



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONDICIONES DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN FASE SÓLIDA DE POLEN APÍCOLA

Claudia Yamile Salazar González

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos
Bogotá, Colombia
2014

EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONDICIONES DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN FASE SÓLIDA DE POLEN APÍCOLA

Claudia Yamile Salazar González

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Directora:

Ph.D. Amanda Consuelo Díaz Moreno

Línea de Investigación:

Caracterización y Generación de Valor de Productos Apícolas

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la Calidad de Alimentos y Desarrollo de Nuevos Productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2014

A mis padres y hermana, por su apoyo incondicional en cada decisión que he tomado.

Aprendí que no se puede dar marcha atrás, que la esencia de la vida es ir hacia adelante. La vida, en realidad, es una calle de sentido único.

Agatha Christie

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos -ICTA-, y al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación –Colciencias-, por su programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores del año 2012 y la financiación del proyecto “***Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales***”, programas que permitieron el avance de este proyecto y especialmente al Apiario Los Cerezos, el cual facilitó material para el desarrollo de esta investigación.

Igualmente quiero agradecer especialmente y en primer lugar a mi familia, a mi papá, quien siempre me impulsó a continuar estudiando, superar mis propios límites y seguir adelante, desde el cielo está orgulloso de lo que he logrado. A mi mamá, la persona que siempre ha apoyado lo que soy y gracias a sus enseñanzas he aprendido que la vida no se detiene y siempre debemos aprovechar cada segundo y seguir adelante, como ella siempre me dice “para atrás ni para coger impulso”. A mi hermana, simplemente por estar ahí, escuchar y apoyar mis decisiones.

A la profesora Consuelo Díaz, quien además de dirigir este proyecto, me ha ayudado a crecer como persona a través de sus enseñanzas, constante exigencia e inmensa paciencia en mi formación como investigadora.

A la profesora Martha Quicazán, por su apoyo y sus constantes consejos, que me han ayudado en mi formación como persona y profesional.

Personas que me han ayudado en el desarrollo de este proyecto: Ivonne, Carito, Carito Vega, Carlos Zuluaga, Charlie, Mauricio, me han aconsejado y con quienes he compartido momentos de alegría y trabajo.

A mis compañeros de maestría, en especial a Erika, Guille, Miguel, César y Nancy Paola, personas especiales y excelentes profesionales, con quienes he compartido recuerdos inolvidables de felicidad y tristeza.

A mis amigos, Alex, Lili, Carito Acosta, Fer, Mary, Alejo, Juli, Fabián y Nazly, que me brindaron su amistad y sin ellos no habría sido posible alcanzar tantos logros. Momentos de diversión, desaliento, inmensa alegría, son reminiscencias que llenan mi vida de un especial cariño por todos ustedes. Jeffer, gracias por estar siempre ahí, apoyarme y hacerme ver todos mis errores, aciertos y sobretodo, nunca dejarme caer.

A toda la familia ICTA, quien en este tiempo de estudio y esfuerzo han estado presentes para alegrar y compartir vivencias, Andrés Mauricio, Jhon, Yuly, Alex, Andrés, Martha María, Leonardo, Claudia y un especial agradecimiento a Gregorio, por toda su paciencia y colaboración.

A todas las personas que han pasado por mi vida y que me han dejado enseñanzas de vida, superación y fortaleza; con cada palabra, ocasión y experiencia me han enseñado que la vida sólo es una, debemos aprovecharla al máximo y esforzarnos por cumplir cada uno de los sueños que tenemos.

Resumen

El interés en obtener nuevos productos mediante bioprocesos ha aumentado en los últimos años, debido a las múltiples aplicaciones y ventajas, especialmente en la industria de alimentos. La fermentación en fase sólida, es un bioproceso que se ha desarrollado de forma natural en ensilajes y en la obtención de pan de abejas al interior de la colmena. El polen apícola es un alimento con características funcionales debido a su contenido de proteína, lípidos, fibra dietaria y micronutrientes, además de las características bioactivas debidas al contenido de vitaminas, carotenoides y fenoles totales, que permiten el desarrollo de los microorganismos que actúan en el proceso. Sin embargo, el polen es una matriz alimenticia con protección natural que impide la completa biodisponibilidad de los nutrientes hacia el exterior del grano. En el presente trabajo se realizó un bioproceso de fermentación en fase sólida, con el fin de obtener un producto similar al desarrollado por las abejas; se evaluó la calidad de la materia prima, se contemplaron operaciones de acondicionamiento mediante tratamientos térmicos (autoclave) y la evaluación de diferentes condiciones de proceso como cepas de microorganismos (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *S. cerevisiae* y un cultivo mixto), composición del sustrato (polen húmedo, polen seco:agua 2:1 y 1:1), temperaturas de incubación (35 y 40°C) y tiempos de fermentación (hasta 72 horas). Se evaluaron los cambios en parámetros fisicoquímicos, bioactivos, sensoriales y microestructurales a fin de seleccionar las mejores condiciones de proceso, encontrando que la fermentación desarrollada por el cultivo mixto, inoculado en un sustrato polen:agua 1:1 incubado a 35°C permite obtener un producto con características bioactivas mejores que la materia prima, así como carácter probiótico.

Palabras clave: bioproceso, bacterias ácido lácticas, levaduras, bioactivos.

Abstract

The interest in obtaining new products through bioprocesses has increased in recent years due to the multiple applications and advantages, especially in food industry. Solid-state fermentation is a bioprocess naturally developed in silages and in obtaining beebread inside the hive. Bee-pollen is a food with functional characteristics due to its content of protein, lipids, dietary fiber and micronutrients as well as bioactive properties due to the content of vitamins, carotenoids and total phenols, which allow the development of microorganisms on the process. However, bee-pollen is a food having a natural protection that prevents the complete bioavailability of nutrients towards the outside of the grain. In this paper a solid-state fermentation bioprocess was performed, in order to obtain a similar product to those developed by bees; the quality of the raw material was evaluated, and conditioning operations by heat treatment and evaluation of different process conditions as strains of microorganisms (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *S. cerevisiae* and a mixed culture), substrate composition (wet bee-pollen, dry bee-pollen:water 2:1 y 1:1), incubation temperatures (35 y 40°C) and times of fermentation (until 72 horas) were contemplated. Changes in physicochemical, bioactive, sensory and microstructural parameters in order to select the best process conditions were evaluated, finding that fermentation done by the mixed culture, inoculated into a bee-pollen:water 1:1 substrate incubated at 35°C allows obtaining a product with improved bioactivity characteristics in comparison to the raw material as well as probiotic character.

Keywords: bioprocess, lactic acid bacteria, yeasts, bioactive compounds.

Contenido

| | Pág. |
|---|-------------|
| Resumen | IX |
| Lista de figuras..... | XIII |
| Lista de tablas | XV |
| Lista de Símbolos y abreviaturas | XVI |
| Introducción | 1 |
| Objetivos..... | 4 |
| 1. Capítulo 1: Aptitud nutricional y bioactiva del polen apícola para un proceso de fermentación en fase sólida..... | 5 |
| 1.1 Polen Apícola | 5 |
| 1.1.1 Producción y manejo | 5 |
| 1.1.2 Estructura morfológica | 6 |
| 1.2 Polen Apícola como Alimento | 6 |
| 1.2.1 Carbohidratos | 8 |
| 1.2.2 Lípidos..... | 9 |
| 1.2.3 Proteína..... | 10 |
| 1.2.4 Micronutrientes..... | 12 |
| 1.2.5 Características bioactivas | 14 |
| 1.3 Fermentación en Fase Sólida de Polen Apícola | 18 |
| 1.3.1 Antecedentes de Fermentación en Polen Apícola | 20 |
| 1.3.2 Pan de abejas | 22 |
| 1.3.3 Características nutricionales y bioactivas del polen fermentado..... | 23 |
| 1.3.4 Microbiota asociada al polen..... | 24 |
| 1.3.5 Condiciones de proceso..... | 25 |
| 2. Capítulo 2: Condiciones de proceso y adecuación del polen apícola como materia prima para un proceso de fermentación en fase sólida. | 29 |
| 2.1 Introducción..... | 29 |
| 2.2 Materiales y Métodos | 30 |
| 2.2.1 Materia Prima | 30 |
| 2.2.2 Operaciones de acondicionamiento | 31 |
| 2.2.3 Métodos..... | 35 |
| 2.2.4 Estadística..... | 41 |
| 2.3 Resultados y Discusión..... | 42 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3.1 | Caracterización fisicoquímica, bioactiva y microbiológica del polen apícola | 42 |
| 2.3.2 | Condiciones de proceso para la fermentación en fase sólida de polen apícola | 48 |

3. Capítulo 3: Cambios en parámetros fisicoquímicos, bioactivos, sensoriales y microestructurales del polen apícola durante el proceso de fermentación en fase sólida. 55

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.1 | Introducción | 55 |
| 3.2 | Materiales y Métodos | 56 |
| 3.2.1 | Materia Prima | 56 |
| 3.2.2 | Proceso de fermentación en fase sólida | 57 |
| 3.2.3 | Métodos | 59 |
| 3.2.4 | Análisis estadístico | 60 |
| 3.3 | Resultados y Discusión | 61 |
| 3.3.1 | Parámetros fisicoquímicos | 62 |
| 3.3.2 | Características bioactivas, microbiológicas, microestructurales y sensoriales | 71 |
| 4. | Conclusiones y recomendaciones | 105 |
| 4.1 | Conclusiones | 105 |
| 4.2 | Recomendaciones | 108 |
| A. | Anexo: Fichas técnicas de los microorganismos utilizados | 111 |
| B. | Anexo: Procedimiento de activación de las cepas ATCC. | 117 |
| C. | Anexo: Análisis estadísticos. | 118 |
| D. | Anexo: Fotografías de microorganismos | 121 |
| | Bibliografía | 125 |

Lista de figuras

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 2-1: Procedimiento de estandarización del inóculo. | 34 |
| Figura 2-2: Procedimiento realizado para el recuento de microorganismos. | 41 |
| Figura 2-3: Micrografías con un aumento de 5000x de la estructura del grano de polen apícola..... | 49 |
| Figura 2-4: Curvas de población microbiana para las cepas de microorganismos en la relación de polen-caldo 1:10. | 53 |
| Figura 3-1: Procedimiento para ensayos de fermentación en fase sólida de polen apícola. | 58 |
| Figura 3-2: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con <i>L. plantarum</i> , evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C. | 64 |
| Figura 3-3: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con <i>L. acidophilus</i> , evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C. | 65 |
| Figura 3-4: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con <i>S. cerevisiae</i> , evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C. | 67 |
| Figura 3-5: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con el cultivo mixto, evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C..... | 68 |
| Figura 3-6: Micrografías con un aumento de 1600x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con <i>L. plantarum</i> | 75 |
| Figura 3-7: Micrografías con un aumento de 1200x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con <i>L. acidophilus</i> | 76 |
| Figura 3-8: Micrografías con un aumento de 1200x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con <i>S. cerevisiae</i> | 77 |
| Figura 3-9: Micrografías con un aumento de 1200x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con el cultivo mixto..... | 78 |
| Figura 3-10: Comportamiento comparativo de cada cepa en el contenido de vitamina E a lo largo del bioproceso. | 80 |
| Figura 3-11: Comparación entre los ensayos con cada cepa de los diferentes compuestos bioactivos a lo largo de la fermentación. | 81 |
| Figura 3-12: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con <i>L. plantarum</i> | 89 |
| Figura 3-13: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con <i>L. acidophilus</i> | 89 |
| Figura 3-14: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con <i>S. cerevisiae</i> | 90 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3-15: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con el cultivo mixto. | 90 |
| Figura 3-16: Comparación del perfil aromático entre las diferentes cepas..... | 93 |
| Figura 3-17: Análisis de varianza entre los sensores W1C y W2S..... | 94 |
| Figura 3-18: Parámetros de color en las distintas cepas analizadas..... | 95 |
| Figura 3-19: Correlación entre el contenido de carotenoides totales y las coordenadas de color. | 97 |
| Figura 3-20: Comparación de los compuestos bioactivos y sensoriales de los sustratos fermentados entre las distintas cepas de microorganismos evaluados..... | 100 |
| Figura 3-21: Cinética de crecimiento de los distintos microorganismos. | 102 |

