, DE GESTIÓN) Y LAS MEDIDAS TOMADAS PARA ENFRENTAR CADA UNO DE ELLOS.

Durante la ejecución de este proyecto PYT-2016-0339, los principales problemas en la ejecución fueron de financiamiento. Las actividades como tales comenzaron en enero de 2016, como estaba estipulado en la planificación inicial. Sin embargo, por temas legales y de burocracia de la UST y de FIA, los fondos de la primera cuota fueron liberados recién en junio de 2016. Esto significó tener que trabajar y avanzar en las actividades apalancados principalmente por los proveedores, quienes muy solidariamente esperaron a fechas incluso posteriores a julio para que le fueran pagados servicios y productos. Esta situación frenó otros desarrollos que se podrían haber ejecutado, pero que no fueron analizados a tiempo o que preferimos no realizar por la falta de recursos disponibles.

8 DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS ADJUNTANDO LAS PUBLICACIONES REALIZADAS EN EL MARCO DEL PROYECTO O SOBRE LA BASE DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS, EL MATERIAL DE DIFUSIÓN PREPARADO Y/O DISTRIBUIDO, LAS CHARLAS, PRESENTACIONES Y OTRAS ACTIVIDADES SIMILARES EJECUTADAS DURANTE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO.

Los resultados del proyecto han sido difundidos a través de una charla final, por prensa escrita en el envío de publicaciones científicas y también en conversaciones con empresas interesadas.

8.1 CHARLA

Con fecha 31 de Agosto de 2016 se dictó una charla presentando los resultados finales del proyecto FIA PYT 2016-0339 en la sede de Pto. Montt de la Universidad Santo Tomás. Con dos días de anticipación, se invitaron a dicha charla a distintos agentes de la industria y de la dirección regional. A continuación, se presenta una copia de la lista de invitados y de la invitación.

Tabla XVII. Lista de invitados a charla de difusión.

Leonardo de la Prida	Intendente Región de Los Lagos
Juan Carlos Gallardo	Gobernador de la provincia de Llanquihue
Rabindranath Quinteros	Senador
Iván Moreira	Senador
Patricio Vallespín	Diputado
Marisol Turres	Diputada
Gervoy Paredes	Alcalde de Puerto Montt
Carlos Soto	Alcalde de Cochamó
Freddy Ibacache	Alcalde de Hualaihue
Rubén Cárdenas	Alcalde de Calbuco
Jorge Westermeyer	Alcalde de Maullín
Soledad Moreno	Alcaldesa de Ancud
Luis Macías	Alcalde de Quemchi
Nelson Aguila	Alcalde de Castro
Juan Alberto Pérez	Alcalde de Dalcahue
Luis Curumilla	Alcalde de Curaco de Vélez

Santiago Torres	Alcalde de Achao
Pedro Montecinos	Alcalde de Puqueldón
Eugenio Larraín	Rector UST
Alberto Augsburguer	Director Académico UST
Eduardo Bustos	Director CAPIA
Marcela Avila	UNAP
Pamela Bertín	Seremi de Agricultura
Carmen Gloria Muñoz	Seremi de Economía
José Plaza	GORE
Carlos Jiménez	GORE
Mauricio Salas	Sercotec
Marcelo Alvarez	Sercotec
secr.	Sercotec
Raúl Súnico	Subsecretario de Pesca
Juan Gutiérrez	Dirección Zonal de Pesca
Sandra Molina	Dirección Zonal de Pesca
Jurgen Betzhold	Subpesca
Daniela Guajardo	Subpesca
José Miguel Burgos	Director nacional de Sernapesca
Marcela Lara	Sernapesca
JOSE PABLO IRRIBARRA	Sernapesca
Alicia Gallardo:	Sernapesca
Eduardo Aguilera	Director Regional de Sernapesca
Brany Monyencinos	Sernapesca
Claudia Gálvez	Sernapesca
Lorena Macaya	Sernapesca
Eduardo Ferrari	Intemit
Cristian Segura	Intemit
Rodrigo Rosales Carreño	ami chile
Manuel Pérez Uribe	AG Productores de Mitílicos de Chiloé
René Vera Reuquén	AG Mitilicultores Queilen
Victor Soto	Presidente Federación de Pescadores Artesanales del Estuario del Reloncaví
Ana Pineda	AG Militicultores Hualaihue
Sandro Maldonado	Federación de Pescadores Artesanales de Hualaihue
Viviana Videla	Fundación Chiquihue
Jorge Tillería	Fundación Chiquihue
Leonardo Guzmán	IFOP
Gastón Vidal	IFOP
Vladimir Murillo	IFOP
David Opazo	IFOP
Patricio Mejías	IFOP

