

Desarrollo de un alimento enriquecido con probióticos microencapsulados para la Tilapia roja (*Oreochromis sp.*) a partir de coproducto de la fermentación de la cerveza

María Paula Vaca López (20143289)

Ph.D. Luis H. Reyes* & Ph.D. Lorena Castro**

*Departamento de Ingeniería Química, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

**Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia

RESUMEN

La tilapia roja (*Oreochromis sp.*) es uno de los alimentos más consumidos y producidos en Colombia durante los últimos años. Aunque popular, la industria pesquera está poco formalizada y aquellos productores que no lo están se encuentran en desventaja con respecto a los que sí, no sólo en cuanto su capacidad productiva, sino por el acceso a insumos agropecuarios eficientes y de excelente calidad. Considerando las grandes cantidades de levadura generada como coproducto tras el proceso de fabricación de cerveza y que demuestra ser una fuente con alto contenido nutricional, esta investigación se enfocó en producir un alimento para tilapia a bajo costo enriquecido con microcápsulas de bacterias ácido lácticas probióticas en una matriz biodegradable prebiótica fabricada por un método innovador de encapsulación que actualmente se encuentra en desarrollo y que tiene el potencial de revolucionar la forma de transportar componentes bioactivos por su eficiencia y tamaño. El resultado de este producto fue la formulación de un alimento resistente al estrés mecánico y estable en el tiempo con una concentración probiótica superior a 10^6 UFC/g que resiste las condiciones simuladas del tracto gastrointestinal de la tilapia y que contiene células viables tras condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente (18°C) y refrigeración a 4°C.

PALABRAS CLAVE: Levadura, inulina, polímeros biodegradables, electrospraying, probióticos, prebióticos, piscicultura.

NOMENCLATURA

ADE	Agua Destilada Estéril	SE	Solución estomacal
CMC	Carboximetilcelulosa	SI	Solución intestinal
GA	Goma arábica	LAC	Bacterias ácido lácticas
MB	Microcápsulas bacteria		
MC	Microcápsulas Control		
PBS	Phosphate Buffered Saline		

1. INTRODUCCIÓN

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el pescado es un producto alimenticio de gran importancia gracias al valor nutricional que aporta a la dieta humana así como el papel que juega al garantizar la seguridad alimentaria para las futuras generaciones [1]. En Colombia, cada persona consume anualmente en promedio siete kilos de pescado, lo cual en España representa únicamente el consumo anual de camarón [2]. En contraposición a esto, la producción de pescado en el país hasta el año 2015 fue de 150.465 toneladas, los cuales 70,9% corresponden al sector acuícola [3]. Específicamente, la piscicultura ha tenido un crecimiento importante en la producción de pescado, generando menos de 10.000 toneladas en 1990 hasta lograr aproximadamente 105.000 toneladas a 2015, siendo la tilapia la que se produjo en mayor cantidad (más de 50.000 toneladas a 2012) y superando en gran medida la producción de cachama, trucha, cobia y otras especies continentales [3]. Adicionalmente, Colombia cuenta con más de 20 millones de hectáreas de ecosistemas acuáticos muy diversos y una amplia variedad de condiciones climáticas relativamente estables [4], lo cual la convierte en una región altamente productiva y atractiva para la inversión que puede hacer grandes contribuciones al crecimiento económico del país; sin embargo, aproximadamente el 75% de los pescadores no se encuentran formalizados [5] y por ende enfrentan limitaciones para mejorar su productividad y

competitividad, éstas últimas relacionadas no sólo a estrategias de manejo de sus cultivos sino a aspectos tan básicos como su dieta [6].

Típicamente la tilapia roja (*Oreochromis sp*) de granja se alimenta con concentrados formulados, no obstante los materiales con los que estos se fabrican, el más importante siendo harina de pescado por su alto valor nutricional [7], suelen no estar disponibles o ser muy costosos y los pequeños productores muchas veces desconocen dietas alternativas más económicas y accesibles [8]; estas últimas incluyen otros subproductos animales, harinas de oleaginosas, subproductos de legumbres y cereales y plantas acuáticas, que usualmente carecen de algún aminoácido esencial y requiere la adición de suplementos [7].

Siguiendo esta idea, para maximizar el contenido nutricional del alimento usualmente se realizan mezclas de diferentes fuentes que suplan los nutrientes que uno alguno de ellos carece y se busca obtener beneficios extra que brinden bienestar al animal. Entre los múltiples complementos que se añaden los antibióticos son los más populares para promover el crecimiento y prevenir enfermedades en los cultivos. Sustancias como oxitetraciclina y enrofloxacina se emplean para combatir patógenos y representan un riesgo tanto para el pez como para su ecosistema [9], los cuales a futuro serían factores críticos en la calidad del producto dada la creciente ola de resistencia a los antibióticos que producen los microorganismos, el impacto ambiental que tendrían en las celdas de cultivo así como en cuerpos acuíferos y la bioacumulación de agentes nocivos que puedan afectar potencialmente la salud del consumidor de pescado. Es por ello que para reducir el uso de estos compuestos se ha estudiado la posibilidad de enriquecer probióticos en su dieta: según las investigaciones realizadas por Gutiérrez y colaboradores (2016), las cepas *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa* y *Lactobacillus delbrueckii* [10] así como otras bacterias LAC como *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* [11][12] han demostrado que tras consumirlas no sólo fortalecen el sistema inmune de la tilapia al combatir patógenos como *Aeromonas hydrophila* e incrementar la producción de óxido nítrico en rodaballos entre 40 a 60 g de peso (a una concentración de la suspensión de 10^6 células/ml [13]) sino que también presentan una mejora en la talla, consumo y la conversión alimentaria del pez [10]. Es así como estos beneficios son finalmente adquiridos gracias a que estos ayudan a digerir los alimentos, producir vitaminas y mantener la microbiota natural del organismo [14].

En adición a la implementación de probióticos a la dieta, se ha visto un incremento en el uso de sustancias prebióticas que complementan el efecto de estos microorganismos. Puntualmente, los prebióticos se definen como “sustancias químicas (generalmente carbohidratos) que permiten efectuar cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal” [15] “generando una selectividad que propicia el desarrollo de bacterias benéficas para el organismo” [14]. En el mercado existe una gran variedad de estos productos, también conocidos como fibras dietarias (a pesar de que no todas las fibras son consideradas prebióticas, ya que para serlo han de cumplir condiciones como (i) resistir la acidez estomacal, (ii) la hidrólisis enzimática mediada por proteínas de mamíferos, (iii) ser absorbido en el tracto gastrointestinal superior, (iv) ser un compuesto fermentable y (v) generar selectividad en la microbiota intestinal [15]), que poseen un conjunto de características fisicoquímicas específicas que las hace deseables para cumplir funciones puntuales en la manufactura de alimentos más allá de su beneficio nutricional y que permiten clasificarlas dependiendo de la necesidad como su solubilidad, fermentabilidad y viscosidad [15]. Compuestos como dextrinas, maltodextrinas, gomas y algunos almidones son los más conocidos, pero existen otros que han sido descubiertos recientemente como la inulina, cuyas propiedades siguen siendo estudiadas. Este último es un oligosacárido de fructano obtenido industrialmente desde las raíces de la achicoria [16], una planta herbácea originaria del Viejo Mundo; este carbohidrato fermentable se caracteriza por ser una fibra dietaria biodegradable, soluble y no viscosa que se utiliza para incrementar el valor nutricional de alimentos manufacturados [17] y entre sus facultades se ha encontrado que ayuda a reducir la severidad de enfermedades infecciosas [18], mejorar la absorción de calcio [15] y tiene un efecto bifidogénico a bajas concentraciones [19][20]. Frecuentemente encontrada en forma de polvo, la inulina también resalta como biopolímero y vehículo encapsulante de agentes activos en la industria farmacéutica, puesto que es bioquímicamente inerte, no tóxica y los enlaces $\beta(2-1)$ entre monómeros le confieren resistencia a un amplio rango de pH del tracto gastrointestinal y a la acción enzimática del sistema digestivo, reaccionando una vez dentro de la cavidad intestinal [21]. Así mismo, cuando este heteropolímero de fructosa se emplea como agente encapsulante se convierte en una matriz de gel firme (más aún cuando está entrecruzado con otros materiales, principalmente grupos vinílicos) y excelente protector gracias a que reemplaza el contenido de agua de las moléculas en su interior y previene su degradación [22].

Por otro lado, la microencapsulación es una tecnología que permite atrapar, proteger y transportar ingredientes sensibles [23] a una escala micrométrica. El método de generación de las microcápsulas puede variar con respecto a las necesidades del fabricante: entre ellas la preservación de características fisicoquímicas de los componentes activos y del recubrimiento, la finalidad que han de tener las microcápsulas, la eficiencia de encapsulación y el costo de manufactura a escala industrial. Entre las técnicas de microencapsulación existentes se encuentran principalmente el secado por aspersión, spray chilling o cooling, freeze drying, cobertura por extrusión, atrapamiento liposomal, liofilización, coacervación, entre otros [24]; sin embargo, un método novedoso que ha empezado a desarrollarse rápidamente en los últimos años se conoce como la síntesis por electrospinning o electro spraying, dependiendo si se trata de un flujo continuo de una estructura fibrosa o la generación de micro-/nanopartículas.

La técnica de electro spraying es un procedimiento robusto, versátil, relativamente simple y altamente reproducible que permite controlar la morfología de las cápsulas con gran eficiencia [25] sin recurrir a tratamientos térmicos que pudiesen afectar compuestos lábiles. El proceso consiste en la aplicación de un fuerte potencial eléctrico al líquido a polimerizar, el cual por efecto de campos magnéticos cercanos al inyector dirige las cargas eléctricas en la solución de encapsulación hacia la superficie del menisco a la salida de la boquilla, adquiriendo una forma cónica denominada el cono de Taylor como se observa en la Ilustración 1. Cuando la tensión superficial en este punto es superada emerge un delgado chorro que es acelerado por el campo magnético, reduciendo el exceso de carga en la punta del inyector y transformando el líquido saliente en pequeñas gotas que finalmente serán atraídas y almacenadas en el colector [26], el cual debe ser de un material conductor y estar conectado o próximo al cátodo así como tener un polo a tierra. De la misma forma, el ánodo debe ubicarse justo sobre la aguja de inyección para generar así el sistema cerrado mostrado (Figura 1).