Lista de tablas

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1-1: Composición de los carbohidratos de polen apícola | 9 |
| Tabla 1-2: Composición de ácidos grasos en el polen apícola..... | 10 |
| Tabla 1-3: Composición de aminoácidos en polen apícola..... | 12 |
| Tabla 1-4: Micronutrientes de polen apícola..... | 14 |
| Tabla 1-5: Composición de bioactivos en polen apícola..... | 16 |
| Tabla 1-6: Composición nutricional y bioactiva de pan de abejas..... | 24 |
| Tabla 2-1: Número de ensayos del diseño experimental para evaluar los tratamientos térmicos sobre el tipo de sustrato..... | 32 |
| Tabla 2-2: Número de ensayos del diseño experimental para estandarizar el inóculo..... | 35 |
| Tabla 2-3: Caracterización fisicoquímica y bioactiva del polen apícola inicial y el pan de abejas*..... | 42 |
| Tabla 2-4: Contenido de componentes bioactivos en polen apícola de diferentes orígenes..... | 45 |
| Tabla 2-5: Contenido microbiológico del polen húmedo y seco– apiario Los Cerezos..... | 46 |
| Tabla 2-6: Límites microbiológicos establecidos para el polen apícola..... | 47 |
| Tabla 2-7: Esterilidad comercial y a_w de polen apícola en los diferentes tratamientos térmicos..... | 48 |
| Tabla 2-8: Recuentos de microorganismos en las últimas horas del proceso de fermentación en fase sólida..... | 52 |
| Tabla 3-1: Diseño experimental para comparar condiciones en el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola..... | 59 |
| Tabla 3-2: Grupo de compuestos volátiles detectados por los sensores de la nariz electrónica..... | 60 |
| Tabla 3-3: Características antioxidantes de los distintos sustratos antes y después del tratamiento térmico*..... | 73 |
| Tabla 3-4: Comparación de los compuestos bioactivos entre las distintas cepas*..... | 87 |
| Tabla 3-5: Comparación de las coordenadas de color entre las cepas evaluadas..... | 98 |

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura Término

| | |
|--------------|---|
| <i>ABTS</i> | Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico |
| <i>BAL</i> | Bacterias ácido lácticas |
| <i>FRAP</i> | Ferric Reducing Antioxidant Power |
| <i>FFS</i> | Fermentación en fase sólida |
| <i>GAE</i> | Ácido gálico |
| <i>GC</i> | Cromatografía de Gases |
| <i>GC-MS</i> | Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas |
| <i>HPLC</i> | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia |
| <i>ICTA</i> | Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos |
| <i>MRS</i> | Man Rogosa Sharpe |
| <i>PCA</i> | Análisis de componentes principales |
| <i>PDA</i> | Potato Dextrose Agar |
| <i>TEAC</i> | Trolox Equivalent Antioxidant Capacity |
| <i>UFC</i> | Unidades Formadoras de Colonia |

Introducción

Actualmente el mercado mundial presenta tendencias tecnológicas y comerciales fuertes en alimentos naturales, que contribuyan con el medio ambiente y que generen beneficios adicionales al aporte nutricional. Los alimentos que proporcionan estas características son conocidos como funcionales; entre los aportes, se busca reducir el riesgo de enfermedades degenerativas y encontrar alternativas para desarrollar alimentos con características probióticas [1-2].

La apicultura, actividad realizada en muchos países del mundo como Argentina, Chile, China, México y Brasil [3-4] está incursionando en el mercado de los alimentos funcionales debido a las características antioxidantes y antimicrobianas que tienen los productos de la colmena, especialmente miel de abejas, polen, propóleos y jalea real [4]. Otros aportes adicionales son la sustentabilidad ambiental y la polinización como herramienta para la garantía de la seguridad alimentaria, reproducción de especies vegetales, el aumento de volumen y calidad de los frutos y la recuperación, conservación y estabilización de ecosistemas nativos [4].

En Colombia la apicultura sólo fue reconocida como una cadena productiva hasta el año 2012 mediante la Resolución 282 emitida por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en la que se establece la Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura (CPAA). Esta cadena busca mejorar las condiciones de producción y comercialización de los productos, planteando a 2025 la existencia de 16.073 colmenas en producción de polen, que corresponderían a 550t/año, obteniéndose una producción promedio de polen de 40 kg/colmena/año; promover la generación de valor mediante procesos de transformación; la adopción de nuevas tecnologías; el establecimiento de un reglamento técnico y normativo; el cumplimiento de las exigencias sanitarias; la capacitación de apicultores y la reducción de los costos de producción.

La iniciativa expuesta anteriormente está dentro de los planteamientos del Plan Nacional de Desarrollo, el cual en uno de sus pilares (Crecimiento Sostenible y Competitividad), busca generar una cultura de innovación tanto en las universidades como en el sector empresarial, ligada fuertemente a la sostenibilidad ambiental, factor en el cual la apicultura juega un papel importante, debido a la actividad de pecoreo realizada por las abejas, que lleva a una mayor polinización, calidad y diversidad de productos. Igualmente el Impulso a la Locomotora del sector Agropecuario, debe aprovechar la riqueza y el potencial de la biodiversidad colombiana, disminuyendo los altos costos de producción y promoviendo la transformación y comercialización de la producción agropecuaria.

La apicultura es una actividad que está ligada al cumplimiento del Plan Nacional de Desarrollo, debido a su creciente investigación e innovación y al impacto que tiene en el ámbito social, ambiental y económico. Por tal razón se decidió impulsar el desarrollo y la innovación tecnológica en los productos de la colmena, entre los que se encuentra el polen apícola.

La miel de abejas y el polen apícola son los productos de la colmena que en Colombia se utilizan como alimento y que mayor comercialización tienen [5-6]. La producción mundial de polen está dada por China con 3000 toneladas, España, Chile y Argentina [4]. En Colombia se reportan producciones de 240 ton/año [7] con tendencia a incrementarse. Entre los países consumidores se encuentran principalmente Estados Unidos, Alemania y Japón, seguidos de los países Árabes [3].

El polen es el resultado de la aglutinación del polen floral por parte de las abejas [5]. Tiene nutrientes y compuestos bioactivos, que lo convierten en un alimento completo para las abejas [5, 8-10]; sin embargo el grano de polen tiene una morfología, que actúa como una protección natural contra agentes externos e impide la disponibilidad de los nutrientes. Al interior de la colmena, las abejas realizan un proceso fermentativo, para elaborar pan de abejas, es un bioproceso natural que realiza una fermentación en fase sólida del polen apícola [6].

La fermentación en fase sólida es un proceso desarrollado en un sustrato sólido, que tiene un contenido mínimo de agua libre, en que los microorganismos pueden crecer [11]. Así mismo el proceso debe controlar condiciones favorables como temperatura, pH,

actividad de agua y contenido de nutrientes [12]. Este proceso ha sido utilizado en ensilajes, tecnología que se ha implementado en la industria alimenticia, en producción de queso con *Penicillium roquefortii*, fermentación de arroz con *Aspergillus oryzae*, producción de vinos, vinagre y salsa de soya [13-15]. Igualmente se ha estudiado el desarrollo de un producto a partir de polen apícola, con el fin de imitar el bioproceso natural para obtener pan de abejas [7, 16-17].

Estudios realizados anteriormente por Vamanu y Fuenmayor [7, 16-19] presentan la posibilidad de realizar un proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola, de acuerdo a las características funcionales y nutricionales de la materia prima, tanto para el crecimiento de los microorganismos como para el consumo en la alimentación; y los resultados obtenidos presentan el primer paso en el desarrollo de un producto a partir de una fermentación en polen ofreciendo pautas para la investigación y mejora de las condiciones de proceso.

El trabajo se desarrolló como parte de los objetivos del PROGRAMA ESTRATÉGICO EN ALTERNATIVAS PARA LA GENERACIÓN DE VALOR EN PRODUCTOS APÍCOLAS EN COLOMBIA A TRAVÉS DE LA INNOVACIÓN Y EL DESARROLLO TECNOLÓGICO, financiado por Colciencias, específicamente en el proyecto ESTABLECIMIENTO DE PROCESOS DE CONSERVACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE POLEN APÍCOLA PARA LA OBTENCIÓN DE ALIMENTOS CON CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES, en el cual se busca establecer las condiciones del proceso de fermentación en fase sólida utilizando cepas de bacterias ácido-lácticas y levaduras con el fin de seleccionar las mejores condiciones de proceso y obtener un producto con características funcionales. Este nuevo producto generará valor agregado al polen apícola, además de contribuir con el desarrollo de la cadena apícola y la investigación.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola utilizando cepas de bacterias ácido-lácticas y una levadura comercial.

Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones de adecuación, composición del sustrato y comportamiento de cepas de bacterias ácido-lácticas y levadura comercial en el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola.
- Determinar los cambios en parámetros fisicoquímicos, bioactivos, sensoriales y microestructurales del polen apícola durante el proceso de fermentación en fase sólida.
- Evaluar la cinética de crecimiento de las cepas durante el proceso de fermentación en fase sólida.

1. Capítulo 1: Aptitud nutricional y bioactiva del polen apícola para un proceso de fermentación en fase sólida.

1.1 Polen Apícola

El polen se caracteriza por ser una multitud de cuerpos generalmente esféricos, unidades reproductoras masculinas de la planta y que tiene una estructura que los protege del ambiente [5]. Es importante notar que el término polen se utiliza de forma general, es una mezcla de varios orígenes botánicos y sus características pueden variar dependiendo de las condiciones geográficas y medioambientales [10, 20].

En el proceso de recolección, las abejas quedan cubiertas de polen y con ayuda de las patas posteriores es comprimido en pellets mezclándolo con néctar y secreciones salivares, para usarlo como alimento, fuente de proteína en la colmena [5, 21]. Éste es conocido como polen corbicular, las abejas lo almacenan en bolsillos ubicados en las patas, llamados corbículas. Los apicultores lo recogen mediante trampas ubicadas en la entrada de la colmena y entonces es denominado polen apícola [6-7].

1.1.1 Producción y manejo

En Colombia la producción de polen se ve afectada por las condiciones climáticas, ambientales, disponibilidad de flora polinífera, entre otras [3]. La producción de polen apícola es de 35-36 kg/colmena/año, principalmente en el altiplano alto-andino [22]. En Colombia han sido contabilizados un total de 2100-2300 apicultores que manejan 40.000 colmenas, de las cuales 3025 son dedicadas a la producción de polen, lo que genera 240 ton/año, teniendo picos de producción en mayo, octubre y diciembre [7].

1.1.2 Estructura morfológica

El polen tiene diámetros entre 6-200µm. Está compuesto por dos capas protectoras, intina y exina, que protegen el interior del grano de oxidación, daños por radiación y degradación química producida por exposición a luz UV, entre otros [6, 23-24].

En la parte central del polen es encontrada la célula viva, protegida por la esporodermis (intina) y seguida de la exina [6]. Tiene dos núcleos, uno vegetativo, que origina el tubo de fertilización y otro con una célula generativa [7].