Macarena Herrera	IFOP
Adolfo Alvial	Director Regional de Corfo
Sandra Hernández	Corfo
Hugo escobar	Corfo
Renato Westermeier	UACH
Jorge Carpinelli	UST
Exequiel González	UST
Felipe Manterola	Salmonchile
Felipe Sandoval	INTESAL
Luz María Araya	US
Ricardo Enriquez	UACH
Adrian Hernandez	U. catolica Temuco
Paulo Palacios	Salmones antartica
Carlos Beltran	Salmones antartica
Rodrigo Sanchez	Vitapro
Fernando Schulze	Maquinewlife
Paula Miranda	Maquinewlife
Denise Haussmann	UACH
Jose Troncoso	EWOS
Christopher Hawes	EWOS
Javier Gonzalez	EWOS
Jorge Mancilla	Marine Harvest
Natalia Soria	Pathovet
Andrea Peña	Pathovet
Marco Rozas	Pathovet
Astrid Seperiza	CEUS -USACH Llanquihue
Gonzalo Diaz	Aquadvice - Fundacion Chile



INVITACIÓN

Nicole Ehrenfeld Stolzenbach, Directora del Centro de Investigación Austral Biotech de la Universidad Santo Tomás, tiene el agrado de invitarle a la charla "Evaluando microalgas como fuente de inmunostimulantes para industria salmonera", a realizarse en el marco del cierre del proyecto "Inmunostimulantes para la industria salmonera a partir de cultivos sustentables de microalgas", financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA).

Dicha actividad se realizará el día miércoles 31 de agosto de 2016, a partir de las 10:30 horas, en el Auditorio 1 de la Sede Puerto Montt

Dra. Ehrenfeld agradece desde ya contar con su valiosa presencia.

Figura 20. Invitación enviada para la charla final del proyecto PYT 2016-0339.

A la charla asistieron 37 personas, las que se encuentran identificadas en la siguiente lista de asistencia.



Lista de asistencia cierre del proyecto
 "Evaluando microalgas como fuente de inmunostimulantes para la industria salmonera"
 Puerto Montt, 31 de agosto de 2016

Nombre	Institución	Teléfono	E-mail	Firma
Mariana Jimenez	Santo Tomas			
Miriam Larraín	Santo Tomas			
Juan Carlos Lopez	Santo Tomas			
Maximiliano	Santo Tomas			
Manuel Aranda	Santo Tomas			
German Filippi	Santo Tomas			
Debora Perez	Santo Tomas			
Edmundo Ullmann	Santo Tomas			
Patricio Carretero	CAPI, UST			
Rene Vignati	Capo, UST			



Lista de asistencia cierre del proyecto
 "Evaluando microalgas como fuente de inmunostimulantes para la industria salmonera"
 Puerto Montt, 31 de agosto de 2016

Nombre	Institución	Teléfono	E-mail	Firma
Felipe Soto	Santo Tomas			
Edgar Diaz	Santo Tomas			
Felix Carreras	Santo Tomas			
Hernan Perez	Santo Tomas			
Nadia Diaz Tellez	Santo Tomas			
José María Rodríguez	SUBTELCA			
Juan Carlos Sauter	MNL - Group			
Juan Carlos Sauter	MNL - Group			
Paula Larraín	MNL - Group			
Camila Valencia	Santo Tomas			





Fundación para la
Innovación Agraria

Lista de asistencia cierre del proyecto
"Evaluando microalgas como fuente de inmunostimulantes para la industria salmonera"
Puerto Montt, 31 de agosto de 2016

Nombre	Institución	Teléfono	E-mail	Firma
Amkoy hermsillo	CFT Santo Tomás			
Daniela Gutiérrez	CFT Santo Tomás			
Jessica Valdés	CFT Santo Tomás			
M ^o Cecilia Muñoz	CFT Santo Tomás			
Cecilia Heredia	CFT Sto. Tomás			
Chamilo Miranda	CFT STO. TOMAS			



UST



Figura 21. Lista de asistencia a charla de cierre de proyecto.

Por ser un evento desarrollado dentro de una universidad, participaron varios alumnos y académicos de la universidad en la charla. Destaca la participación de profesionales de las empresas Salmofood, MNL group, Walbusch y Subpesca.

En la siguiente figura se muestran algunas fotos de la actividad.