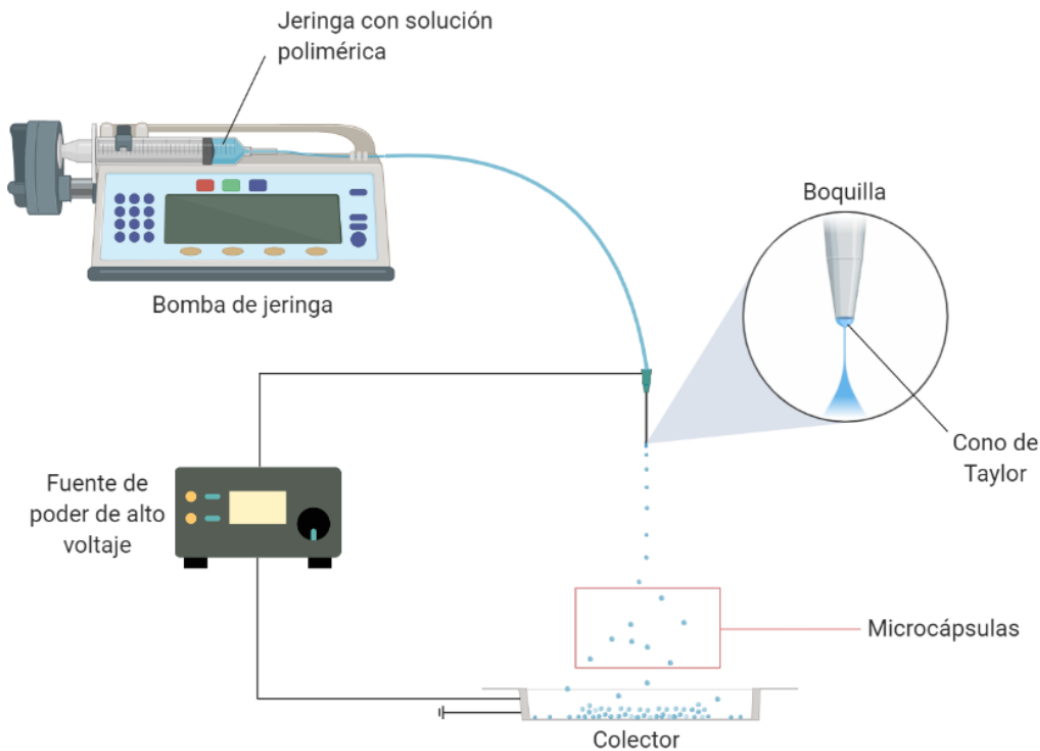


Figura 1. Esquema de las partes y funcionamiento del equipo de electro spraying

De acuerdo con los materiales empleados y del método para hacer la encapsulación, puede o no darse la polimerización antes o durante la colección de las partículas en el colector. En este proyecto en particular, se hizo una esferificación directa sencilla y ampliamente utilizada en cocina molecular que consta en la mezcla de alginato de sodio en solución con inulina, donde la matriz líquida tomará forma de cápsula al caer dentro de un baño de cloruro de calcio en el colector.

Desde hace tiempo se han estudiado las cualidades nutritivas de algunas levaduras —las cuales se encuentran frecuentemente en la industria alimentaria como vehículos para la producción de pan o alcoholes— dado su alto contenido proteico que incluye los 9 aminoácidos esenciales, carbohidratos y es una fuente significativa de vitaminas del complejo B [27], esenciales para el buen funcionamiento del organismo. González (2017) constató que fue posible sustituir en su totalidad la harina de pescado por proteína de levadura certificada (NuPro®) sin afectar la producción del estanque de tilapia. Es más, el autor sugiere que una dosis entre 5 y 10 gramos de levadura *Saccharomyces cerevisiae* por kilogramo de alimento estimulan la actividad fagocítica, la generación de mieloperoxidasa y la explosión respiratoria en peces Dorada [13].

En la industria cervecera, los grandes fabricantes emplean enormes cantidades de levadura que, a pesar de que es reutilizada por un número determinado de ciclos, su uso debe ser discontinuado ya que naturalmente las colonias alcanzan un punto de desgaste en el cual dejan de ser aptas para realizar la fermentación de esta bebida. Consecuentemente la levadura debe ser descartada, siendo el segundo residuo con mayor acumulación en las cervecerías y un problema de importancia dado el volumen de biomasa involucrado que se estima entre 1,5 a 3 kg de levadura por cada 100 litros de cerveza fabricada [28]. Actualmente el destino final de este coproducto es para la formulación de alimento para ganado en conjunto con mezclas de granos residuales del mismo proceso, lo cual resulta ser una alternativa económica pero mayormente limitada si se tiene en cuenta los numerosos beneficios y la versatilidad de la levadura de cerveza.

Por esta razón, para extender su vida útil y darle un mayor aprovechamiento a este coproducto, así como contribuir al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible —particularmente la Producción y Consumo Responsables de forma directa y Agua limpia y Saneamiento junto con Vida Submarina de forma indirecta— se plantea transformarlo en un alimento de alta calidad, soluble, de fácil digestión y a bajo costo que los pequeños piscicultores puedan utilizar para alimentar sus cultivos, sin perder propiedades nutricionales que la alimentación tradicional ofrece y con el valor agregado de incluir, en una presentación novedosa como las microcápsulas, probióticos y prebióticos que fortalezcan la salud de los peces mediante la estimulación natural de su sistema inmune; lo que disminuiría considerablemente la inversión en sustancias antibióticas y antiparasitarias para prevenir enfermedades y también minimizar el impacto sobre el ecosistema. Con esto mismo se desea que los pequeños piscicultores de tilapia roja puedan mejorar la calidad y productividad de sus cultivos, generando mayores ingresos y apoyando la creación de emprendimientos y oportunidades de trabajo así como también fomentar una economía circular que sea ambientalmente sostenible entre las cervecerías que producen la levadura como el destinatario final del alimento terminado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Obtención y manejo de la levadura

Se utilizó la levadura *Saccharomyces pastorianus*, la cual fue amablemente proporcionada por AB InBev Bavaria. La levadura fue recogida directamente del fondo del tanque de fermentación y sometida a una autólisis, para posteriormente recuperarla en un envase plástico cerrado, del cual se descartó gran parte del exceso de cerveza y se dejó únicamente el precipitado. Se tomó una cantidad total de 100 g levadura, la cual se separó en Falcon de 50 ml con alícuotas de 10 g cada una y se adicionó una cantidad de ADE en una relación de 4 ml por gramo de levadura (1:4) [29] hasta un volumen final de 40 ml cada uno. Los tubos se centrifugaron a 4500 rpm por 10 minutos a 4°C [30] para recuperar en frascos separados tanto el sobrenadante con el extracto de levadura como el precipitado, este último debido a que representa una mayor cantidad de biomasa. Ambos recipientes se mantuvieron bien cerrados en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Posteriormente, se manipularon simultáneamente el líquido y el sólido centrifugados por procedimientos separados: por un lado se pasó 1 litro de extracto líquido, previamente esterilizado, por el secador por aspersión (Buchi B-290 Mini Spray Dryer) a una temperatura entre 160-180°C y un flujo de aire de 50 mm para generar un polvo que fuese más manejable; por otro lado, se hizo una filtración con etanol que partió con el pesaje de varias porciones de 25 g de precipitado sólido, donde cada una se colocó paulatinamente sobre papel filtro posicionado sobre un sistema de filtrado al vacío por kitasato. Sobre el precipitado se adicionó lentamente etanol al 90% a un volumen similar al de la levadura sólida colocada y se inició el proceso de vacío, el cual succiona la mezcla permitiendo que la mayor parte del contenido de agua del precipitado de levadura sea retirada del

sólido por su unión con el etanol. Este paso se repitió múltiples veces hasta obtener una masa total cercana a los 100 g que seguidamente se distribuyó uniformemente en un recipiente de vidrio y se secó en un horno de convección forzada (Memmert) a 60°C por 3 horas. Como último paso se molió el precipitado sólido seco hasta obtener partículas de tamaño uniforme y se almacenaron en refrigeración en un frasco sellado hasta su utilización.

2.2 Evaluación de la sustancia aglutinante

Inicialmente se buscó añadir cada componente del producto (microcápsulas y aglutinante) al inicio del proceso antes de la conversión de levadura en alimento, por lo cual con el objetivo de seleccionar el mejor agente aglutinante y su concentración óptima para la formación de los pellets se realizaron pruebas con goma arábica (GA) y carboximetilcelulosa (CMC) a concentraciones de 0,1; 0,2; 0,5 y 1%, las cuales se encuentran dentro de los márgenes que aportan la consistencia deseada al alimento [31][32]. Se agregaron los sólidos de aglomerante directamente en el extracto líquido y se homogeneizó.

Con el fin de obtener la mayor cantidad de alimento puro posible se sometió la mezcla a procesos de concentración. Para evaluar el método más eficiente se utilizó el extracto líquido resultante de la centrifugación y se realizó por medio de dos equipos: un concentrador (Eppendorf Concentrator Plus) y el horno de vacío (Lab Companion 65 L OV-12). Debido a que el primer equipo solo permite tubos con un volumen máximo de 15 ml, se distribuyeron los tratamientos con volúmenes diferentes que se ilustran en la Figura 2.