La intina es una capa porosa compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectinas [25] con espesor entre 0.5-1.2 µm [26]. Está compuesta por tres capas, la primera es la más externa, que posee varios componentes vesiculares fibrilares con extensiones tubulares, la segunda capa contiene inclusiones esféricas y la tercera capa es la más delgada de las tres y está en contacto con el protoplasto [27].

La exina está compuesta por diversas sustancias orgánicas e inorgánicas, entre las que se encuentra la esporopolenina, polímero muy complejo que le da resistencia química al polen [25]. La estructura de la esporopolenina ha sido estudiada ampliamente y se ha encontrado que está hecha principalmente de carbono, hidrógeno y oxígeno, típicamente $C_{90}H_{144}O_{27}$. Una estructura propuesta es un copolímero lipídico de ácidos p-hidroxicinámicos (ácidos ferúlico y p-cumárico) y ácidos grasos, entrelazado con éteres y ésteres [28]. Igualmente se han encontrado algunos tipos de carotenoides [29-30], tocoferoles, provitamina A y vitamina D [6]. Los lípidos evitan la desecación y muerte de la célula viva y los antioxidantes evitan la oxidación de algunos componentes del grano [6, 30].

1.2 Polen Apícola como Alimento

El polen es un alimento que contiene nutrientes y compuestos bioactivos. Entre los nutrientes se encuentran las proteínas, caracterizadas por el contenido de enzimas y aminoácidos esenciales y no esenciales; carbohidratos, con presencia de azúcares

reductores, polisacáridos, almidón y fibra, soluble e insoluble; lípidos, entre los que se encuentran ácido grasos, esteroides y triglicéridos; compuestos minoritarios como minerales y vitaminas (hidrosolubles y liposolubles) y algunos compuestos bioactivos y antioxidantes como polifenoles, carotenoides (principalmente β -caroteno) y flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavonoles, antocianinas), entre otros [5, 8-9, 21, 31].

Las variaciones en la composición nutricional y en las características bioactivas del polen apícola son ocasionadas por las condiciones climáticas, origen botánico, época del año, estación, edad y estado nutricional de la planta, formas de recolección del polen, métodos de extracción, condiciones de almacenamiento y procesos de tratamiento sobre el polen fresco [20, 32-33]. Entre los compuestos que varían dependiendo el origen botánico está el almidón [34], lípidos [21, 35], proteínas [6], minerales [20], aminoácidos [33], flavonoides y carotenoides que afectan el color [5, 36-37] y vitaminas [32]. El contenido tanto de carbohidratos totales como de azúcares depende del proceso de secado y almacenamiento [34], la proteína varía dependiendo del origen geográfico y la manipulación [6], el contenido mineral depende del origen botánico [20], las vitaminas de condiciones ambientales y nutricionales de la planta [32] y el contenido de carotenoides con el procedimiento de extracción, los rayos UV y el aire [6].

La humedad es un parámetro importante para las reacciones de deterioro y proliferación de microorganismos que generan la fermentación de polen [9], por tanto debe tener un buen almacenamiento o ser llevado a procesos de secado para retirar agua. La humedad es reportada en el rango 2.95-33.98% [6-7, 10, 33, 35-36, 38-41] y la determinación es realizada mediante secado en estufa [33, 37, 42-43] y metodología Karl Fischer [44]. El contenido de humedad óptimo para comercialización debe ser menor al 6% [35, 38]. Se han establecido límites para este parámetro en Argentina, México y El Salvador, reportándose un valor máximo en Argentina de 4.0% [45] y rangos entre 4.5-8.0% [46] y 4.0-30.0% [47], para México y El Salvador, respectivamente. De acuerdo a esto el polen colombiano (5.29-7.73%) se encuentra ligeramente por encima de la legislación argentina, sin embargo modificando prácticas de pos-cosecha, proceso y almacenamiento puede alcanzarse dicho valor. Igualmente la actividad de agua es un parámetro importante para las reacciones de crecimiento microbiano, encontrándose en

el polen rango entre 0.10-0.84 [7, 21, 33, 35-36, 43], dependiendo del polen usado en la determinación.

1.2.1 Carbohidratos

El polen apícola contiene entre 15-60% de carbohidratos, entre los que se encuentran azúcares reductores, polisacáridos y fibra dietaria [21, 23, 36]. De acuerdo a la norma argentina que establece un rango entre 45-55% [45], el contenido del polen apícola se encuentra por debajo del límite inferior, diferencias generadas por diversas condiciones. Los azúcares totales se han encontrado en rangos de 35.0-49.7% del contenido de carbohidratos totales [48].

- **Azúcares reductores**

Se han reportado contenidos de monosacáridos como fructosa y glucosa, los cuales generalmente vienen del néctar o la miel [36]. Por tal razón se encuentran en mayores concentraciones que los demás sacáridos, ya que para compactar los pellets de polen, las abejas adicionan néctar [33]. En pólenes españoles el contenido total de azúcares reductores (glucosa y fructosa) es de 32.9% [35], en polen peruano está entre 22.4-26.0% [48] y en polen colombiano se encuentra entre 32.98-39.80% [7, 41].

- **Polisacáridos**

Se han encontrado polisacáridos como maltosa, isomaltosa, trehalosa, rafinosa, erlosa, almidón, celulosa, hemicelulosa, y a nivel de trazas se encuentran sustancias que hacen parte de la estructura de lignina [5-6]. En pólenes provenientes de lugares de clima frío se reporta un contenido elevado de almidón, dado que las plantas lo almacenan en mayores cantidades [48].

En la Tabla 1-1 se presenta la composición de los carbohidratos:

Tabla 1-1: Composición de los carbohidratos de polen apícola

| Carbohidrato (%) | Contenido | Método de cuantificación | Referencias |
|--------------------------|------------|---|--------------------------|
| Fibra cruda | 0.43-20.0 | Digestión enzimática [43] | [5, 7, 9, 43, 49] |
| Fibra dietaria | 0.3-20.0 | Digestión enzimática [33] | [5, 7, 9, 33, 35, 40-41] |
| Fibra dietaria insoluble | 11.3-13.1 | | [7, 35, 40-41] |
| Fibra dietaria soluble | 1.3-3.03 | | |
| Almidón | 2.13-18.0 | | [10, 34-35] |
| Glucosa | 8.45-45.57 | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia - HPLC [33-34] | [7, 33-35, 41] |
| Fructosa | 9.74-46.0 | | |
| Sacarosa | 0.06-8.55 | | |
| Trehalosa | 0.20-3.20 | | |
| Isomaltosa | 0.22 | | |
| Maltosa | 1.07-5.61 | HPLC [34] | [34-35] |
| Rafinosa | 0.15 | | [35] |
| Erlosa | 0.15 | | |
| Melecitosa | 0.01-2.75 | | |
| Turanosa | 0.2-0.58 | HPLC [34] | [34] |

1.2.2 Lípidos

Los lípidos en polen apícola se han encontrado entre 0.5-20%, provenientes principalmente de la exina [6, 21, 35]. En polen colombiano se han encontrado valores entre 4.61-6.90% [7, 40-41]. Dentro de los lípidos se pueden encontrar esteroides, como el colesterol, mono, di y triglicéridos, 31 ácidos grasos esenciales, fosfolípidos, hidrocarburos y terpenos [6, 23].

▪ Ácidos grasos

Entre los ácidos grasos se han encontrado el linolénico, palmítico, linoleico y oleico [5, 35], siendo el palmítico el más abundante. Los ácidos grasos insaturados constituyen el 70% de los ácidos totales [5].

En la Tabla 1-2 se presenta la composición de ácidos grasos:

Tabla 1-2: Composición de ácidos grasos en el polen apícola.

| Componente (%) | Contenido | Método de cuantificación | Referencias | |
|----------------------|------------|-------------------------------------|--|----------|
| Grasa | 0.15-20.0 | Goldfish [37, 42], Soxhlet [33, 43] | [5-7, 9-10, 32-33, 35, 37, 39-43, 49-50] | |
| Ácido graso | | | | |
| Caprílico (C8) | 0.06-0.59 | | [35, 41] | |
| Cáprico (C10) | 0.56-3.51 | | | |
| Láurico (C12) | 0.90-7.34 | | [33, 35, 41] | |
| Mirístico (C14) | 0.22-3.61 | | [33, 35, 41, 51-52] | |
| Miristoleico (C14:1) | 0.64-8.80 | | [33, 35, 41] | |
| Palmitico (C16) | 11.3-44.78 | | [33, 35, 41, 51-52] | |
| Palmitoleico (C16:1) | 0.38-13.58 | | [33, 35, 52] | |
| Margaroleico (C17:1) | 2.10-2.65 | | [33] | |
| Esteárico (C18) | 1.83-5.14 | Cromatografía de Gases - GC [33] | [33, 35, 41, 51-52] | |
| Oleico (C18:1) | 1.95-27.81 | | | |
| Linoleico (C18:2) | 4.88-34.65 | | | |
| Linolénico (C18:3) | 1.61-53.07 | | | |
| Araquídico (C20) | 0.48-3.20 | | | |
| Gadoleico (C20:1) | 8.65-9.97 | | [33, 35, 41, 51] | |
| Heneicosanoico (C21) | 1.27-2.36 | | [33] | |
| Behénico (C22) | 0.12-1.78 | | [35, 51-52] | |
| Lignocérico (C24) | 0.18-2.43 | | GC [33] | [33, 51] |

1.2.3 Proteína

La proteína presenta un amplio rango en su contenido, encontrándose entre 7.5-40% [10, 21, 35-36, 41], valores por encima de las legislaciones argentina y mexicana (15-28%, 12-18%, respectivamente) [45-46]. En polen colombiano el rango está entre 20.4-23.8% [7, 40-41]. Se han reportado enzimas como la amilasa, invertasa, algunas fosfatasa y transferasa; así como cofactores enzimáticos, entre los que están la biotina, el glutatión, el NAD y algunos nucleótidos [6, 23].

- **Aminoácidos**

De acuerdo a Domínguez [33] el aminoácido de mayor prevalencia es la prolina, seguido de la hidroxiprolina, que se encuentra como una glicoproteína en la pared celular del

polen, [6]. El aminoácido no proteico ácido gama-aminobutírico fue encontrado en pólenes españoles, y su importancia radica en su participación en varias funciones fisiológicas y en su resistencia a tratamientos térmicos [33]. La lisina, leucina y ácidos glutámico y aspártico, constituyen el 55% de los aminoácidos totales [5].

La presencia de ácido glutámico y prolina está asociada con la calidad del polen, valores superiores a 20mg/g de ácido glutámico indican frescura, mientras que el descenso en los valores de prolina indican envejecimiento y procesamiento [33].