Figura 22. Imágenes de charla de difusión de resultados finales proyecto FIA PYT-2016-0339. A. Vista hacia el público. B. Vista hacia la presentación. C. Dra. Ehrenfeld durante la presentación. D. Tras la presentación, Leonardo Fernandez, SalmoFood, Dra. Ehrenfeld, AustralBiotech-UST y Dr. Eduardo Bustos, Director CAPIA UST-Pto. Montt.

8.2 PRENSA ESCRITA

Por motivo de la charla de difusión, la temática fue difundida en prensa escrita de la zona y del área salmonera. En particular, aparecimos en tres revistas de la zona: diario "El Llanquihue", sección visión acuícola; periódico Datos Sur; Revista SalmonExpert.

Has tu Check-in y ahorrá... Microalgas como inmu...
 www.salmonexpert.cl/informacion/microalgas-como-immunoestimulantes-en-dietas-para-salmones

NEWSLETTER SERVICIO AL CLIENTE salmonexpert.cl

Más Leídas

- Escocia invierte para mejorar alimentación de salmonidos
- Cuestionan estudio sobre Omega-3
- Chile y Japón plantean esfuerzos conjuntos para posicionar salmon chileno
- Brasil: nuevo hallazgo sobre nivel de mercurio en salmon
- 2016: Chile sera el mercado salmonicultor que mas decrecera

Microalgas como inmunoestimulantes en dietas para salmones

Chile: La investigación ejecutada desde el año 2013 por Austral Biotech y

<http://www.salmonexpert.cl/noticias/microalgas-como-immunoestimulantes-en-dietas-para-salmones/>

Has tu Check-in y ahorrá... Portal asociativa pesca... Estudio sugiere la utiliz...
 www.datossur.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=8017:2016-09-01-22-09-30&catid=35:nacional&Itemid=87

Periódico DATOS SUR

INICIO AUTOMOTRIZ NOTICIAS CLASIFICADOS CONTACTO

DATOS SUR **DATOS SUR** **No pierda la oportunidad de publicar con esta espectacular oferta!**

Aviso de 8 x 12 cms. \$ 20.000.-
Aviso de 8 x 21,7 cms. \$ 40.000.-

Avisos válidos por dos publicaciones.
 Publicando con esta oferta gratis un aviso para internet.
 Para el próximo Datos un aviso de estos 8 x 12 cms. libre.

OFERTAS DE LA SEMANA

GRAN REMATE DE PROPIEDADES

Estudio sugiere la utilización de microalgas como inmunoestimulantes a incluir en dieta de peces

http://www.datossur.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=8017:2016-09-01-22-09-30&catid=35:nacional&Itemid=87



<http://www.ellanquihue.cl/impres/2016/09/06/full/cuerpo-principal/12/>

8.3 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Durante 2016 fueron enviados dos trabajos a distintas revistas ISI para su publicación.

El primer trabajo es una revisión sobre B-glucanos y microalgas y fue enviado a la Revista de Biología Marina y Oceanografía. Se adjunta mail de recepción. Nos encontramos a la espera de la respuesta de la revista si se acepta o no el trabajo.



nicole Ehrenfeld

Acuse Recibo y Obs. REV RBMO N Ehrenfeld

Secretaria RBMO
To: Nicole Ehrenfeld
Cc:

Tue, Jun 14, 2016 at 9:47 PM

Estimada Dra. Ehrenfeld:

Su manuscrito ha sido revisado y le informo que será sometido como Revisión en nuestra revista.

Por tanto, de parte de nuestra editora Dra. Claudia Bustos le envío la carta de acuse recibo de su ms: "B-glucanos, su producción y propiedades en microalgas con énfasis en el género *Nannochloropsis* (Ochromytha, Eustigmatales)".

Además ruego a usted revisar las observaciones editoriales realizadas y confirmar o corregir según sea lo indicado en el archivo adjunto.

Quedamos a su disposición para sus consultas, le saluda cordialmente,

Pamela Contreras Bravo
Secretaria RBMO
Universidad de Valparaíso
Viña del Mar - Chile

www.revbiolmar.cl

@revbiolmar

Figura 23. Acuso de recibo de trabajo científico derivado del proyecto FIA PYT-2016-0339 para revista de Biología Marina y oceanografía.

La segunda publicación científica fue enviada por el grupo de la Dra. Carmen Gloria Feijoó, de la Universidad Nacional Andrés Bello y aborda los ensayos en pez cebrá realizados dentro del proyecto FIA PYT 2013-0015, etapa previa al proyecto FIA PYT 2016-0339. A continuación, se presenta mail de recepción de documento. Estamos a la espera de la aceptación de este documento.