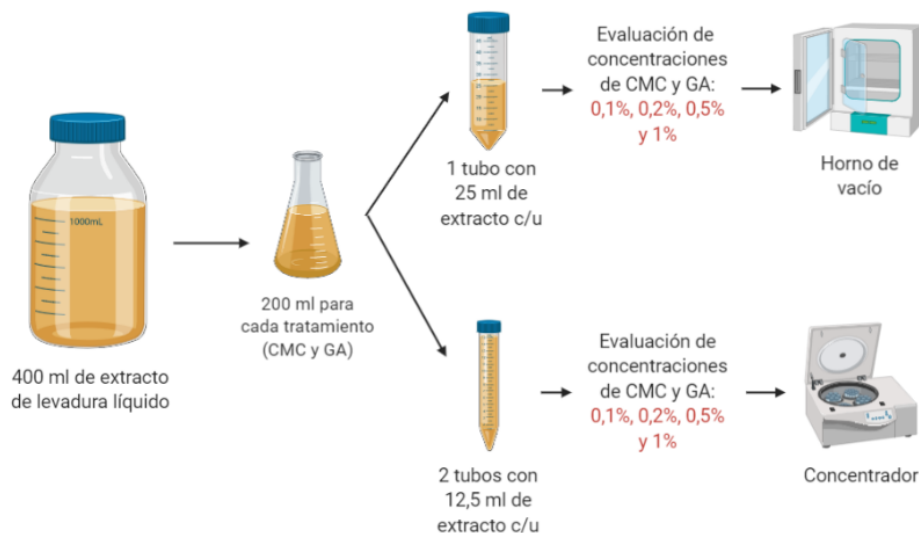


Figura 2. Esquema preliminar de los tratamientos de evaluación de aglomerante y equipo concentrador.

Cada concentración evaluada tiene una réplica como se observa en los tratamientos del concentrador, no obstante, por facilidad de manejo de material en el horno de vacío se juntaron ambos volúmenes de las réplicas en un mismo vaso de precipitado por cada concentración. Es decir, cada beaker contuvo la cantidad equivalente a dos réplicas por cada concentración de aglutinante evaluada. Todos los tratamientos fueron sometidos a una temperatura de 60°C en un rango de tiempo entre 30 minutos y 3 horas.

Paralelamente se hicieron soluciones de CMC y GA únicamente en 10 ml de ADE con las mismas concentraciones mencionadas de forma que se pudiera evaluar la consistencia y la fluidez de la sustancia tanto después de homogeneizarla como una semana después de someterla a condiciones de refrigeración.

2.3 Fabricación de las microcápsulas de probiótico

Para la matriz de encapsulación del probiótico se decidió implementar la polimerización con alginato de sodio y cloruro de calcio. Inicialmente se preparó una solución stock de 200 ml con ADE y PBS 1X estéril, en la que se agregó inulina para alcanzar una concentración de 8%, se homogenizó por agitación manual y la solución completa se esterilizó a 121°C por 15 minutos. Dado que tanto el alginato de sodio y el cloruro de calcio no son autoclavables, se pesó la cantidad necesaria de soluto para concentraciones de 2% y 1%, respectivamente, y se esterilizaron con rayos UV en cámara de flujo laminar por 20 minutos. Se añadió cada sustancia a 200 ml de ADE, donde la solución stock de alginato de sodio se homogeneizó utilizando una licuadora (Oster® Osterizer Classic Blender 3 velocidades) con recipiente de vidrio estéril, en la cual se licuó la solución de forma breve en la velocidad más baja hasta que se observó una única fase y se esperó a que bajaran las burbujas de aire.

En cuanto a las microcápsulas se realizaron dos preparaciones: una para generar un control sin la bacteria (MC) y otra que la incluyese (MB). El cultivo bacteriano utilizado fue un stock de cultivo iniciador de yogurt (Centro Agrolero CAL Group), compuesto de las especies *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *Bifidobacterium* sp. y que fue amablemente proporcionado por la clase de Microbiología de Alimentos del Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes.

Para ambas preparaciones se hizo una mezcla de 100 ml de solución de inulina con 100 ml de solución de alginato de sodio mediante agitación magnética, para una concentración final en las cápsulas de inulina al 4% y alginato de sodio al 1%. Para la preparación con probiótico primero se tomaron 0,5 g de cultivo iniciador y se agregaron lentamente a la solución de inulina con agitación magnética constante a 200 rpm hasta homogeneizar, posteriormente se adicionó a la mezcla la solución de alginato de sodio hasta obtener un solo líquido.

Para iniciar la encapsulación se vertió la solución polimérica en una jeringa estéril con capacidad de 20 ml (Becton Dickinson Discardit™ II), se conectó a un extremo de una manguera de venoclisis estéril (Baxter CLEARLINK 2C8610 Extension Set), el ducto se conectó a una bomba de inyección, la cual fue programada para brindar una dosificación de 10 ml/h. En la cámara del equipo de electrospinning (NANOFIB 1000-V2 QUIBITeXp International Trade) se colocó una bandeja colectora que se cubrió con papel aluminio de uso doméstico, procurando que el papel quedase adherido a la superficie de la bandeja de manera que no quedasen arrugas y evitar rupturas. Sobre la bandeja se vertieron aproximadamente 100 ml de solución de cloruro de calcio y la bandeja se colocó sobre un soporte que fue cubierto con papel absorbente para evitar que el contenido de la jeringa se disperse a zonas diferentes al colector. Finalmente, se conectó el otro extremo de la manguera al sistema de eyección con una aguja de apertura de 18 gauge (G) desinfectada y se arrancó el equipo una vez normalizado el flujo de salida de la aguja. La encapsulación se realizó generando un campo magnético con 7,8 kV de voltaje a unas condiciones promedio de humedad y temperatura ambientales de 77% y 22°C, respectivamente. Las microcápsulas producidas se filtraron por gravedad para remover la solución de cloruro de calcio y preservarlas en nevera a 4°C.

Para estudiar la morfología de las cápsulas obtenidas, se tomaron unas cuantas esferas para medir su tamaño a través de un microscopio óptico con regla y otro pequeño grupo de microcápsulas fue colocado en una placa de enfriamiento y sumergido en un baño de nitrógeno líquido para fragmentarlas y observar su contenido mediante microscopía de barrido de electrones (JEOL JSM-6490LV). Con las imágenes generadas por el microscopio se pudo estimar el diámetro de las microcápsulas utilizando la herramienta ImageJ®.

2.4 Producción de pellets

La pasta debe adquirir una forma fácil de digerir para las tilapias, pero lo suficientemente resistentes a la manipulación y a todo tipo de estrés mecánico. Por ello se procede a mezclar la levadura sólida con la solución de aglutinante a la concentración óptima encontrada y a pasarla a través de una extrusora de uso doméstico con orificios en forma circular de ~1 cm de diámetro, con la cual se extruyeron tiras largas que se apoyaron en una hoja de papel aluminio y luego fueron cortadas manualmente a una longitud de 1 cm. Seguidamente, con una aguja estéril se perforaron los pellets, sin atravesar la totalidad de la masa, de manera que se generara un pequeño agujero y con otra aguja estéril se tomó entre 4 y 10 microcápsulas que se colocaron en el agujero, tapándolo con una minúscula cantidad de la levadura circundante al orificio. La bandeja fue entonces llevada a un horno de convección forzada (Memmert), donde se quiso estudiar el efecto del tiempo de horneado y la temperatura del horno sobre la dureza de los pellet así como la viabilidad de las bacterias probióticas fijadas en

las microcápsulas. Así, el experimento se planteó manteniendo una temperatura constante de 60°C por un intervalo de tiempo entre 5 a 10 minutos, tomando en cuenta que los probióticos de yogurt son mesófilos y una temperatura superior llegaría a afectar la integridad de las células y sus componentes.

2.5 Evaluación de las propiedades físicas de los pellets de levadura

Luego del horneado del pellet se quiso conocer su textura y si existe un cambio significativo en ella tras el horneado, por lo cual se sometieron 5 muestras seleccionadas al azar y se sometieron al texturómetro (Stable Microsystems TA.HD plus C Texture Analyser) con una medida de referencia correspondiente a nutrición animal específicamente a alimento sólido para gatos, el cual por su consistencia es muy similar a la deseada en el alimento para peces. En el equipo se evaluó específicamente la dureza de los pellets.

2.6 Pruebas de viabilidad

Para determinar si las bacterias probióticas microencapsuladas se mantienen viables tras el horneado de los pellets y la digestión de estos por los peces, se realizaron pruebas de conteo y recuperación de microorganismos. En la primera parte se pesaron en eppendorfs dos muestras de 0,5 g de MB cada una, e individualmente 5 pellets seleccionados aleatoriamente por cada tiempo de horneado, para establecer un estimado de la concentración probiótica inicial de las microcápsulas y conocer el peso de los pellets. Posteriormente se tomó una de las muestras de microcápsulas y también un único pellet al azar de cada tratamiento térmico y se maceraron suavemente cada uno en un mortero estéril por separado con 1 ml de solución salina al 0,85%, que luego se sembraron por superficie en agar MRS y MRS a pH 2 sólidos. El pH de este último medio se ajustó agregando alícuotas de HCl al 37% y evaluando con tirillas medidoras para mantener la esterilidad y evitar la interferencia generada por el electrodo de un potenciómetro.

Las muestras de microcápsulas se manejaron de dos maneras distintas: para la muestra macerada se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-4} y se sembraron mediante la técnica de punto que consiste en añadir un volumen de 10 μ l por cada dilución, lo que permite tener réplicas y evaluar todas las diluciones utilizando una menor cantidad de cajas con medio de cultivo; que en esta ocasión se realizó por triplicado por cada dilución, todas en un mismo plato de Petri. A la muestra que no se maceró se le adicionó 1 ml de ADE y seguidamente se sometió el eppendorf a un baño de sonicación con una potencia de 220 W y un régimen de 1 minuto ON y 1 minuto OFF hasta completar 5 minutos en cada estado y que representa un ciclo. Se hicieron tres ciclos de sonicación para un total de 15 minutos a la frecuencia máxima del equipo, tomando una alícuota de 100 μ l entre cada ciclo y sembrando en masivo en los medios mencionados. Todas las cajas fueron incubadas a 30°C durante 24 a 48 horas.

En la segunda parte también se pesaron 5 pellets escogidos al azar, cada uno de estos se sometió a un tratamiento que consiste en la simulación *in vitro* de la digestión del alimento a través del sistema gastrointestinal. Para esta parte práctica se tomó como referencia las guías de evaluaciones alimentarias publicadas por Brodtkorb et al. [33] y Minekus et al. [34] las cuales se encuentran estandarizadas y son un consenso entre múltiples investigadores y entidades, pero que se enfocan en el tracto digestivo e intestinal humanos. De esta manera, se siguieron los parámetros establecidos por los autores a excepción parcialmente de las enzimas utilizadas en la simulación gástrica puesto que no se contaba con ellas en el laboratorio. En lugar de pepsina se utilizó α -amilasa y proteasa, mientras que para la simulación intestinal se mantuvo la pancreatina.