En la Tabla 1-3 se presenta el contenido de aminoácidos:

Tabla 1-3: Composición de aminoácidos en polen apícola.

| Componente | Contenido | Método de cuantificación | Referencias |
|------------------------------|------------|--|---|
| Proteína (%) | 7.5-52.6 | Kjeldahl [33, 37, 42-43] | [5-7, 9-10, 32-33, 35, 37, 39-40, 42-43, 49-50] |
| Aminoácidos (mg/100g) | | | |
| Ácido aspártico | 2.98-151 | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia - HPLC [33] | [33, 35, 39] |
| Ácido glutámico | 3.02-178.8 | | [33, 35] |
| Asparagina | 0.51-58 | | [35] |
| Glutamina | 0.21 | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia - HPLC [33] | [33, 35, 39] |
| Serina | 1.0-274 | | [6, 33, 35, 39] |
| Glicina | 1.26-640 | | [7, 35, 39, 49] |
| Alanina | 0.38-1068 | | [7, 33, 35, 39, 49] |
| Arginina | 1.23-503 | | [33, 35, 39, 49, 53-54] |
| Tirosina | 0.75-743 | | [7, 33, 35, 39, 53] |
| Prolina | 2.90-2581 | | [7, 33, 39, 49] |
| Metionina | 0.53-2368 | | [7, 33, 49] |
| Treonina | 0.44-720 | | [33, 35, 39, 49, 53-54] |
| Valina | 1.56-4464 | | [7, 33, 35, 39, 53] |
| Isoleucina | 1.21-4144 | | [7, 33, 39, 49] |
| Leucina | 1.93-5416 | | [7, 33, 49] |
| Lisina | 1.84-3800 | | [33, 39] |
| Fenilalanina | 1.16-965 | | [33] |
| Histidina | 0.53-3848 | | |
| Triptófano | 0.16-1424 | | |
| Cisteína | 0.06-3024 | | |
| Hidroxi prolina | 0.90-20 | | |
| Ácido gama-aminobutírico | 26-69 | | |

1.2.4 Micronutrientes

Los micronutrientes son importantes en la alimentación, ya que hacen parte de reacciones metabólicas. Entre estos se encuentran los minerales y vitaminas. Los minerales participan en reacciones enzimáticas, mineralización de los huesos, protección de células, entre otros [55], y las vitaminas ayudan en la obtención de cofactores y el mantenimiento de funciones biológicas [32].

- **Contenido mineral**

Los elementos con mayor contenido son potasio, sodio, calcio, magnesio y fósforo [23]. En polen español se ha encontrado que el mineral predominante es el potasio con el 59-60% del contenido total de las cenizas y el fósforo, calcio, sodio y magnesio son el 39.9% [5, 35]. En polen colombiano se han encontrado valores para sodio entre 91.1-99.3ppm [40-41], para calcio entre 1449.3-1795.7ppm [7, 40-41], para magnesio entre 1028.6-2407.3ppm [7, 40-41], para zinc entre 30.0-47.4ppm [7, 40-41], para hierro entre 67.8-70.7 ppm [40-41], para potasio entre 5624.5-5847.7ppm [40-41] y para cobre entre 10.0-13.4ppm [40]. Dentro de los elementos trazas se encuentran el aluminio, boro, cloro, cobre, yodo, hierro, manganeso, níquel, sílice, azufre, titanio y zinc [6].

- **Vitaminas**

Se han encontrado amplios rangos, principalmente vitaminas del complejo B, C y E [5, 8, 10, 21, 32].

En la Tabla 1-4 se presenta el contenido de minerales y vitaminas:

Tabla 1-4: Micronutrientes de polen apícola.

| Componente | Contenido | Métodos de cuantificación | Referencias |
|----------------------------|------------|--|--|
| Cenizas (%) | 1.59-6.4 | Calcinación [37, 42-43] | [5-7, 9-10, 32, 35-37, 39-40, 42-43, 50] |
| Minerales (mg/kg) | | | |
| Fe | 11-2576 | Espectrofotometría de Absorción Atómica [33] | [5, 9, 33, 35, 40, 49] |
| Cu | 2-17.1 | | |
| K | 4000-20000 | | |
| P | 581.6-6000 | | |
| Ca | 64-3000 | | |
| Mg | 81.6-3000 | | |
| Zn | 30-311 | | |
| Na | 57.44-2211 | | |
| Mn | 7.41-110 | | |
| | | | |
| Vitaminas (mg/kg) | | | |
| β-caroteno (Provitamina A) | 10-200 | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia – HPLC [32] | [5, 9] |
| Tiamina (B1) | 0.64-13 | | [5, 9, 32, 49] |
| Riboflavina (B2) | 0.81-25.6 | | |
| Niacina (B3) | 4.2-153.4 | | |
| Piridoxina (B6) | 0.25-7 | | |
| Ácido pantoténico (B5) | 1.01-20 | | |
| Ácido fólico(B9) | 3-303.8 | [5, 9, 49] | |
| Ácido ascórbico (C) | 26.12-560 | HPLC [32], Titulación [37], Espectrofotometría [43] | [5, 9, 49, 56] [37, 43] |
| Biotina (H) | 0.5-0.7 | Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia – HPLC [32] | [5, 9] |
| Tocoferol (E) | 9.2-869.6 | | [5, 9, 40, 49, 57] |

1.2.5 Características bioactivas

Se han encontrado sustancias antioxidantes como flavonoides, carotenoides, fenoles totales y xantofilas [8, 21, 23]. Estos compuestos se ven afectados negativamente por tratamientos térmicos [33].

- **Compuestos fenólicos**

La composición fenólica del polen consiste principalmente en flavonoides y ácidos fenólicos [31, 58]. Los ácidos se dividen de acuerdo a su estructura en ácidos

hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos y los flavonoides se encuentran generalmente en forma de glucósidos: flavonas, isoflavonas (generan colores amarillos) y antocianos (colores rojo violeta), también se ha reportado que generan colores rosado, púrpura y azul [6, 48].

En un estudio realizado por LeBlanc [8] en polen se encontraron polifenoles, flavonas, flavonoles como quercetina y naringenina, analizados en diferentes solventes. Al utilizar metanol y etanol se obtienen compuestos como flavonoides y catequinas. Campos ha reportado polifenoles, entre los que encontró principalmente derivados de ácidos fenólicos y flavonoides [5]. Entre los flavonoides encontrados en polen brasileño están la miricetina, dihidromiricetina, quercetina e isorhamnetina [59]. Se han encontrado los polifenoles ácido o-,p-cumárico, ácido ferúlico, miricetina, ácido cinámico, quercetina, naringenina, herpertina y kamferol en polen griego [60].

- **Isoprenoides**

El contenido de carotenoides totales está entre 1.22-20.40 $\mu\text{g/polen}$ [33] y generan colores amarillos, rojo-anaranjado y amarillo-anaranjado en el polen [48].

En la Tabla 1-5 se presenta el contenido de compuestos bioactivos:

Tabla 1-5: Composición de bioactivos en polen apícola.

| Componente | Contenido | Métodos de cuantificación | Referencias |
|---|-------------|--|-------------|
| Polifenoles (mg/g GAE) | 4.4-34.85 | Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS) [33] | [8, 61-63] |
| kamferol (mg/100g) | 0.783-403.2 | nano-HPLC [60] | [49, 60] |
| Isorhamnetina (mg/100g) | 101.3 | | [49] |
| Rutina (mg/100g) | 482.7 | | |
| Luteolina (mg/100g) | 46.8 | | |
| Cianidina (mg/100g) | 0.20-2.21 | (GC-MS) [33] | [33] |
| Malvidina (mg/100g) | 0.027-0.37 | | |
| Flavonas y flavonoles (mg/g querce) | 0.029-13.6 | Nano-Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia - HPLC [60] | [8, 60, 62] |
| Flavononas (mg/g naring) | 0.022-27.48 | | [8, 60] |
| Ácido ferúlico (µg/g) | 149.10 | | [60] |
| Ácido o-cumárico (µg/g) | 36.69 | | |
| Ácido cinámico (µg/g) | 23.46 | | |
| Herpertina (µg/g) | 3.01 | | |
| Actividad antioxidante (mg Trolox/100g) | 3.64-7.32 | | [33] |
| DPPH EC ₅₀ (mg/ml) | 0.40-5.87 | Espectrofotometría [7] | [7, 40, 61] |
| FRAP (mM[Fe ³⁺] reducido) | 0.255-5.355 | | [8, 62] |
| TEAC (mM Trolox/g) | 0.08-6.838 | | [40, 62] |
| Luteína (µg/g) | 0.81-5.73 | HPLC [33] | [33] |
| Zeaxantina (µg/g) | 0.00-2.26 | | |
| β-caroteno (µg/g) | 12.41 | | |

La composición nutricional y bioactiva del polen apícola lo hace un producto interesante para su utilización como alimento en la dieta humana, ya que tiene todos los nutrientes necesarios para el organismo.

El contenido de proteínas, grasa y fibra es superior a lo encontrado para otros alimentos como la leche, carne y otros vegetales. Dentro de las proteínas es importante notar el contenido de aminoácidos que posee, resaltándose principalmente los esenciales (fenilalanina, leucina, valina, isoleucina, arginina, histidina, lisina, metionina, treonina y

triptófano), con contenidos máximos de 5416mg/100g para la leucina, siendo este el que reporta los valores más elevados; la calidad proteica de un alimento se mide por la composición de aminoácidos esenciales que posea, por tanto del polen tiene una calidad mejor que otros alimentos [23]. Igualmente algunos aminoácidos no esenciales como la prolina y el ácido glutámico son asociados a la calidad de los alimentos, y debido a que el polen tiene buenos contenidos (máximo 2581 y 178.8mg/100g, respectivamente), pueden utilizarse como parámetros para evaluar si el polen ha sido sometido a procesamiento [33].

Los lípidos se caracterizan principalmente por su contenido de ácidos grasos, destacándose los insaturados, por su beneficio a la salud. Al igual que los compuestos bioactivos que generan reducción en algunas enfermedades degenerativas, riesgos cardiovasculares, antioxidantes, entre otros [31]. Los ácidos grasos esenciales, al igual que los aminoácidos no pueden ser sintetizados y deben ingerirse en la dieta. Entre los ácidos grasos esenciales que tiene el polen se destacan el linolénico (1.61-53.07%), linoleico (4.88-34.65%) y oleico (1.95-27.81%), conocidos comúnmente como omega 3, 6 y 9 respectivamente. Entre los compuestos bioactivos importantes se encuentran los ácidos fenólicos, como el gálico, p-hidroxibenzoico, caféico, ferúlico y p-cumárico [31], encontrados principalmente en plantas y por tanto en el polen.

Los compuestos nutricionales y bioactivos del polen apícola lo hace un producto ideal para el consumo, dado que posee una composición nutricional excepcional por el origen vegetal, debido a que alimentos que provienen de plantas suelen ser ricos en carbohidratos, sin embargo son pobres en proteínas, minerales y algunas vitaminas [64], mientras que el polen también posee altos contenidos de dichos nutrientes.

En este sentido es reportado que el polen, en la forma actual en que es comercializado, no es fácilmente digerible por organismos monogástricos como los humanos o las abejas [65], por tal razón es sometido a procesos de transformación, como la fermentación, debido a que el polen fermentado o pan de abejas es más tolerado por el organismo humano y pueden aprovecharse mejor los nutrientes [19]. Como fue mencionado anteriormente la fermentación en fase sólida es el bioproceso utilizado en la colmena, el cual aprovecha los nutrientes del polen como fuente principal para los microorganismos.

1.3 Fermentación en Fase Sólida de Polen Apícola

La fermentación en fase sólida (FFS) es un proceso caracterizado por el desarrollo de poblaciones de microorganismos sobre un sustrato sólido, que tiene un contenido mínimo de agua libre. El sustrato actúa como fuente de nitrógeno y carbono, mientras que el agua necesaria por el microorganismo generalmente se encuentra formando un complejo con la matriz [11-12, 66]. Los primeros indicios de una fermentación en fase sólida fueron los ensilajes, donde el forraje para animales es dejado en condiciones con ambientes cerrados y temperaturas apropiadas para que fermentara y se conservara por más tiempo [14]. Este proceso se realiza para aprovechar los residuos y generar valor agregado [12]. Posteriormente fueron utilizadas bacterias ácido lácticas (BAL) para mejorar la conversión a ácido láctico, debido a que el forraje no posee las suficientes BAL para generar una fermentación eficiente, la cepa más utilizada fue *Lactobacillus plantarum* presentándose buenos resultados en cuanto a la acidificación respecto a otras bacterias utilizadas [14, 67].