De:

en nombre de Fish & Shellfish Immunology

Enviado: martes, 27 de septiembre de 2016 20:32

Para: Carmen Gloria Feijoo Garcia;

Asunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Carmen G Feijoo,

Your submission entitled "Effect of microalgae on intestinal inflammation triggered by soybean meal and bacterial infection in zebrafish larvae" under article type: Full Length Article has been received by Fish and Shellfish Immunology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fsim/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Fish and Shellfish Immunology

 FSM-S-16-01035.... 

Figura 24. Acuso de recibo de trabajo científico derivado del proyecto FIA PYT-2016-0339 y FIA PYT-2013-0015 para revista Fish and Shellfish Immunology.

8.4 PRODUCTORES PARTICIPANTES

Antes o durante la charla de difusión, nos entrevistamos con los siguientes representantes de empresas de la industria salmonera, para discutir los resultados obtenidos del proyecto.

Lorenzo Fernández, Biólogo Marino, Salmofood www.salmofood.cl

Fernando Schulze, Médico Veterinario, MNL-Group www.maquinewlife.com

Manuel Palma Astudillo, Senior Researcher, TEAM www.team.co

En general, la recepción del producto fue positiva, demostrando el interés que tiene la industria por alternativas amigables que fortalezcan el sistema inmune de los animales de crianza. Sin embargo, dado los resultados obtenidos en los costos del producto, no fue posible obtener documentos de interés de estos productores.

Con fecha posterior a este informe, nos reuniremos con representantes del área de Innovación de la empresa Agrosuper, para evaluar posibles aplicaciones de las microalgas en la industria porcina.

9 CONCLUSIONES

El proyecto FIA PYT 2016-0339 “Inmunoestimulantes para la industria salmonera a partir de cultivos sustentables de microalgas” buscaba evaluar la factibilidad de utilizar las microalgas como fuente sustentable de inmunoestimulantes para la industria salmonera. El proyecto estaba basado en la presencia del polímero de glucosa con enlaces tipo beta (β -glucano) en las microalgas, polímero que actualmente es utilizado en la industria, pero obtenido desde levadura de cerveza. Los resultados obtenidos sugieren que la microalga seleccionada por acumular mayores cantidades de β -glucano (A1), no presentó un efecto inmunoestimulante en los peces y de hecho, en ensayos de engorda, mostró tener un efecto negativo sobre el aumento de peso de truchas, respecto a las otras dietas evaluadas. Creemos que este efecto se debe principalmente a la gruesa pared celular que posee esta especie de microalga, efecto que se podría mitigar al entregar la biomasa con un tratamiento de molienda previa. Nuevas pruebas serán necesarias para validar esta alternativa.

Una segunda especie de microalga que no acumulaba β -glucanos (A2), fue evaluada en salmónidos, basándonos en resultados previos obtenidos en pez cebra. En peces de Salmón atlántico alimentados con alimento que contenía esta especie, observamos un efecto de protector intestinal medido principalmente en un mayor largo de las vellocidades del intestino anterior del grupo alimentado con esta dieta (Figura XX). A su vez, este mismo grupo de peces presentó un comportamiento similar al control sin microalga en un ensayo de desafío con *P. salmonis*, indicando que no posee efectos negativos sobre los peces. Finalmente, en ensayos de engorda realizados en trucha arcoíris, encontramos que los grupos alimentados con la dieta que contenía esta especie se comportaron de manera similar en crecimiento y engorda a la dieta que contenía el β -glucano comercial.

En paralelo a las evaluaciones del efecto inmunoestimulante, se realizaron pruebas de producción de las microalgas a nivel productivo, en asociación con la Universidad de Antofagasta. Los resultados obtenidos sugieren que es posible producir la microalga a un costo de USD 13/kg de biomasa seca. Este valor se encuentra dentro o bajo el rango de precios internacionales de otras microalgas, aunque se trata de una especie no producida a nivel internacional. Sin embargo, por la posología evaluada y los costos de producción, el producto inmunoestimulante basado en microalgas no logra ser competitivo frente a la competencia, ya que su costo de producción supera

en 43 veces el precio de venta del β -glucano comercial. Serán necesarias nuevas pruebas para evaluar si con menores cantidades de microalga es posible generar un efecto similar en peces y/o bajar los costos productivos de microalgas, para lograr contar con un producto interesante para el mercado.