Inicialmente se hicieron dos soluciones stock de 250 ml con los electrolitos listados en Minekus [34], ajustando a pH 3 la correspondiente a la SE y a pH 7 la de SI. Luego se sirvieron 20 ml de cada uno en Falcon, se adicionaron las muestras (MC para el control sin bacteria, MB para las microcápsulas sin incluir la levadura y finalmente los pellets terminados) y se mantuvieron a baño maría a una temperatura estable de 30°C hasta la adición de las enzimas para cada tratamiento [33]. Seguidamente se separaron los tratamientos entre digestión estática y digestión por agitación, por lo cual un grupo se metió a una incubadora a 30°C por 2 horas y otro grupo a una incubadora shaker a las mismas condiciones con una agitación de 100 rpm. Una vez finalizado el tiempo de digestión inmediatamente se hicieron diluciones, siembra e incubación de la misma manera que se hizo con las MB maceradas, como se recomienda en el artículo [33] para estudiar la supervivencia de probióticos.

Tras el período de crecimiento se procedió a hacer los recuentos bacterianos de todas las siembras.

2.7 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza ANOVA Three-Way con una significancia de $\alpha = 0,05$ que permitiera comparar los recuentos microbianos obtenidos según el tiempo de horneado y las condiciones de la digestión en cuanto las condiciones químicas del medio de digestión y la agitación durante la simulación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Manejo de la levadura y pelletizado

Lograr la consistencia deseada para la levadura representó uno de los mayores retos durante el desarrollo de este estudio. Esto se debe a que tanto el extracto líquido como el precipitado sólido producto de la centrifugación es rico en componentes nutritivos, algunos en particular con mayor concentración en una fase o en la otra como por ejemplo el β -glucano que se encuentra casi en su totalidad en la membrana de la levadura, el cual posee grandes efectos terapéuticos [30] pero que al ser centrifugado se precipita, por lo que si esta fase es descartada entonces se está perdiendo un potencial beneficio para la salud de la tilapia. Así, en cuanto a la distribución del contenido nutricional y además la versatilidad de cada fase fue difícil escoger qué presentación resultaba más favorable.

Sin embargo, durante el transcurso de la experimentación las condiciones terminaron favoreciendo el uso del sólido precipitado tras la centrifugación puesto que la manipulación de la fase líquida fue ineficiente, costosa y de bajo rendimiento de producto: a pesar de que la baja cantidad de polvo de extracto de levadura pudiera deberse a la proporción de agua contenida en el mismo, no importó que en los múltiples intentos se redujera el contenido de agua —a tal punto que el extracto comenzaba a adquirir una apariencia oleosa más viscosa— ya que en todos los equipos de concentración empleados hubo poco o nada de producto final. En el caso del horno de vacío ocurrió una disminución en el volumen de líquido que, aunque demuestra que se está reduciendo el contenido de agua en el extracto, este mismo se está perdiendo en forma de vapor y que es más complejo de recuperar. Una situación similar se observó en el concentrador, más no se dio una solidificación del líquido como se esperaba sino que se precipitó una masa blanca que se desconoce si es levadura o agente aglutinante, ya que en el momento se añadió al extracto para evaluarlo.

En cuanto al secado por aspersión el panorama no fue mejor debido a que aunque siempre se empleó una cantidad de extracto de 1 litro, se obtuvieron conversiones a polvo entre 2 a 6 g que son cantidades insuficientes a comparación de la proporción alimentada al equipo. Es más, durante el proceso de secado se vislumbraron varias irregularidades: una fluctuación muy alta de las temperaturas de secado puesto que se establecía una temperatura puntual de trabajo de 160°C y al monitorear el equipo con detenimiento se observaron caídas hasta los 120°C , donde es necesario apagar la bomba peristáltica del equipo para prevenir la condensación del fluido asperjado. Esto último fue una situación frecuente desde el inicio al final del uso del equipo, lo que estaría potencialmente afectando la cantidad final de polvo producido. Ahora, otro factor importante que estaría incidiendo en el polvo total recuperado es que por la geometría y el comportamiento irregular del equipo durante su funcionamiento gran parte del material secado queda atrapado en las paredes de las múltiples cavidades del secador, muchas veces en lugares que no es posible alcanzar de forma manual o con alguna herramienta y que se pierde tras el lavado de las piezas.

Así pues, entre los tres métodos se consumieron grandes cantidades de tiempo (3 horas o más) en bajas conversiones y además un uso excesivo de energía para mantener la temperatura en largos períodos de tiempo.

El precipitado por su parte fue más sencillo de manejar y se logró obtener una cantidad de sólido suficientemente grande para trabajar y ser considerada como un peso mínimo para comercializar. Adicionalmente, el secado que se le dio a la masa de levadura requirió un menor tiempo en el horno, lo que implica un menor gasto energético; de la misma manera, este tratamiento con calor se dispersó de forma uniforme sobre la levadura en el recipiente, procurando evaporar el exceso de etanol de todas las capas del mismo. En este aspecto la única desventaja es la necesidad de incluir más pasos para la obtención del sólido y no métodos más directos como los que se pretendía con la manipulación del extracto líquido.

Por otro lado, resulta importante mencionar que aunque en la metodología se propuso realizar un pelletizado por extrusión no se logró dar forma a los pellets debido a dos razones: la primera, que al combinar la levadura con la solución aglomerante la mezcla resultó muy líquida por lo cual al pasarla por el disco de extrusión no se

formaron tiras pastosas sino que en su lugar se observaron goteos y pequeñas formaciones ovaladas con una alta cantidad de humedad que se desintegraban fácilmente. Es probable que este resultado se diera por un exceso de solución aglomerante adicionada a la masa de levadura o que esta solución no se fabricó y homogeneizó de manera que no estuviera muy diluida, pero se repitió manejando un volumen de ADE menor. La segunda razón se debe a que al verter la mezcla de levadura en la extrusora la mayor parte del producto se adhirió y acumuló sobre la superficie interna de la cavidad del tornillo, lo cual contribuye a la baja producción de tiras pues esto disminuye la presión que el mismo alimento genera dentro del tubo del tornillo; es más, este también resulta verse afectado dado que la obstrucción causada por el material acumulado impide el giro del mismo. Debido a esto se decidió dar forma a los pellets manualmente con las mismas proporciones previamente establecidas en la pelletización por extrusión, cuyo resultado son pellets de color marrón cuya profundidad de color es mayor a medida que permanece más tiempo en el horno (Figura 3).

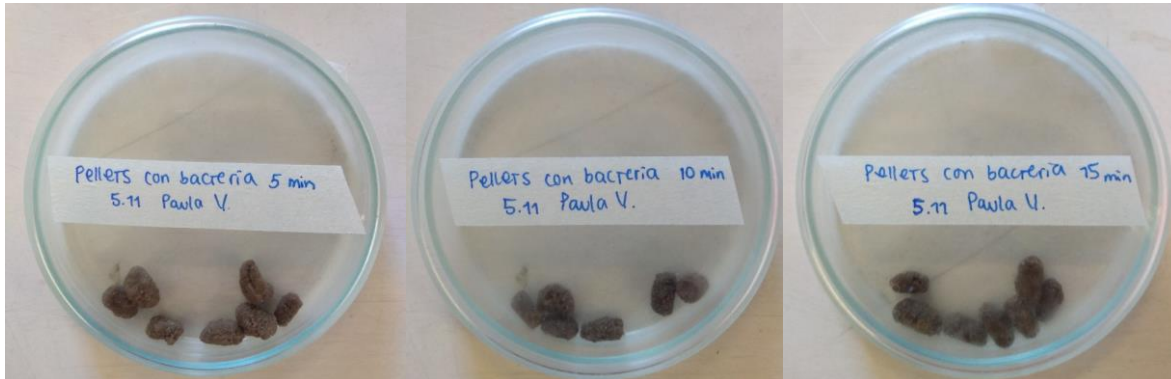


Figura 3. Alimento en pellets terminado, organizado por el tratamiento con menor tiempo de horneado al mayor de izquierda a derecha.

Evaluación de la sustancia aglutinante

Con respecto a la sustancia aglutinante no se observaron resultados satisfactorios al añadir el aglomerante directamente al extracto de levadura, pues no cambió su consistencia e inclusive se pudo haber precipitado durante los tratamientos de concentración. Caso contrario ocurre con las pruebas en las que se diluyeron en ADE debido a que la apariencia del líquido, su consistencia y viscosidad fueron rápidamente distinguibles: primero, la homogeneización tanto el polvo de CMC como de GA permitió establecer concentraciones de saturación de los aglomerantes en los cuales en las más bajas, como concentraciones de 0,1% y 0,2%, se formó un gel fluido mientras que en las más altas (0,5% y 1%) se vislumbró el mismo gel pero con gránulos grandes de polvo de aglutinante acumulado. Esto último se alcanzó a observar en pequeña medida en la concentración de 0,2%, por lo cual finalmente se decidió que una proporción de 0,1% de aglomerante sólido en el alimento era más que suficiente. Ahora, al someter las mezclas bien homogeneizadas (las que contenían gránulos conservaron algunos de estos puesto que no se desintegraron aún al agitarlo con agitador mecánico) a refrigeración durante una semana se observó que el CMC mantuvo su consistencia de gel líquido mientras que las mezclas de GA se polimerizaron formando sólido rígido que no podría ser maleable hasta calentarlo. Debido entonces a la estabilidad en la estructura de la solución de CMC bajo varias temperaturas se decidió como el aditivo indicado para la formulación del alimento.

Evaluación de las propiedades físicas de los pellets

La propiedad física más importante que se quiso evaluar para el alimento fue la dureza de los pellets posterior al horneado. Solo se tomó en cuenta esta característica puesto que una gran cantidad de peces engullen su comida entera, por lo cual al ser esta comúnmente arrojada a las celdas las partículas deben ser lo suficientemente firmes para no deshacerse apenas entren en contacto con el agua y estar disponibles para su consumo. Esta firmeza también es importante en cuanto al transporte y almacenamiento del alimento, ya que este debe ser resistente para que las microcápsulas no se salgan ni que el pellet se fragmente.