Además de los ensilajes, este proceso se ha utilizado para la producción de enzimas, ácidos orgánicos, proteína unicelular, etanol, biopesticidas, bioherbicidas, antibióticos, compuestos aromáticos y de sabor y bioactivos como aflatoxinas, ocratoxinas, tetraciclinas y otros [7, 11-12, 31, 66, 68]. Se ha utilizado la fermentación en fase sólida para la obtención de compuestos fenólicos de las plantas e incrementar su contenido en alimentos, los cuales se producen como metabolitos secundarios cuando el crecimiento microbiano ha sido completado. En algunos medios líquidos se ha encontrado que los microorganismos generan los compuestos cuando les hace falta carbono, nitrógeno o fosfato [31].

Durante el bioproceso, es importante tener en cuenta factores como temperatura, pH, sustrato, actividad de agua, tamaño de partícula, producción de biomasa, etc., debido a que afectan el crecimiento y metabolismo del microorganismo [11, 69]. El tamaño de partícula no debe ser muy pequeño, debido a que la materia prima puede aglomerarse y evitar la respiración de los microorganismos, de igual forma tampoco debe ser muy

grande, porque no existirá la suficiente área superficial para que los microorganismos actúen [11, 67]. El sustrato debe proveer los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, de lo contrario debe realizarse la adición de los compuestos faltantes, además de realizar un pre-tratamiento, como reducción de tamaño, ajustar pH y actividad de agua, eliminación de contaminantes y degradación de compuestos para facilitar el aprovechamiento. Los sustratos más utilizados son salvado de trigo, granos de cereal, legumbres, madera, paja, caña de azúcar y residuos de la agroindustria [7, 11, 66-68]. La actividad de agua está relacionada con el metabolismo del microorganismo [70], ya que bajos valores disminuyen la tasa de crecimiento generando menos biomasa, igualmente es utilizada para evitar la contaminación del proceso por bacterias, debido a que estas crecen en sustratos con actividades de agua superiores a 0.90. El pH está directamente implicado en las actividades metabólicas y cada microorganismo tiene un rango óptimo específico para crecimiento y mantenimiento. La temperatura es uno de los factores más importantes, debido a que algunos productos como enzimas son sensibles a esta, además puede generar desnaturalización de proteínas, lo que conlleva a falta de nutrientes, aceleración o inhibición de la producción y muerte celular. El oxígeno debe tenerse en cuenta cuando los microorganismos son aeróbicos, y por ende debe asegurarse una continua adición mediante aireación y agitación del sustrato [11, 31, 64]. La biomasa es un parámetro fundamental en las fermentaciones en fase sólida, ya que es la que caracteriza el crecimiento microbiano [11].

Las ventajas de la fermentación en fase sólida son la mayor productividad, menores costos de inversión debido a que los principales sustratos son residuos de otra industria, menor volumen de aguas residuales y menor consumo energético, sin embargo tiene desventajas como la acumulación de calor, contaminación bacteriana, limitación de microorganismos que pueden crecer a bajos niveles de actividad de agua, dificultad en la determinación del crecimiento microbiano, purificación del producto y problemas para controlar la humedad del sustrato [11, 67].

1.3.1 Antecedentes de Fermentación en Polen Apícola

Teniendo en cuenta las ventajas mencionadas y la obtención de un producto de forma natural se han llevado a cabo investigaciones sobre el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola. Estas muestran que el proceso comienza con su almacenamiento en las celdas de la colmena, previamente adicionado con secreciones salivares y el ácido 10-hidroxi-2-decenoico [56]; el polen es cubierto con una capa de miel, que genera un ambiente anaeróbico a 34-36°C [56], y mediante la acción de bacterias y levaduras se inicia el proceso de fermentación [71]. El polen almacenado sufre cambios bioquímicos, lo cual lo convierte en un nuevo producto conocido como pan de abejas [7, 23]. Este bioproceso es el primer indicio de una fermentación en fase sólida del polen apícola.

De la misma forma son reportadas posibles rutas fermentativas efectuadas por los microorganismos en el polen apícola [6, 56, 71]. Ríos reporta dos rutas viables en la fermentación. En la primera ruta los microorganismos que realizan el proceso son *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Saccharomyces*. Las *Pseudomonas* generan el ambiente anaeróbico para los *Lactobacillus* y degradan la exina, mientras que los *Lactobacillus* realizan la fermentación ácido-láctica. En la segunda ruta las *Pseudomonas* consumen el oxígeno presente preparando el ambiente para la fermentación anaeróbica que realizan los *Lactobacillus* y luego desaparecen; seguidamente los *Lactobacillus* degradan algunos azúcares para producir ácido láctico y finalmente las *Saccharomyces* terminan la degradación de los azúcares restantes [6].

Gilliam reporta una ruta fermentativa que consiste de cuatro etapas: en la primera se da la formación de un grupo heterogéneo de bacterias que también incluye algunas levaduras; en la segunda etapa la especie *Streptococcus* utiliza los productos generados por las levaduras para reducir el pH del polen; en la tercera etapa la especie *Streptococcus* desaparece y se desarrollan *Lactobacillus*, que acidifican mejor; la cuarta fase consiste en la desaparición de las bacterias ácido lácticas por el alto contenido de acidez [71].

Loper ha reportado microorganismos como hongos y bacterias aeróbicas y ácido-lácticas. Las bacterias aeróbicas ayudan a liberar el contenido celular del polen. Seguidamente los *Lactobacillus* incrementan el contenido de ácido láctico hasta alcanzar un pH cercano a 4.0. y finalmente algunos hongos utilizan este ácido para obtener un pan de abejas pre-digerido [56].

De acuerdo a las rutas mencionadas y los microorganismos que las realizan se ha generado la inquietud sobre la posibilidad de replicar el proceso para aprovechar la calidad alimenticia del polen y transformarlo en un producto con una mejor disponibilidad de nutrientes, por tanto se han desarrollado estudios simulando las condiciones necesarias para realizar una fermentación en fase sólida de polen apícola [6-7, 16-17].

El primer reporte encontrado fue realizado por Vamanu en 2006 donde utilizó la cepa *Lactobacillus acidophilus* en sustratos con diferentes concentraciones de polen (con agua y sin agua) a diferentes condiciones de pH y temperatura, encontrando las ideales para inducir el proceso fermentativo a pH 4.5-6.5 y temperaturas de 30-42°C; el medio en el cual se desarrolló la cepa contenía sacarosa, maltosa, lactosa, fructosa, xilosa, rafinosa y otros. El sustrato óptimo para la fermentación es el que contiene polen y agua [18].

En el 2008 Vamanu utilizó cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y una mezcla de las dos en sustratos con diferentes concentraciones de polen, con el fin de obtener un producto con características probióticas, encontrando que a concentraciones mayores de polen la cepa de *Lactobacillus acidophilus* es la que presenta mayor viabilidad, mientras que a menores cantidades de polen lo ideal es tener una mezcla de las dos cepas [16-17].

Basándose en los reportes de Vamanu, en 2009 fue realizado un estudio en polen colombiano por Fuenmayor donde se utilizaron cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* y dos cepas comerciales, diferentes concentraciones de polen (adicionando agua y miel), diferentes cantidades de inóculo, un tratamiento térmico previo y la adición de enzimas, para encontrar cuáles parámetros realizaban una mejor fermentación. Las mejores condiciones fueron: cantidad de inóculo de 1×10^8 ufc/g de la

cepa *Lactobacillus acidophilus* en una mezcla polen agua 2:1 con un tratamiento térmico previo a 121°C por 15 minutos en autoclave y una incubación a 35°C. La adición de miel y enzimas no generó un cambio significativo en la fermentación [7].

Vamanu en el 2010 realizó un estudio con seis cepas diferentes de bacterias, cuatro del género *Lactobacillus* (*Lactococcus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* 1 y 2 y *Lactobacillus paracasei*) y dos de *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum* 1 y 2), adicionándole al sustrato prebióticos como inulina, rafinosa y lactulosa, con el fin de evaluar el efecto de estas sustancias sobre la viabilidad celular, la producción de ácido láctico y la capacidad antioxidante. Los que presentaron mejores resultados fueron la inulina y lactulosa [19].

1.3.2 Pan de abejas

El pan de abejas es el producto de la fermentación natural en fase sólida del polen apícola. Es efectuado mediante la adición de enzimas, secreciones salivares y miel, creando un ambiente anaeróbico en el cual las bacterias y levaduras realizan el bioproceso [6].

Las abejas realizan este proceso para obtener un alimento con mejor disponibilidad de nutrientes [7] porque consumir el polen fresco retrasa el crecimiento y la capacidad de producir las secreciones salivares que utilizan para la recolección de polen y fabricación de alimento [6, 23]. Además mejora el potencial de asimilación de los nutrientes en el organismo, dado que las enzimas transforman los compuestos grandes como polisacáridos y carbohidratos en compuestos de menor peso molecular que facilitan la digestión del pan de abejas. Así mismo aumenta la solubilidad de las proteínas entre 2.9-5.6% [6, 56, 71].

El pan de abejas tiene una composición y valor nutricional diferente al polen apícola y posee nuevos nutrientes como la vitamina K [56, 71]. La variación en el contenido de los nutrientes depende del origen botánico y el periodo vegetativo de la planta, entre otros [6].

Al inducir un proceso fermentativo se genera ácido-láctico, el cual evita la propagación de otros microorganismos, por tanto las propiedades antimicrobianas del pan de abejas son tres veces mayores a las del polen [6].

1.3.3 Características nutricionales y bioactivas del polen fermentado

El pan de abejas está compuesto mayormente por proteínas, algunos compuestos bioactivos, aminoácidos libres, ácidos grasos y azúcares [6]. Entre las proteínas se encuentran enzimas como amilasa, fosfatasa-ácida y alcalina y la enzima glucosa-oxidasa [6, 23, 71] y algunos aminoácidos como alanina, valina, leucina, prolina fenilalanina, entre otros [72]. Entre los ácidos grasos encontrados se tiene el linoléico, linoleico, octadecanoico y otros [72]. Los azúcares reportados son la sacarosa, maltosa, maltulosa, isomaltosa y turanosa [72]. Es importante notar que el contenido de azúcares reductores es mayor en el pan de abejas que en el polen [23, 71]

Entre los bioactivos encontrados están carotenoides (provitamina A) y vitaminas C, B, E y K [6, 71]. Se han encontrado compuestos con propiedades antioxidantes, algunos fenoles como ácido p-cumárico y kamferol y flavonoides como quercetina, naringenina, crisina y apigenina, aunque estos dos últimos se han encontrado a nivel de trazas [72-73]. En un estudio realizado en Lituania se han encontrado valores de inhibición de ciertos radicales (actividad antioxidante) con resultados de 64.2-94.0% para DPPH y 73.2-94.8% para ABTS⁺[73].

En la Tabla 1-6 se presenta la composición del pan de abejas:

Tabla 1-6: Composición nutricional y bioactiva de pan de abejas.

| Componente | Contenido | Métodos de cuantificación | Referencias |
|----------------------------------|-----------|--|-------------|
| Humedad (%) | 18.44 | Secado en horno [7] | [7] |
| Proteína (%) | 21.0 | Kjeldahl [7] | |
| Grasa (%) | 6.69 | Soxhlet [7] | |
| Fibra cruda (%) | 13.1 | Digestión ácido-básica [7] | |
| Cenizas (%) | 2.22 | Calcinación [7] | |
| Ca (mg/kg) | 920 | Espectrofotometría de Absorción Atómica [56] | [56] |
| Zn (mg/kg) | 93 | | |
| K (mg/kg) | 5850 | | |
| Mg (mg/kg) | 675 | | |
| DPPH EC ₅₀ (mg/mL) | 0.331 | Espectrofotometría [7] | [7] |
| Previtamina A (mg/100g) | 200-875 | | [6] |
| Vitamina E (Tocoferol) (mg/100g) | 170 | | |
| Vitamina C (mg/100g) | 6-200 | | |

1.3.4 Microbiota asociada al polen

El polen posee una microbiota natural dadas las condiciones a las que está expuesto, puede ser flora propia que varía de acuerdo al origen geográfico, botánico y humedad, o flora externa introducida por incorrecta manipulación, contaminación ambiental, procesamiento y comercialización, y la adición de enzimas y secreciones salivares utilizadas durante el proceso de recolección por la abeja [56, 74], además de factores en el proceso de almacenamiento y transformación.