10 RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en los estudios en pez cebra indican que la especie A2 tendría el efecto de protector intestinal y también inmunoestimulante en larvas de este teleosteo. Por temas de coordinación, las evaluaciones del efecto inmunoestimulante en peces de este proyecto fue realizado en peces de 100 g, es decir casi smolt, en los cuales encontramos poca respuesta. Sería muy interesante repetir los ensayos en peces de salmónidos más pequeños, buscando repetir el efecto inmunoestimulante observado en pez cebra. Estas pruebas debieran realizarse ojalá con menores posologías, con el objetivo de acercar el producto a un precio de costo que sea competitivo en la industria.

Así mismo, esta protección intestinal podría ser de interés para otras industrias como la porcina, lechera o avícola.

11 OTROS ASPECTOS DE INTERÉS

El aumento en los costos de la obtención de materia prima de la pesca pelágica, tiene a la industria salmonera en una encrucijada buscando fuentes alternativas de proteínas y aceites poli-insaturados. El proyecto presentado no evaluó las microalgas en este sentido, sin embargo, creemos firmemente que el futuro de la producción animal deberá estar basado en la producción sustentable de productos básicos y especializados, como los inmunoestimulantes. Las microalgas han mostrado ser una fuente alternativa sustentable de proteínas (*Chlorella* y *Spirulina*) y de ácidos grasos insaturados (*Nannochloropsis*, *Isochrysis*), lo que asociado a los antecedentes de protección intestinal podrían generar un producto multifunción que sí sea interesante a nivel comercial. Será necesario realizar estos análisis combinados en un proyecto futuro para darle una opción comercial a las microalgas.

12 ANEXOS

Las planillas Excel y pdf con los resultados de histología y qPCR de los ensayos en peces se adjuntan en el documento digital.

13 BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Abugoch, L., Tapia, C., Villamán, M., Yazdani-Pedram, M. & Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, **25**, 879-886.

Cheng, Z. J. and Hardy, R. W. (2003), Effects of extrusion processing of feed ingredients on apparent digestibility coefficients of nutrients for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 9: 77-83. doi: 10.1046/j.1365-2095.2003.00226.x

Daou, C., & Zhang H. (2012). Oat B-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **11**, 355-365.

Jung, H., Hong, J., Park, S., Park, B., Nam, D., & Kim, S. (2007). Production and Physicochemical Characterization of β -Glucan Produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **12**, 713-719.

Kagimura, F., da Cunha, A., Theis, T. Malfatti, C., Dekker, R., Barbosa, A., Teixeira, S., & Salomé, K. (2015). Carboxymethylation of (1 \rightarrow 6)- β -glucan (Iasiodiopdan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. *Carbohydrate Polymers*, **127**, 390-399.

Limberger-Bayer, V., de Francisco, A., Chan, A., Oro, T., Ogliari, P., & Barreto, P. (2014). Barley β -glucans extraction and partial characterization. *Food Chemistry*, **154**, 84-89.

Mikkelsen, M. S., Jespersen, B. M., Moller, B. L., Laerke, H. N., Larsen, F. H., & Engelsen, S. B. (2010). Comparative spectroscopic and rheological studies on crude and purified soluble barley and oat β -glucan preparations. *Food Research International*, **43**, 2417-2424.

Pouria, A., Bandegani, H., Pourbaghi-Masouleh, M., & Alizadeh, M. (2012). Physicochemical Properties and Cellular Responses of Strontium-Doped Gypsum Biomaterials. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, doi:10.1155/2012/976495.

SØRENSEN, M., STOREBAKKEN, T. and SHEARER, K.D. (2005), Digestibility, growth and nutrient retention in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets extruded at two different temperatures. *Aquaculture Nutrition*, 11: 251-256. doi: 10.1111/j.1365-2095.2005.00347.x
Aquaculture Volume 317, Issues 1-4, 4 July 2011, Pages 138-145
Aquaculture Volume 265, Issues 1-4, 1 May 2007, Pages 244-252

Aquaculture Volume 312, Issues 1–4, 25 February 2011, Pages 154–161

Størseth, T., Hansen, K., Reitan, K., & Skjermo, J. (2005). Structural characterization of β -D-(1-3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mülleri* and *Thalassiosira weissflogii*. *Carbohydrate Research*, **340**, 1159–1164.

Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C., & Song, S. (2008). Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, **43**, 283–288.

Xia, S., Gao, B., Li, A., Xiong, J., Ao, Z., & Zhang, C. (2014). Preliminary Characterization, Antioxidant Properties and Production of Chrysolaminarin from Marine Diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, **12**, 4883-4897.