Medición de propiedades físicas vs tiempo de horneado (60°C)

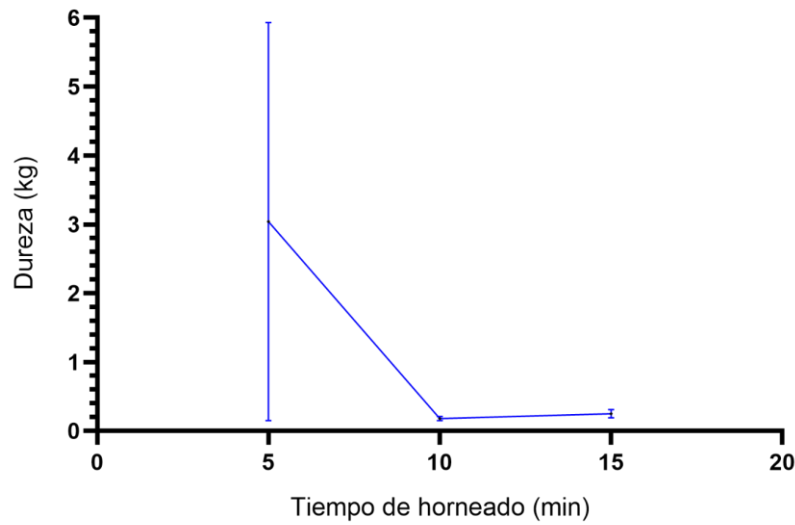


Figura 4. Dureza de los pellets según tiempo de horneado. El eje Y representa los kilogramos fuerza necesarios para penetrar el pellet.

En la medición de dureza (Figura 4) se evidencia una diferencia importante entre la fuerza necesaria para atravesar el pellet dependiendo de su tiempo de horneado, variación que se explica por la adhesividad de la levadura al interior del pellet: es decir, cuando el equipo ejerce presión sobre el alimento la sonda atraviesa el mismo tomando la medida de cuanto fuerza se requirió para perforarlo. En el caso de los pellets horneados durante 5 minutos el interior de estos aún se mantenía lo suficientemente viscoso para pegarse a la sonda durante la medida, lo cual el equipo interpretó como un incremento en la fuerza cortante reportando así un falso positivo. Esta adhesión explica también la considerable desviación entre los valores de dureza de los pellets pues a algunos la sonda alcanzó a atravesarlos por completo y a otros no.

La dureza de los pellets horneados a 10 y 15 minutos mostró el patrón esperado ya que al estar expuestos por mayor tiempo en el horno se dio una mayor transferencia de calor al interior del pellet, lo que contribuyó a incrementar su rigidez a una mayor profundidad. De esta manera la dureza del alimento horneado por 15 minutos es superior al horneado por 10 minutos, ambas medias cercanas entre sí y con una diferencia entre muestras baja como se puede ver por la desviación estándar en la gráfica.

Microcápsulas de probiótico

A simple vista las microcápsulas de probiótico tienen apariencia ligeramente opaca y húmeda, que tienden a unirse unas con otras formando aglomerados de estas de manera similar al caviar. En la Figura 5 se pueden apreciar las microcápsulas terminadas con algunas gotas en las paredes del tubo producto de la condensación del agua ambiental tras la refrigeración, siendo este hecho un factor importante en la preservación de las microcápsulas en seco dado que al haber humedad es posible que el producto se contamine, puesto que la matriz de encapsulación está compuesta de carbohidrato y esto es un sustrato perfecto para el crecimiento de hongos filamentosos como en una de las muestras se observó a pesar de que el recipiente siempre se mantuvo en refrigeración a 4°C. En otro de los lotes producidos se mantuvo una parte de la solución de cloruro de calcio y en otro se lavaron las microcápsulas con PBS, lo cual ayudó en evitar parcialmente el crecimiento de otros microorganismos sobre las microesferas gracias al efecto de las sales en el líquido más incurrió en una inquietud??? mayor pues si las microcápsulas se mantienen por un tiempo muy prolongado sumergidas por acción del equilibrio osmótico es posible que las bacterias al interior de estas se salgan a través de los poros de la matriz de encapsulación. Por esto último se prefirió filtrar el exceso de cloruro de calcio antes de almacenar las microcápsulas y se procuró ubicar los tubos con las muestras en zonas de la nevera donde la condensación

fuera baja y en posiciones tal que en caso de que se condensara el agua esta no tuviese contacto con las microcápsulas.

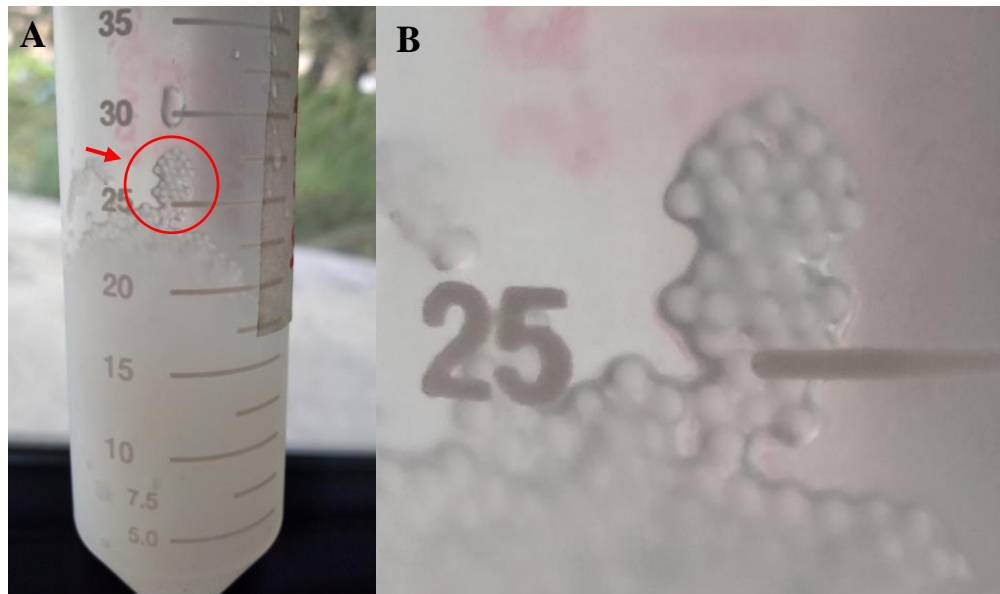


Figura 5. Fotografía de las microcápsulas con bacteria terminadas. A. Microcápsulas almacenadas en un tubo estéril, unas señaladas en rojo pues todo el fondo del tubo está lleno de ellas a pesar de que al estar así acumuladas no se distinguen individualmente. B. Acercamiento a las microcápsulas señaladas en la imagen al costado izquierdo.

Seguidamente se realizó la observación en el microscopio de barrido electrónico donde se pudo obtener imágenes tanto al exterior como al interior de las microcápsulas como se ilustra en figuras posteriores. Con las esferas tomadas en la Figura 6A se calculó el diámetro promedio de las microcápsulas con base en la escala de la imagen, lo cual arrojó un diámetro de $905 \mu\text{m} \pm 79$; también se midió el diámetro de la Figura 6B que dio $849,416 \mu\text{m} \pm 42,23 \mu\text{m}$ lo que finalmente da un diámetro resultante aproximado de 1 mm para todas las microcápsulas. Estas mediciones fueron corroboradas con las medidas estimadas de las microcápsulas bajo el microscopio óptico (Figura 7) que fueron cercanas a los 0,8 mm.

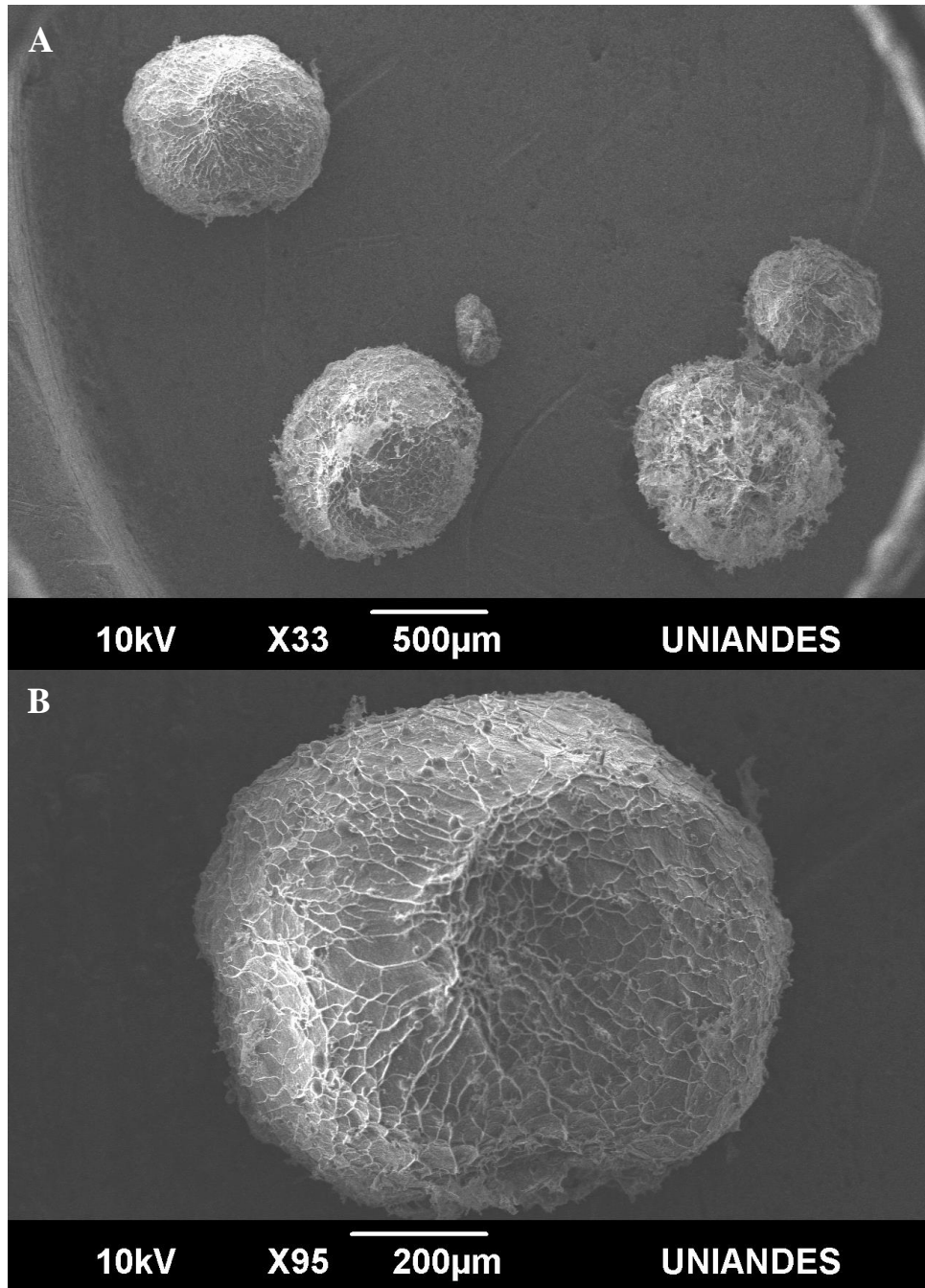


Figura 6. Imágenes de las microcápsulas con bacteria obtenidas con el microscopio de barrido electrónico. A. Se observan varias microcápsulas juntas con tamaños ligeramente variables entre ellas. B. Imagen individual de una sola microcápsula donde se aprecia mejor la estructura fibrosa e irregular de la matriz de encapsulación.