Se han realizado estudios en polen de diferentes orígenes geográficos encontrándose diversidad de microorganismos. En pólenes colombianos se encontraron aerobios mesófilos, levaduras y mohos del género *Aspergillus* sp., coliformes, bacterias del género *Clostridium* sp. y *Staphylococcus* sp. en cantidades superiores a 2200 ufc/g [74]. Entre los microorganismos que se han encontrado es de importancia el *Clostridium perfringens* por su toxicidad [75]. En polen hondureño fresco y seco a 42°C se encontraron coliformes

totales, fecales, mohos filamentosos y levaduras. A destacar se encontró *Escherichia coli* y los patógenos como *Staphylococcus coagulasa* positiva, *Salmonella* y *Clostridium perfringens* [76]. En polen argentino se han encontrado aerobios totales, coliformes totales y fecales y varias especies de hongos productores de micotoxinas.

La flora microbiana que tiene el polen y la que puede ser adicionada por el ambiente y las abejas es un factor importante en la transformación del polen apícola a pan de abejas, ya que son los microorganismos los que llevan a cabo el proceso fermentativo [7].

1.3.5 Condiciones de proceso

Las condiciones del proceso de fermentación dependen del microorganismo a utilizar. Debido a que los principales encontrados en el bioproceso natural fueron bacterias ácido lácticas y levaduras, se hará énfasis en las condiciones de acuerdo a las necesidades de éstos.

Las bacterias son organismos unicelulares que pueden ser aerobias, anaerobias o anaerobias facultativas, tienen tres morfologías: esféricas (cocci), varilla (bacilli) y curvas (comma), forman grupos o cadenas y de acuerdo a la estructura de su pared celular se clasifican en Gram positivas o negativas [64]. La especie principal en la fermentación de polen apícola son las del género *Lactobacillus*, éstas son bacterias Gram positivas facultativas y anaeróbicas [77] y pueden ser homofermentativas o heterofermentativas. Se encuentran en plantas, frutas, vegetales, carne y heces [64]. Entre los *Lactobacillus* utilizados en alimentos como cultivos iniciadores en productos fermentados se encuentran el *Lactobacillus delbrueckii* sub. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus plantarum*, y como especies probióticas se usan *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* sub. *casei*. Algunas especies producen bacteriocinas, que son utilizadas como preservantes [64, 69].

Las levaduras son hongos que en casi todos los casos se presentan en estado unicelular durante todo su ciclo de vida. Es muy común encontrarlos en las hojas y flores de plantas ya que forman parte de la microbiota del ambiente [64]. De las levaduras, la más

conocida es la *Saccharomyces cerevisiae* que ha sido utilizada durante mucho tiempo en alimentos gracias a su capacidad de fermentar generando diferentes productos según las necesidades de la industria. En ausencia de oxígeno o altas concentraciones de glucosa, *S. cerevisiae* realiza una fermentación generando como productos alcohol y dióxido de carbono, igualmente se utiliza en panadería [64, 78].

Para el crecimiento de los microorganismos, las condiciones más importantes son la temperatura, el tiempo de incubación, la actividad de agua, el pH, los nutrientes y el oxígeno [11, 31, 64].

Actividad de agua: El crecimiento bacteriano es inhibido a a_w menores a 0.90 mientras que el de las levaduras es inhibido a $a_w < 0.85$, exceptuando las levaduras osmófilas que sobreviven a $a_w < 0.6$ [64, 67].

Temperatura: *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* son mesófilos, es decir crecen en temperaturas entre 30-40°C [69, 79-80]. Las levaduras crecen entre 25-30°C, pero esto también depende de la naturaleza de la levadura: mesófila, termófila o psicrófila.

pH: Las bacterias ácido lácticas necesitan pH entre 4.0-8.5 [64] teniendo un óptimo de crecimiento a pH 5.4-6.3 [67, 80]. El *Lactobacillus plantarum* predomina en fermentaciones a pH incluso inferiores a 4.0 y tiene una tolerancia mayor a pH bajos respecto a otras bacterias ácido lácticas. El crecimiento se detiene cuando el pH alcanza el rango de 4.6-4.8 [81]. Las levaduras tienen un pH óptimo de crecimiento entre 4.0-5.0, aunque tiene un rango entre 2.0-8.5 [11, 64].

Tiempo: En estudios realizados por Vamanu [17] se encontraron tiempos de incubación de 72 horas en fermentación de polen en fase sólida, sin embargo Fuenmayor [7] reporta que después de 24 horas empieza a existir un decrecimiento del número de bacterias.

Nutrientes: Los microorganismos necesitan carbono, hidrógeno, nitrógeno, minerales, agua y oxígeno si son aerobios, como fuente de energía y mantenimiento celular [67, 82]. Otros nutrientes necesarios pueden ser: Cu, Mn, Co, Mo, B, vitaminas, aminoácidos y

lípidos, entre otros [11, 31, 64, 80]. Los elementos principales son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre en cantidades de 45, 7, 33, 10 y 2.5% respectivamente [67]. El nitrógeno generalmente proviene de nitratos, urea, amoníaco y el presente en la materia prima [67]. Las fuentes de energía más utilizadas en fermentación son productos que contienen carbohidratos como glucosa, fructosa y almidón principalmente, aunque también se han utilizado sacarosa, lactosa, celulosa y rafinosa [11]. Las concentraciones elevadas de carbohidratos tienen un efecto negativo en el crecimiento bacteriano por el efecto osmótico [67]. Estos nutrientes son generales, pues dependen del microorganismo utilizado y su demanda, por ejemplo, los *Lactobacillus* necesitan aminoácidos, vitaminas y ácidos nucleicos [80] y el *Lactobacillus plantarum* en especial tiene un gran requerimiento de manganeso [81]. La exigencia en cuanto al requerimiento nutricional es máxima para las bacterias, seguida de las levaduras y los hongos [11, 31, 64].

Oxígeno: Las bacterias ácido lácticas son anaerobias facultativas, es decir, pueden pasar de vida anaerobia a aerobia, aunque principalmente son anaerobias [69, 80]. Las levaduras pueden crecer en presencia de oxígeno, ninguna es anaerobia estricta [64].

2. Capítulo 2: Condiciones de proceso y adecuación del polen apícola como materia prima para un proceso de fermentación en fase sólida.

2.1 Introducción

El polen apícola es un producto de la colmena que tiene una composición nutricional y bioactiva excepcional [5-6], por tanto actualmente es comercializado como alimento de consumo humano; igualmente es un sustrato apropiado para realizar procesos de fermentación en fase sólida, de forma similar al que ocurre en la formación de pan de abejas al interior de la colmena [6].

Con el fin de realizar la simulación del bioproceso natural se han realizado estudios donde se evalúan diferentes condiciones de sustrato y proceso, temperatura, tiempo de incubación y cantidad de inóculo [7, 16-17, 19]; encontrando que la calidad higiénica de la materia prima es un factor que influye en el desarrollo del proceso y las condiciones finales del producto. El polen apícola comercializado por los apicultores tiene una carga microbiana generada en el proceso de recolección por parte de las abejas, por la adición de secreciones salivares y el contacto de las abejas con el medio ambiente [56, 83], por tanto, procesos de limpieza para retirar las impurezas mayores [84] y el proceso de secado se han utilizado como métodos de conservación, debido a que la baja actividad de agua obtenida en el producto seco evita la proliferación microbiana y reacciones de deterioro [64, 67, 85].

Previamente a la fermentación se ha realizado un proceso de esterilización con el fin de inactivar enzimas y esporas de microorganismos, ya que la mayoría no sobreviven a altas temperaturas [79, 86]. Este proceso se realiza con el fin de evitar la competencia de

los microorganismos de interés por el sustrato [56, 83], sin embargo es importante tener en cuenta que el efecto combinado de la temperatura y el tiempo de exposición generan degradación de algunos compuestos, en ocasiones por el desarrollo de las reacciones de Maillard [87] y pérdida de compuestos como antioxidantes, compuestos volátiles y vitaminas [86].

Además de eliminar la carga microbiana inicial, es necesario realizar el escalamiento del proceso, partiendo de un inóculo pequeño de polen. Esta matriz tiene una excelente composición nutricional favoreciendo el crecimiento microbiano, igualmente tiene una capa de polisacáridos externa llamada exina, que se convierte en una protección natural que impide el aprovechamiento de todos los nutrientes [24-25, 29-30], es una morfología compleja que genera estrés en los microorganismos, por tanto se ha identificado la necesidad de realizar la preparación de un inóculo previo a su adición en el proceso de fermentación en fase sólida [7].

El objetivo de este capítulo fue establecer las condiciones de acondicionamiento en el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Materia Prima

- **Polen apícola húmedo y seco**

Originario de apiarios, ubicados en la zona de bosque alto-andino (2.800 y 3.200 msnm); almacenado en bolsas de poletileno y mantenido a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Las muestras de polen apícola seco fueron deshidratadas en un horno de secado con aire caliente a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 4 horas y se almacenó en frascos de vidrio a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) hasta su inclusión en el proceso.

- **Pan de abejas**

Los marcos donde se encuentra el pan de abejas (al interior de las celdas) se obtuvieron de apiarios, ubicados en la zona de bosque alto-andino (2.800 y 3.200 msnm); almacenado en bolsas de poletileno y mantenido a una temperatura ambiente hasta la extracción y almacenamiento a temperatura ambiente para los análisis microbiológicos y a $-20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ para los análisis fisicoquímicos.

- **Cepas de bacterias ácido-lácticas y levadura**

Se utilizaron cepas ATCC de bacterias ácido-lácticas y una levadura de la marca Kwik Stik™ (Ficha técnica en el Anexo A), activadas de acuerdo a las recomendaciones de la casa comercial (Ver Anexo B) y conservadas en crioperlas a una temperatura de $-20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
- *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

2.2.2 Operaciones de acondicionamiento

Previo al desarrollo de los ensayos de fermentación en fase sólida, el polen apícola fue sometido a un proceso de limpieza de impurezas macroscópicas mediante tamizado con una zaranda Tyler, utilizando un juego de tamices de 5, 7, 10, 12, 18, 30 y fondos [84]. Las fracciones seleccionadas para los ensayos fueron las de los tamices 10, 12 y 18; las otras fueron consideradas impurezas, de acuerdo a la metodología propuesta y reportada por Durán [88]. A continuación se sometió a un proceso de molienda y almacenado a temperatura ambiente hasta los ensayos.

▪ **Tratamientos térmicos**

Se realizan con el fin de eliminar la carga microbiana inicial del polen y así evitar competencia con los microorganismos que se van a utilizar en el proceso. De acuerdo a revisión bibliográfica se realizaron tratamientos en baño termostático a 70°Cx15min, 70°Cx30min, 80°Cx15min y 80°Cx30min y tratamientos térmicos a presión a 121°Cx15min, 115°Cx12min y 110°Cx36min [7, 89-91]. Los tratamientos térmicos a presión se realizaron en polen húmedo, seco y en las proporciones de polen-agua 2:1, 1:1 y 1:2 en una autoclave Tuttnauer. Se prepararon cuatro (4) frascos de 25g aproximadamente para cada una de las relaciones de polen-agua y polen.