Es importante resaltar en la Figura 6B que la textura fibrosa de la microcápsula debe originarse del efecto del campo magnético empleado para hacer la encapsulación. Zhang et al. [5] resalta el importante rol de la morfología de las cápsulas en procesos de electrospraying aplicados al transporte de fármacos, pues la irregularidad de la superficie del biomaterial promueve las interacciones con las células aledañas lo cual representa una ventaja inesperada tanto para la adherencia de las bacterias a la matriz como a su interacción con las células del organismo del animal una vez ingerido el alimento y su posterior degradación.

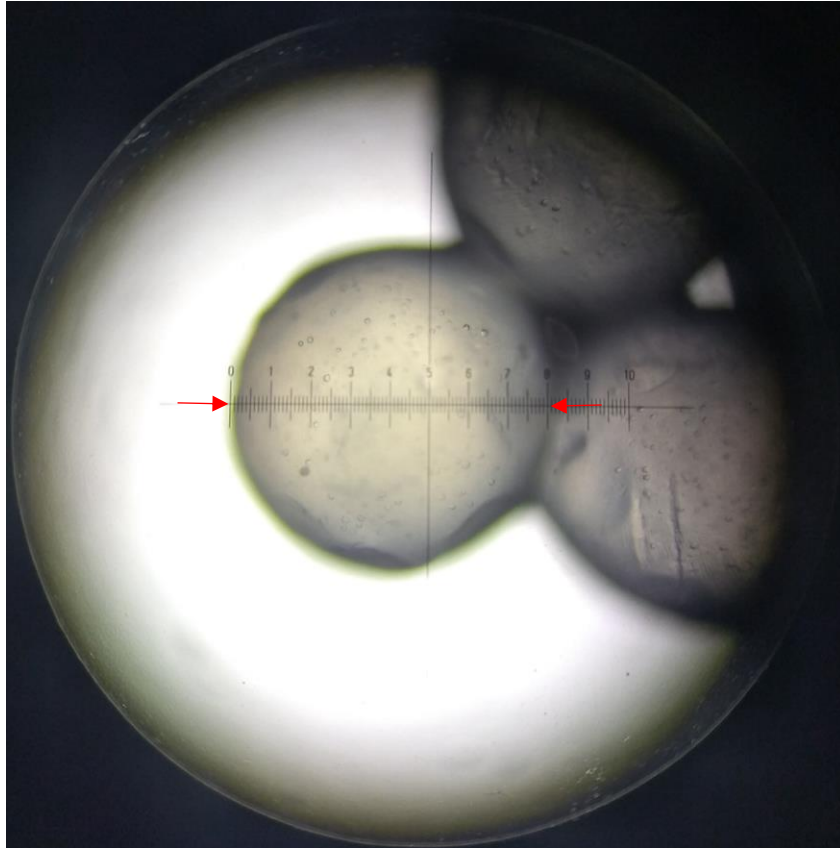


Figura 7. Imagen de las microcápsulas en el microscopio óptico con un aumento de 10X. Las flechas rojas indican el inicio el final de la porción de la escala que equivale al diámetro de la esfera.

Al realizar un acercamiento a a la superficie de las cápsulas, se observaron protuberancias cubiertas en la pared de las cápsulas, lo que probablemente corresponde a bacterias que quedaron fijadas entre la matriz (Figura 8A) y que por su forma puede deducirse que se pueden tratar de cocos. Estas morfologías también se observaron al interior de la microcápsula (Figura 8B), no obstante aunque se hicieron múltiples acercamientos a estas, no se revelaron más detalles morfológicos ni otras morfologías que correspondiesen a las otras dos cepas bacterianas incluidas en el cóctel inicial. A pesar de no verlo —dependiendo de la perspectiva del observador los cocos pueden verse más elongados, lo que puede confundirse con una morfología de bacilos—, hay certeza de que al menos la bacteria *L. delbruecki* spp. *bulgaricus* debe estar presente en las microcápsulas pues esta especie bacteriana es simbiote de *S. thermophilus* [36] que sí se observa en las imágenes.

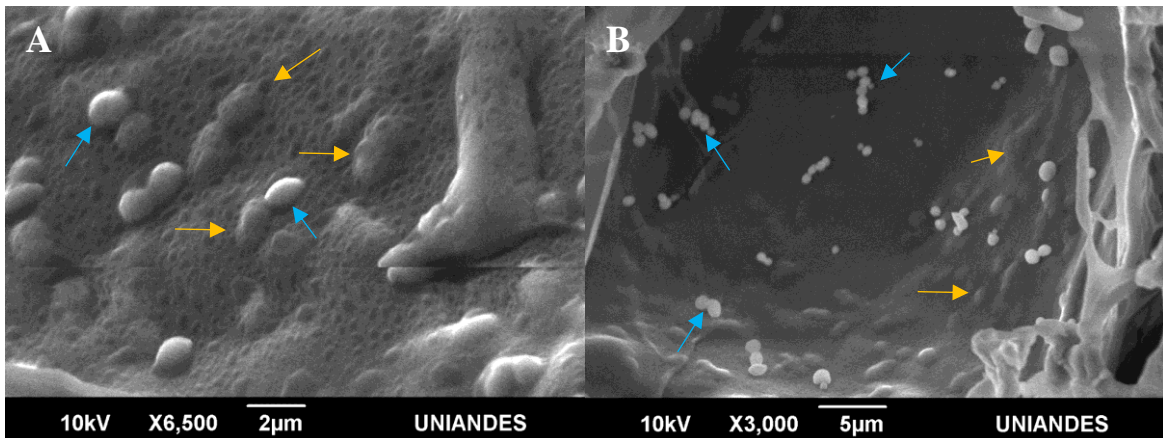


Figura 8. Imagen microscópica de las MB al exterior (A) y al interior (B) de la microcápsula. Las protuberancias señaladas (amarillo) y las masas de tonalidad blanca a gris clara con forma ovalada (azul) corresponden a bacterias atrapadas bajo el material de encapsulación y adheridas a la superficie de la matriz respectivamente.

Viabilidad

Por último, se evaluó la viabilidad de los probióticos tanto en un ambiente controlado de laboratorio como bajo el estrés impuesto del tracto gastrointestinal sobre el alimento. Los recuentos bacterianos por sí solos demuestran ser altos en un orden de 10^4 UFC por cada gramo de cápsula, siendo esta población aparentemente muy superior en la solución de hilado (Tabla 1) que al plaquar fue imposible de contar por el número de colonias observadas; en este caso hubiese sido pertinente realizar el plaqueo de múltiples réplicas para obtener un estimado más robusto, pues no es posible deducir la población bacteriana inicial por espectrofotometría ya que la solución de hilado en sí es viscosa y turbia, lo que afectaría el resultado por el paso de la luz a través de la celda y la densidad de microorganismos sería dudosa.

Así mismo, una de las preguntas que surgió durante la encapsulación de las LAC fue qué tanto del uso de los campos magnéticos y las corrientes eléctricas del equipo afectaron la supervivencia y viabilidad de las bacterias que pasaban por él. Según Grumezescu (2016) [24] se ha reportado que el proceso de encapsulación por electrospaying no afecta la viabilidad de células vivas, que el mismo autor en su libro ha reportado de forma recopilatoria desde otros artículos e investigaciones científicas encapsulando bacterias vivas de *Bifidobacterium* y fijación de células de distintas variedades de *Saccharomyces*.

Tabla 1. Recuentos bacterianos antes y después de la encapsulación por electrospaying. Estos datos permiten dilucidar la población bacteriana inicial y qué tanto las cápsulas pueden alojar en su interior, así como el efecto de la ruptura mecánica de las mismas.

Muestra		UFC/g
Solución de hilado (1 g)		Incontable
Concentración inicial (0,5 g MB)		$3,13 \cdot 10^4$
Sonicación	Primer ciclo	$6,23 \cdot 10^4$
	Segundo ciclo	$4,53 \cdot 10^4$
	Tercer ciclo	$3,98 \cdot 10^4$
Macerado	Pellet horneado 5 min	$2,11 \cdot 10^4$
	Pellet horneado 10 min	$3,17 \cdot 10^3$
	Pellet horneado 15 min	$1,25 \cdot 10^4$

Por otro lado, no sólo se quiso estimar qué tantas bacterias serían viables dentro de la muestra de 0,5 g de microcápsulas sino que también se deseó evaluar la capacidad (en cuanto a número de células) de contención de las microesferas en esta muestra, por lo que se sometieron impulsos de ultrasonido para obligar a las células a salir de la matriz. En este aspecto se observó una disminución en la cantidad de UFC con respecto al incremento de los ciclos de sonicación cercano al 64%, lo que evidencia que a pesar del estímulo sigue habiendo una población numerosa de bacterias en su interior; la reducción en los recuentos tiene que deberse al mismo proceso de sonificado pues este también se utiliza como un método para generar ruptura celular, por lo que no es de sorprender que así como las células se desprenden de las paredes de la cápsula también están viendo afectada su integridad y posterior supervivencia.

En cuanto al macerado, hay una disminución en la cantidad de UFC/g, más es incierto por qué el pellet horneado por 10 minutos tiene un menor crecimiento de hasta un orden de magnitud por debajo del pellet horneado por 15 minutos (Tabla 1), donde se esperaba un menor crecimiento debido a que el tratamiento térmico por tiempo extendido prometía afectar a viabilidad. Este último dato sí sigue el patrón esperado con respecto al pellet horneado por 5 minutos, ya que este estuvo menos tiempo en el horno. Ahora, una hipótesis que posiblemente explicaría esta disminución podría ser la cantidad de microcápsulas incorporadas a cada uno: estimando que aproximadamente hay 10^4 bacterias por unidad de microcápsula, el añadir 4 o 10 hace una gran diferencia en la población final a recuperar dado que 10 microcápsulas en un pellet frente a 4 microcápsulas en otro incurrir en un incremento bacteriano de al menos un orden de magnitud, elevando sus posibilidades de supervivencia. En este caso, se procuró que la mayoría de los pellets incluyeran la cantidad mínima de

microcápsulas mencionada en la metodología, por lo cual este patrón no sería una constante entre los tratamientos.

Finalmente se quiso comparar los recuentos de control con los recuentos tras un procesamiento natural por digestión del alimento, para lo cual se hizo el análisis de varianza (ANOVA). Este permitió discriminar cuáles variables del proceso de fabricación de pellets y simulación de digestión jugaron papel significativo en la viabilidad de las células bacterianas. De acuerdo con los resultados estadísticos, el tiempo de horneado no representa un factor importante que incida sobre la supervivencia de las LAC por lo que la metodología de fabricación del alimento asegura la viabilidad de los microorganismos hasta su consumo. Así, la mayor variabilidad en el crecimiento se da en la etapa de procesamiento del alimento por parte del animal, que en esta ocasión son los escenarios de simulación del ambiente estomacal e intestinal, así como si ésta se efectuó en movimiento o no (Figura 9).

Es relevante establecer las similitudes y diferencias del tracto gastrointestinal humano y el de la tilapia, ya que para el desarrollo de estas pruebas se emplearon protocolos basados en el primero. De acuerdo con la FAO las condiciones de acidez del estómago se encuentran entre 1.4 cuando está lleno hasta 5.5 a la salida del estómago y de pH 8 cerca al recto [37], por lo cual los niveles de acidez establecidos por los autores de los protocolos utilizados en este estudio están dentro del rango; Santos et al (2016) observó que el tracto gastrointestinal de la tilapia se compone principalmente de tripsinas, chemotripsinas, aminopeptidasas, amilasas y lipasas. Si se compara con las enzimas empleadas en esta investigación se muestra que a grandes rasgos la mayoría están incluidas en esta lista, sin embargo el autor del artículo comenta que el contenido enzimático del sistema digestivo de la tilapia es muy diverso, pues al ser omnívoros la composición específica de las enzimas puede variar con respecto al tipo de alimento que consuma el animal en el momento [38].

Viabilidad tras digestión enzimática estática y por agitación (100 rpm)

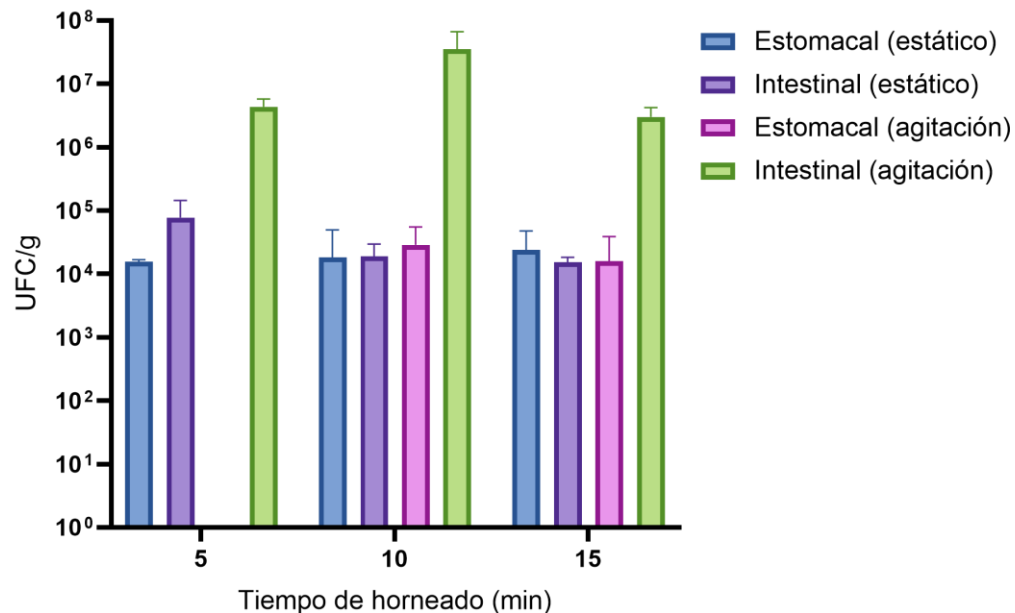


Figura 9. Viabilidad de las bacterias ácido lácticas en los pellets de alimento según el ambiente de degradación enzimática y las condiciones de agitación de la simulación de digestión. Para facilitar la interpretación de la gráfica la cantidad de UFC/g se mostró en términos de órdenes de magnitud que en valores puntuales.

Sin tomar en cuenta la ausencia de crecimiento de bacterias en la digestión estomacal del pellet horneado por 5 minutos cuya inviabilidad solo se puede atribuir a una posible ausencia o total devastación del inóculo por el ataque enzimático, los tratamientos por agitación hicieron más efectivo el procesamiento del alimento en el tracto gastrointestinal: no solo es esta condición más cercana a la realidad en tanto que los peces generalmente no permanecen estáticos bajo el agua sino que la agitación estimula la acción de degradación del alimento y la

expande por todo el volumen de solución, a comparación de la simulación estática donde las enzimas pueden agruparse en un punto particular y ejercer su función en menor medida.

Ahora bien, las condiciones ambientales en los órganos de procesamiento de los alimentos son abismalmente distintas pero necesarias entre sí. Las bacterias LAC tienen la capacidad de soportar las condiciones ácidas del estómago aunque muchas no tengan una cápsula bacteriana que las proteja, permitiéndoles así llegar al intestino para iniciar procesos fermentativos. Inicialmente se pensó que uno de los factores ambientales más importantes en la digestión sería el pH bajo del líquido estomacal, previendo un crecimiento muy inferior de las bacterias sometidas a estas condiciones en ambos tratamientos de agitación; no obstante, al comparar todos los pellets no se ve una disminución significativa de la población bacteriana entre ellos. Ahora, en cierta medida el pH del entorno sí tiene un impacto sobre la viabilidad pues en todos los pellets se obtuvo una alta recuperación de microorganismos en los tratamientos intestinales, pues en cuanto a acidez representa una condición menos abrasiva.

No obstante, tanto la carga enzimática como el tipo de enzimas en cada órgano si es una variable considerable en este aspecto, pues la pancreatina contiene amilasas, proteasas y lipasas [39] que se deben encargar de destruir por completo el alimento para liberar al organismo los nutrientes que este contiene. A comparación de las enzimas incorporadas al tratamiento estomacal, en las cuales hizo falta agregar lipasas dado que son precursoras de las lipasas pancreáticas, la pancreatina es más agresiva por lo cual se había de esperar una mayor liberación de las bacterias así como la posible destrucción de las mismas células. Entonces, según los recuentos (Figura 9) se podría deducir que las enzimas en el tratamiento intestinal fueron lo suficientemente efectivas para degradar los pellets y liberar las bacterias más no tanto como para destruirlas. Aquí entra en juego también la masa de levadura que compone la mayor parte de la biomasa del alimento, pues esta actúa como una barrera para proteger las microcápsulas de la degradación enzimática o hacerla más lenta.

Para finalizar, los resultados de viabilidad obtenidos pueden dar un indicio del efecto prebiótico que obtendrán las tilapias al consumir el alimento. Si se considera globalmente la proporción de microcápsulas por unidad de alimento es altamente posible que este proporcione los beneficios probióticos esperados, ya que aunque no se ha obtenido suficiente información acerca de la concentración mínima efectiva para obtener el efecto una cantidad de 10^6 UFC/ml o gramo y un título total entre 10^8 y 10^9 microorganismos probióticos son la medida mínima de consumo diario para que el efecto sea evidente en el organismo que lo ingiere [40]. Contando con que en cada pellet hay aproximadamente 4×10^4 UFC/g LAC, una ingesta de al menos 25 unidades con un peso promedio de 0,5 g alcanzará el mínimo necesario; si se consideran otros factores como la biomasa deseada para el pez previo al consumo las cantidades de alimento y consecuentemente de probiótico aumentarán.

Entre otras consideraciones, sería interesante en el futuro realizar simulaciones de digestión haciendo una transferencia del producto procesado en el líquido estomacal artificial al líquido intestinal simulado dado que (i) sería un modelo más cercano a la realidad y (ii) permitiría estimar la supervivencia de las bacterias durante su paso por el tracto gastrointestinal de acuerdo con las condiciones ya discutidas. Así mismo, sería ideal evaluar la calidad y el efecto del producto en individuos sanos de tilapia de cultivo, que se pueden determinar mediante parámetros zootécnicos y realizar las mejoras nutricionales necesarias. Aunque no se discutió, es necesario también estudiar más a fondo el contenido nutricional del alimento terminado para conocer si se cumplen los requerimientos, la palatabilidad del alimento para saber si su consumo sería del agrado de las tilapias y la flotación y desintegración del alimento en el agua para conocer si la forma en que se fabricó es apropiada para seguir los patrones de consumo de los animales.