Los tratamientos térmicos a bajas temperaturas (menores a 80°C) se realizaron en polen húmedo y dado que presentaron resultados deficientes en la prueba de esterilidad comercial, se decidió eliminarlos y realizar el diseño con los tratamientos térmicos con presión. El diseño utilizado fue un factorial 5*3 donde los factores son la condición de polen con 5 niveles (polen húmedo, seco y relaciones polen-agua 2:1, 1:1 y 1:2) y el tratamiento térmico con 3 niveles (121°Cx15min, 115°Cx12min y 110°Cx36min). El diseño experimental se presenta en la Tabla 2-1. En cada celda se presenta el número de réplicas que se realizaron.

Tabla 2-1: Número de ensayos del diseño experimental para evaluar los tratamientos térmicos sobre el tipo de sustrato.

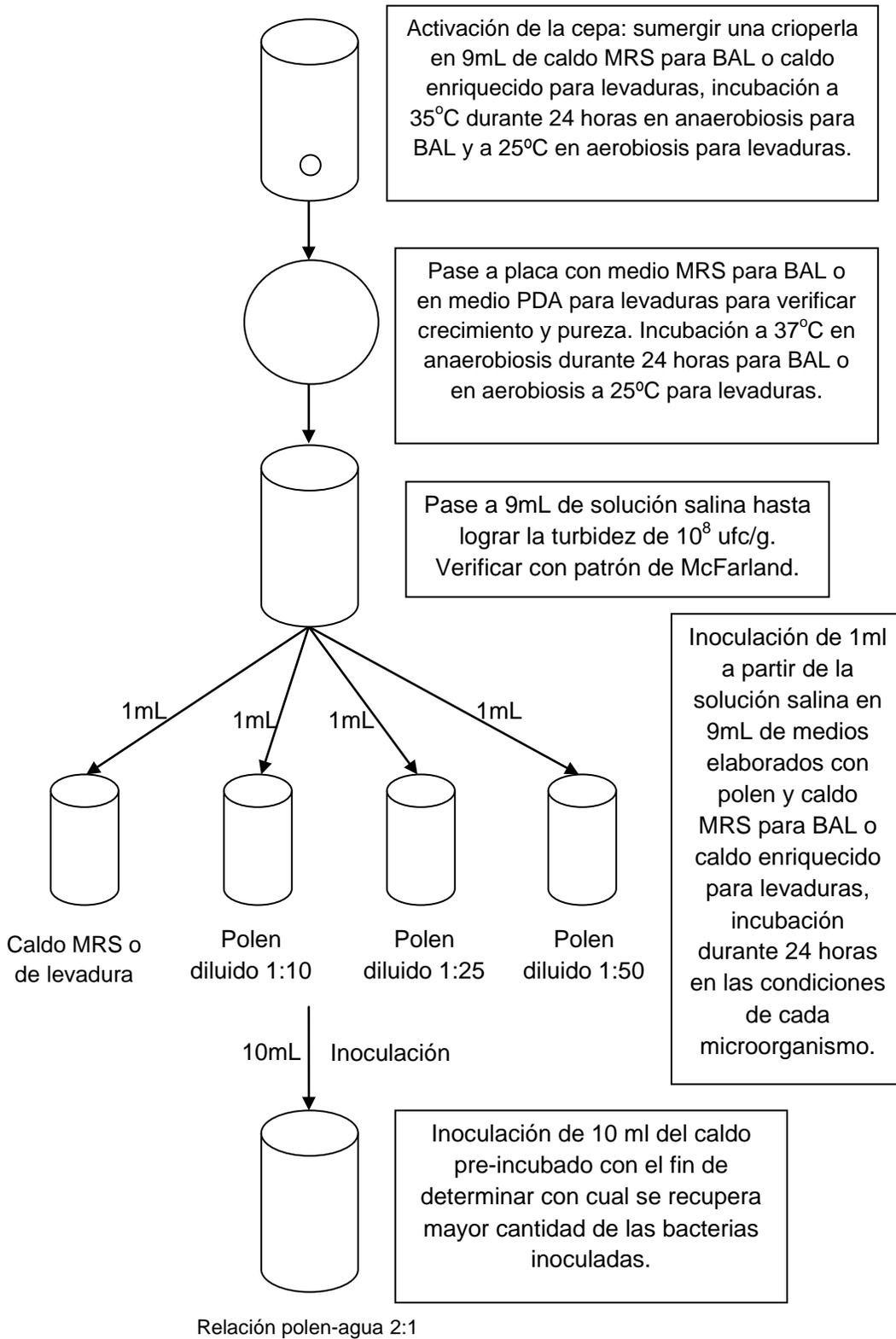
| Tratamiento Térmico | Tipo de sustrato | | | | |
|---------------------|------------------|-----------------------|-----|-----|------------|
| | Polen Húmedo | Relaciones Polen:Agua | | | Polen Seco |
| | | 2:1 | 1:1 | 1:2 | |
| 121°Cx15min | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 115°Cx12min | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 110°Cx36min | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

- **Estandarización de inóculo**

El polen apícola es una matriz compleja que puede generar estrés en los microorganismos, evitando su desarrollo, por tal razón es necesario realizar un pre-inóculo, con una pequeña cantidad de polen, para preparar a los microorganismos al sustrato.

Se realizaron ensayos preliminares de fermentación con la adición de distintas relaciones de polen-caldo utilizando polen fresco como sustrato, evidenciándose que a las 12 horas no hubo crecimiento microbiano, por tanto se realizó la estandarización en la relación polen-agua 2:1. Para esta se utilizaron las relaciones de polen-caldo nutritivo (1:10, 1:25 y 1:50) y un inóculo de 10^8 ufc/g [7]. En la Figura 2-1 se muestra el procedimiento realizado en la estandarización. El caldo utilizado para las bacterias ácido lácticas (BAL) fue el MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y para las levaduras se utilizó un caldo enriquecido con peptona, glucosa y extracto de levadura. El polen apícola utilizado para realizar el recuento de la viabilidad microbiana fue en la relación polen seco-agua destilada 2:1 por la viabilidad microbiana. Se agitó a 400 rpm hasta lograr completa homogenización y la mezcla se sometió al tratamiento en autoclave de 121°C durante 15 minutos. A continuación se adicionó el inóculo pre-incubado y con una espátula de acero inoxidable previamente esterilizada se realizó la homogenización y se distribuyó la mezcla en frascos de 25g.

Figura 2-1: Procedimiento de estandarización del inóculo.



El diseño experimental planteado fue un factorial completo 3*3, donde los factores son la cepa de microorganismo con los niveles *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *S. cerevisiae* y la relación del inóculo (polen:caldo nutritivo) con los niveles 1:10, 1:25 y 1:50. En la Tabla 2-2 se presenta el diseño a utilizar.

Tabla 2-2: Número de ensayos del diseño experimental para estandarizar el inóculo.

| Relación Polen:Caldo nutritivo | <i>L. plantarum</i> | <i>L. acidophilus</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
|---|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1:10 | 3 | 3 | 3 |
| 1:25 | 3 | 3 | 3 |
| 1:50 | 3 | 3 | 3 |

2.2.3 Métodos

- **Análisis fisicoquímicos, bioactivos, microbiológicos y microestructurales.**

Se realizó una caracterización fisicoquímica y bioactiva de la materia prima; durante el proceso se evaluaron los cambios de los parámetros bioactivos por influencia del tratamiento térmico y del proceso de fermentación. Así mismo, caracterizar el pan de abejas obtenido de las colmenas de *Apis mellifera*, se utilizó como parámetro de comparación del bioproceso natural al interior de la colmena y con el producto final de la fermentación en fase sólida. Los análisis microbiológicos de calidad caracterizaron el polen apícola. La prueba de esterilidad comercial fue efectuada para verificar la efectividad de los tratamientos térmicos. La actividad de agua se determinó en los distintos tratamientos y relaciones de polen y el análisis microestructural se realizó al tratamiento seleccionado. El recuento de células viables se utilizó para evaluar la estandarización del inóculo y la cinética de crecimiento.

pH y acidez libre: se realizó de acuerdo al método 920.92 de la AOAC con algunas modificaciones [92]. Se pesaron 2.5g de la muestra, se adicionaron 35mL de agua desionizada, desgasificada y se agitó a 400 rpm durante 30min. Después se filtró al vacío, realizando 3 lavados con 10mL de agua desionizada y transfiriéndolos

cuantitativamente al equipo de filtración, efectuando la titulación con NaOH 0.05N. La medición se realizó en un titulador automático Mettler Toledo T70 y las unidades en que se expresó el resultado fueron meq/kg.

Actividad de agua (a_w): determina la relación entre la presión de vapor del agua pura y la que existe en el polen apícola a la misma temperatura. Se realizó por medición directa utilizando el equipo FastLab [87].

Humedad: se realizó de acuerdo al método 925.10 de la AOAC con algunas modificaciones [92]. Se pesaron 5g y se someten a secado por 24 horas a 70°C en estufa con circulación de aire. Los resultados se determinan mediante gravimetría en un equipo UT6 marca Heraeus Instruments.

Proteína: se determinó por el método Kjeldahl según el método oficial 981.10 de la AOAC con algunas modificaciones [92] utilizado un factor de conversión de 6.25, en un equipo Kjeltex 8100 marca FOSS.

Grasa: se realizó de acuerdo a metodología Soxhlet según el método 945.39 de la AOAC con algunas modificaciones [92], en un equipo Ser 148 marca Velp Scientifica. Se pesaron 2g de muestra seca y se pusieron en contacto con éter de petróleo durante 4 horas, después de lo cual, se recuperó el solvente y se determinó la cantidad de grasa.

Cenizas: realizado de acuerdo al método 942.05 de la AOAC con algunas modificaciones [92], en un equipo marca Hotpack. Se pesaron 3g de la muestra, sometiéndolos a una pre-calcinación para eliminar materia orgánica, seguido de una calcinación a 600°C.

Extracto etanólico para determinar el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante: se pesó 1g de polen apícola molido y se adicionaron 30 ml de etanol al 96%. Se agitó a 400 rpm durante media hora, se almacenó en oscuridad durante 24 horas, se filtró en papel BOECO grado 3hw de 125 mm en balones de 100ml y se almacenó a -20°C \pm 3°C hasta la determinación analítica.

Contenido de fenoles totales: los compuestos fenólicos reducen el complejo fosfowolframato-fosfomolibdato del reactivo de Folin-Ciocalteu, en sales de molibdeno de color azul, cuantificables por espectrofotometría. Se utilizó la metodología descrita por Stratil [93] con algunas modificaciones. Se tomaron 500µL del extracto y se mezclaron con 500µL del reactivo de Folin Ciocalteu, 2 minutos después se agregaron 2mL de NaHCO₃ al 10%, se agitó la mezcla y se llevó a 50mL con agua destilada. Las muestras se almacenaron durante 2 horas en la oscuridad y posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 765nm en un espectrofotómetro marca THERMO utilizando agua destilada como blanco. La curva de calibración se realizó con ácido gálico y los resultados fueron expresados en mg ácido gálico/g polen.

Actividad antioxidante - TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity): la capacidad de los antioxidantes para atrapar el radical libre ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico, ABTS, genera una decoloración de dicho radical, que puede medirse mediante espectrofotometría. La absorbancia de la reacción es comparada con la obtenida por el estándar Trolox. Se utilizó la metodología descrita por Baltrušaitytė [73] con algunas modificaciones. Se realizaron las mediciones en un espectrofotómetro THERMO, se tomó la absorbancia de la solución de trabajo del radical ABTS (a reaccionar) en una celda plástica a una longitud de onda de 734nm, después se agregaron 10µL del extracto, se agitó y se midió nuevamente la absorbancia después de 6 minutos, frente a etanol como blanco. La curva de calibración se realizó con Trolox y los resultados fueron expresados en mM Trolox/g polen.