4. CONCLUSIONES

La levadura en conjunto con aditivos prebióticos y probióticos muestra ser un excelente prospecto como alternativa alimenticia para las tilapias de la especie *Oreochromis*. De acuerdo al protocolo de manufactura desarrollado y pruebas de digestión del mismo es posible ver que el alimento proporciona una ventaja nutricional y a la salud de los animales sino que el proceso de producción es altamente escalable, poco contaminante y es posible ejecutarlo a bajo costo considerando el poco equipamiento requerido para hacerlo y la posibilidad de obtener grandes cantidades de materia prima para producirlo en las grandes cervecerías como de producto para su adquisición por los piscicultores aunque el fin último de esta investigación no sea

inicialmente la comercialización del producto sino una ayuda para que pequeños cultivadores puedan surgir mejorando su economía en sintonía con la conservación ambiental.

5. REFERENCIAS

[1] "La pesca", *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 2019. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/fisheries/es/>. [Fecha de acceso: Septiembre 25, 2019].

[2] Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca - AUNAP, "Sector pesquero apunta a US\$6000 millones en exportaciones al 2029", 2019.

[3] M. Merino, "Acuicultura en Colombia", Dirección Técnica de Administración y Fomento, AUTORIDAD NACIONAL DE ACUICULTURA Y PESCA - AUNAP, 2018.

[4] "Inversión en el Sector Acuícola en Colombia", Procolombia - Portal Oficial de Inversión en Colombia. [En línea]. Disponible en: <https://www.inviertaencolombia.com.co/sectores/agroindustria/acuicola.html>. [Fecha de acceso: Septiembre 25, 2019].

[5] Cifras detrás del negocio del pescado. 2019.

[6] "Insumos y Factores Asociados a la Producción Agropecuaria – Boletín mensual" Sistema de Información de Precios y Abastecimiento del Sector Agropecuario (SIPSA), Num. 21. 2014

[7] "FAO: Formulación y preparación/producción de alimentos", Sistema de Información sobre Alimentos y Recursos Fertilizantes para la Acuicultura. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/affris/perfiles-de-las-especies/nile-tilapia/formulacion-y-preparacion-produccion-de-alimentos/es/>. [Fecha de acceso: Septiembre 25, 2019].

[8] Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca, "Plan Nacional para el Desarrollo de la Acuicultura Sostenible en Colombia - PlaNDAS", Bogotá D.C., 2014.

[9] A. Rico et al., "Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand", *Environmental Pollution*, vol. 191, pp. 8-16, 2014. Disponible: 10.1016/j.envpol.2014.04.002 [Fecha de acceso: Diciembre 20, 2019].

[10] L. Gutiérrez Ramirez, C. David Ruales, O. Montoya Campuzano and E. Betancur González, "Efecto de la inclusión en la dieta de probióticos microencapsulados sobre algunos parámetros zootécnicos en alevinos de tilapia roja (*Oreochromis sp.*)", *Revista de Salud Animal*, vol. 38, no. 2, 2016. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2016000200007. [Fecha de acceso: Diciembre 20, 2019]

[11] M. Ayyat, H. Labib and H. Mahmoud, "A Probiotic Cocktail as a Growth Promoter in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)", *Journal of Applied Aquaculture*, vol. 26, no. 3, pp. 208-215, 2014. Disponible en: 10.1080/10454438.2014.934164 [Fecha de acceso: Diciembre 20, 2019].

[12] Y. Wang, Z. Tian, J. Yao and W. Li, "Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response", *Aquaculture*, vol. 277, no. 3-4, pp. 203-207, 2008. Disponible en: 10.1016/j.aquaculture.2008.03.007 [Fecha de acceso: Diciembre 20, 2019].

[13] U. González Arguinzones, *Acuicultura*. México: Editorial Trillas, 2017, p. 158.

[14] "Probiotics: What You Need To Know", NCCIH, 2019. [En línea]. Disponible en: <https://nccih.nih.gov/health/probiotics/introduction.htm>. [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].

- [15] J. Slavin, "Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits", *Nutrients*, vol. 5, no. 4, pp. 1417-1435, 2013. Disponible en: [10.3390/nu5041417](https://doi.org/10.3390/nu5041417) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [16] M. Roberfroid, "Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients", *The Journal of Nutrition*, vol. 137, no. 11, pp. 2493S-2502S, 2007. Disponible en: [10.1093/jn/137.11.2493s](https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2493s) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [17] U.S. Food and Drug Administration, "The Declaration of Certain Isolated or Synthetic Non-Digestible Carbohydrates as Dietary Fiber on Nutrition and Supplement Facts Labels: Guidance for Industry", 2018.
- [18] M. Konikoff and L. Denson, "Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease", *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 12, no. 6, pp. 524-534, 2006. Disponible en: [10.1097/00054725-200606000-00013](https://doi.org/10.1097/00054725-200606000-00013) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [19] A. Costabile et al., "Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study", *British Journal of Nutrition*, vol. 99, no. 1, pp. 110-120, 2008. Disponible en: [10.1017/s0007114507793923](https://doi.org/10.1017/s0007114507793923) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [20] P. Ramnani, E. Gaudier, M. Bingham, P. van Bruggen, K. Tuohy and G. Gibson, "Prebiotic effect of fruit and vegetable shots containing Jerusalem artichoke inulin: a human intervention study", *British Journal of Nutrition*, vol. 104, no. 2, pp. 233-240, 2010. Disponible en: [10.1017/s000711451000036x](https://doi.org/10.1017/s000711451000036x) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [21] C. Leyva-Porras, A. López-Pablos, C. Alvarez-Salas, J. Pérez-Urizar and Z. Saavedra-Leos, "Physical Properties of Inulin and Technological Applications", *Polysaccharides*, pp. 1-22, 2014. Disponible en: [10.1007/978-3-319-03751-6_80-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_80-1) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [22] S. Beirão-da-Costa et al., "Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil", *Food Hydrocolloids*, vol. 33, no. 2, pp. 199-206, 2013. Disponible en: [10.1016/j.foodhyd.2013.03.009](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.009) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [23] A. Poshadri and A. Kuna, "Microencapsulation technology: A review", *Oar.icrisat.org*, 2010. [En línea]. Disponible en: <http://oar.icrisat.org/id/eprint/6375>. [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [24] A. Grumezescu, *Encapsulations - Nanotechnology in Agri-Food Industry*. London: Academic Press, 2016, pp. 34-69.
- [25] A. Jain, V. Sood, M. Bora, R. Vasita and D. Katti, "Electrosprayed inulin microparticles for microbiota triggered targeting of colon", *Carbohydrate Polymers*, vol. 112, pp. 225-234, 2014. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.087](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.087) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [26] M. Zamani, M. Prabhakaran and S. Ramakrishna, "Advances in drug delivery via electrospun and electrospayed nanomaterials", *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, p. 2998, 2013. Disponible en: [10.2147/ijn.s43575](https://doi.org/10.2147/ijn.s43575) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [27] "Food Composition Databases Show Foods -- LARGE FLAKE NUTRITIONAL YEAST, UPC: 039978025463", *USDA Branded Food Products Database*, 2018. [En línea]. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/45360902?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=yeast&ds=&qt=&qp=&qd=&qe=&qf=&qg=&qh=&qj=&qk=&ql=&qm=&qn=&qo=&qp=&qq=&qr=&qs=&qv=&qw=&qx=&qy=&qz=&ing=>
- [28] T. Rocha dos Santos Mathias, P. Paulo Moretzsohn de Mello and E. Flavia Camporese Srvulo, "Solid wastes in brewing process: A review", *Journal of Brewing and Distilling*, vol. 5, no. 1, pp. 1-9, 2014. Disponible en: [10.5897/jbd2014.0043](https://doi.org/10.5897/jbd2014.0043) [Fecha de acceso: Enero 3, 2020].
- [29] O. Zarei, S. Dastmalchi & M. Hamzeh-Mivehroud, "A simple and rapid protocol for producing yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* suitable for preparing bacterial culture media", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 15 (4): 907-913.

- [30] V. Zechner-Krpan, V. Petravić-Tominac, I. Gospodarić, L. Sajli, S. Đaković, & J. Filipović-Grčić. "Characterization of b-Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods", *Food Technology and Biotechnology*, 48 (2) 189–197, 2010.
- [31] H.M.I. Osama. "What is Gum Arabic? An overview", *Int. J. Sudan Research*, Vol. 7, No. 1, 2017.
- [32] S. Shiau, H. Yu, S. Hwa, S. Chen and S. Hsu, "The influence of carboxymethylcellulose on growth, digestion, gastric emptying time and body composition of tilapia", *Aquaculture*, vol. 70, no. 4, pp. 345-354, 1988. Disponible en: 10.1016/0044-8486(88)90118-4.
- [33] A. Brodkorb et al., "INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion", *Nature Protocols*, vol. 14, no. 4, pp. 991-1014, 2019. Disponible en: 10.1038/s41596-018-0119-1 [Fecha de acceso: Enero 10, 2020].
- [34] M. Minekus et al., "A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus", *Food Funct.*, vol. 5, no. 6, pp. 1113-1124, 2014. Disponible en: 10.1039/c3fo60702j [Fecha de acceso: Enero 10, 2020].
- [35] S. Zhang, C. Campagne and F. Salaün, "Influence of Solvent Selection in the Electro spraying Process of Polycaprolactone", *Applied Sciences*, vol. 9, no. 3, p. 402, 2019. Disponible en: 10.3390/app9030402 [Fecha de acceso: Enero 10, 2020].
- [36] S. Sieuwerts et al., "Mixed-Culture Transcriptome Analysis Reveals the Molecular Basis of Mixed-Culture Growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 23, pp. 7775-7784, 2010. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.01122-10> [Fecha de acceso: Enero 13, 2020].
- [37] "Nile tilapia - Natural food and feeding habits", *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/nile-tilapia/natural-food-and-feeding-habits/en/>. [Fecha de acceso: Enero 13, 2020].
- [38] J. Santos et al., "Digestive enzyme activity in the intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) under pond and cage farming systems", *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 42, no. 5, pp. 1259-1274, 2016. Disponible en: 10.1007/s10695-016-0215-5 [Fecha de acceso: Enero 13, 2020].
- [39] Guidance for Industry Exocrine Pancreatic Insufficiency Drug Products – Submitting NDAs. Rockville, 2006, p. 1.
- [40] M. Kechagia et al., "Health Benefits of Probiotics: A Review", *ISRN Nutrition*, vol. 2013, pp. 1-7, 2013. Disponible en: 10.5402/2013/481651 [Fecha de acceso: Enero 13, 2020].