Actividad antioxidante - FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power): la capacidad de los antioxidantes para reducir el hierro obtenido de la reacción del TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazina) y el cloruro férrico (FeCl₃) genera un cambio de color de rojo a azul, medible mediante espectrofotometría. Se utilizó la metodología descrita por LeBlanc [8] con algunas modificaciones. En una celda plástica se adicionaron 735µL de agua destilada y 435µL del reactivo FRAP (relación 10:1:1 de tampón acetato:solución de FeCl₃:TPTZ). Después se agregaron 20µL del extracto, se agitó y se almacenó durante 30 minutos en la oscuridad. En el momento de realizar la medición se agitó la muestra nuevamente. La lectura se realizó a 593nm en un espectrofotómetro marca THERMO con la mezcla del reactivo de FRAP y el agua destilada como blanco. La curva de

calibración se realizó con Trolox y los resultados fueron expresados en mM Trolox/g polen.

Contenido de carotenoides totales: se pesó 200mg de las muestras de polen con tonalidades naranja o 50mg de las muestras con tonalidades amarilla en un tubo Falcon. Luego se realizaron lavados con 2ml de acetona, se agitó durante 1 minuto y se centrifugó a 9000rpm durante 5 minutos si es polen; para las muestras de pan de abejas la agitación va seguida de aplicación de ultrasonido durante 5 minutos. Posteriormente se filtró y transfirió cuantitativamente a balón de 25mL hasta desaparición de color en el extracto. Se llevó a volumen con acetona y se realizó la medición a 450nm en un espectrofotómetro marca THERMO o se almacenó en congelación hasta su análisis (máximo un día de almacenamiento). La curva de calibración se realizó con β -caroteno y los resultados fueron expresados en mg β -caroteno/kg polen [94-95].

Vitamina E: la saponificación y extracción con solventes orgánicos de la muestra permite separar la vitamina E de otros compuestos como pigmentos, que interfieren en la cuantificación. La metodología a seguir es la descrita por Pulido [57]. Para obtener el extracto las muestras se saponificaron con solución de KOH al 60%, seguidas de 4 extracciones consecutivas con 5mL hexano y agua. La fase orgánica es filtrada por sulfato de sodio anhidro para retirar exceso de agua y llevada a rotaevaporador a 40°C hasta sequedad. Se recuperaron 2mL con isopropanol. Las muestras son filtradas con membranas PTFE de 0.45 y 0.20 μ m y almacenadas en congelación en viales ámbar hasta su análisis. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: fase móvil metanol: acetonitrilo (60:40) con un flujo de 0.7 mL/min a una temperatura de 30°C, en un cromatógrafo marca JASCO (PU-980 Intelligent HPLC Plus) con una columna Betasil C₁₈, tamaño de partícula 5 μ m, 250 mm X 4.6 mm, conectada a un detector de fluorescencia marca JASCO (FP-920 Intelligent Fluorescence Detector). La curva de calibración se realizó con α -tocoferol y los resultados fueron expresados en μ g de α -tocoferol/g polen.

Microscopía electrónica de barrido (SEM): las muestras de polen fueron evaluadas en el Microscopio SEM FEI Quanta 200 en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional de Colombia después de realizar una metalización

con cátodo de oro. La metodología a seguir es la descrita por Fuenmayor [7], previamente utilizada por Human para observar granos de polen [39].

Análisis microbiológicos de calidad: se realizaron análisis de caracterización de la calidad microbiológica del polen húmedo y seco de acuerdo a metodologías establecidas por American Public Health Association [96].

Para los análisis microbiológicos se realizó una dilución de la muestra, pesando 11g de la mezcla y disolviéndola en 99ml de agua peptonada estéril al 0.1%. Las diluciones sucesivas, se realizaron tomando 1mL de la solución preparada y disolviéndolo en 9mL de agua peptonada estéril, tantas veces como fue necesario.

Aerobios mesófilos: se tomó 1mL de las tres primeras diluciones y se colocaron en cajas Petri estériles adicionando medio SPC (Standard Plate Count) hasta solidificación. Se llevó a incubadora a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Se realizó el conteo y se reporta como ufc/g polen (Unidades Formadoras de Colonias).

Mohos y levaduras: se adicionó 1mL de inóculo en cajas de Petri estériles, después servir aproximadamente 20mL de agar OGY (Oxytetracyclin Glucose Yeast) con oxitetraciclina (adicionar esta después de esterilizar el medio). Dejar solidificar e incubar a $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5-7 días. Realizar conteo de colonias a los 3, 4 y 5 días. Contar las cajas que después de 5 días presenten menos de 150 colonias. El reporte se realizó como ufc/g polen.

Coliformes totales y fecales: se tomó 1mL de las tres primeras diluciones realizadas y se adicionaron en 3 tubos con caldo Brilla, se llevaron a incubación a 35°C durante 48 horas. Se registraron los tubos que presentaron turbidez o producción de gas y se realizó una confirmación mediante siembra con asa en medio EMB (Eosin Methylene Blue) y en caldo Brilla. Su incubación a $35^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Se reporta como NMP (Número Más Probable).

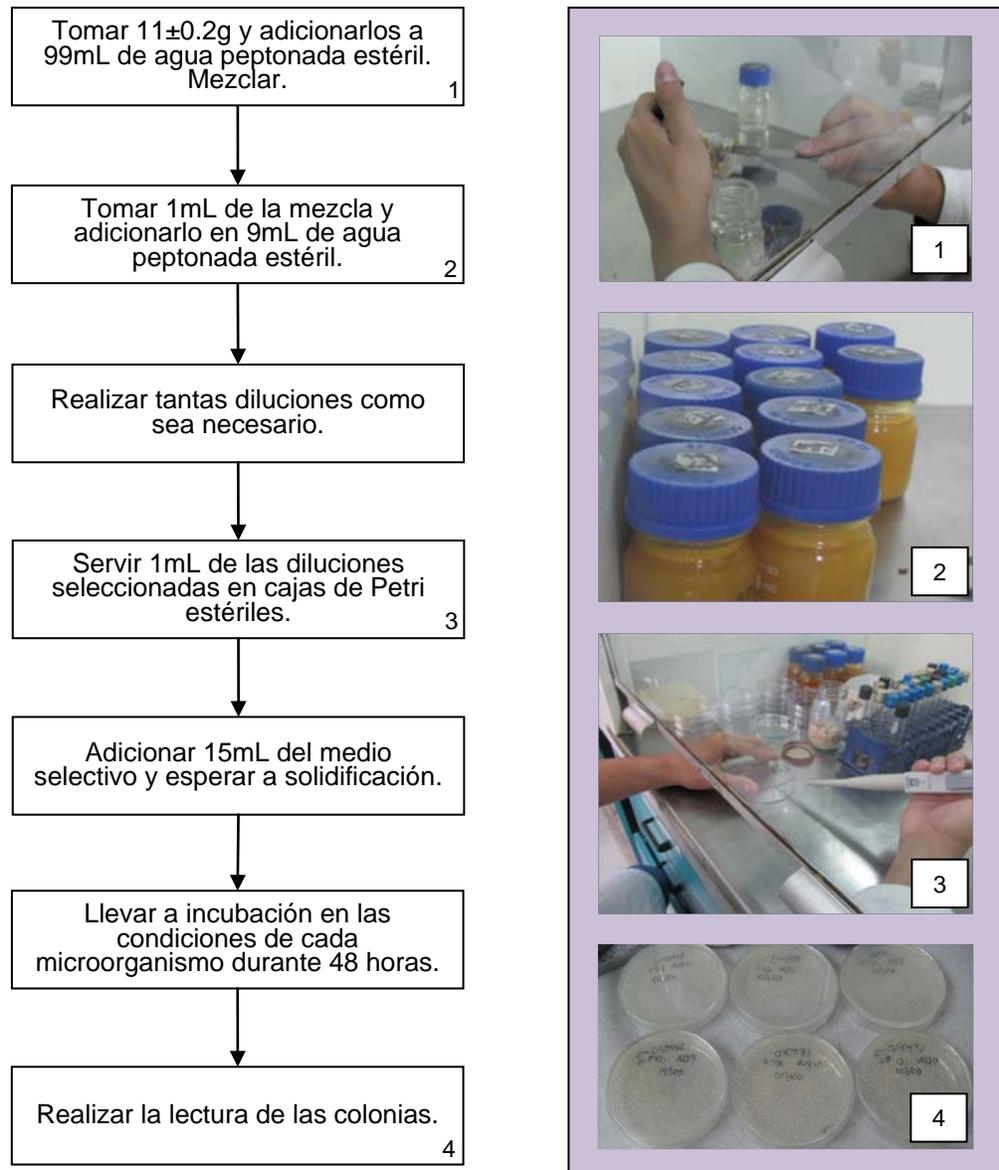
Staphylococcus aureus: se tomó 0.1mL de las tres primeras diluciones realizadas y se adicionaron al medio BP (Baird Parker), se extendieron con rastrillo de vidrio y se

incubaron a 35°C durante 48 horas. Las posibles colonias se llevaron a 5mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion). Luego se mezclaron 0.3mL del caldo con 0.3mL de plasma de conejo para verificar la producción de coagulasa. Después se llevó a incubación a 35°C±1°C durante 24 horas. Se reporta como ufc/g polen.

Salmonella: se realizó un enriquecimiento en 225mL de caldo lactosado. Del cultivo enriquecido selectivo se adicionó 1 mL en 10 mL de caldo selenito y caldo tetracionato y se incubaron a una temperatura de 43°C ± 0.2°C durante 24 horas. A partir de cada uno de los cultivos obtenidos del enriquecimiento selectivo se realizó una siembra por agotamiento en el agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) y agar hektoen y se incubaron las cajas a una temperatura de 35°C ± 2°C durante 24 – 48 horas. En caso de que se presentaran las colonias típicas de *Salmonella* se identificarían a través de pruebas bioquímicas.

- **Esterilidad comercial:** realizada de acuerdo a la Norma Técnica Colombiana NTC 4433 y al INVIMA. De los cuatro frascos provenientes del tratamiento térmico se utilizaron tres y se llevaron a incubación a 37°C±1°C y 55°C±2°C durante 10 días. Al finalizar el periodo de incubación se pesaron 2g de cada una de las muestras en cada uno de 6 tubos con 10ml de caldo BHI, de los cuales 3 se incubaron en aerobiosis y 3 en anaerobiosis en las mismas condiciones a las que fueron incubados inicialmente (37°C±1°C y 55°C±2°C). Después de 72 horas se realizaron láminas, que se dividen en secciones y se realiza un conteo de células bacterianas en cada una [97].
- **Recuento de bacterias ácido lácticas y levaduras:** se tomó 1 mL de las diluciones realizadas y se sirvieron en cajas de Petri estériles, posteriormente se adicionó medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) para las bacterias ácido lácticas y PDA (Potato Dextrose Agar) para las levaduras. Al solidificar se llevó a incubación a 37°C±1°C en anaerobiosis para las bacterias y a 25°C±1°C en aerobiosis para las levaduras durante 48 horas. Se realiza el conteo y se reporta como ufc/g polen (Ver Figura 2-2).

Figura 2-2: Procedimiento realizado para el recuento de microorganismos.



2.2.4 Estadística

La caracterización fisicoquímica y bioactiva se analizó mediante un análisis de estadística descriptiva. Para la caracterización microbiológica y la selección del inóculo a usar se

utilizó un análisis de varianza – ANOVA y la prueba de Tukey como método de comparaciones múltiples empleando un nivel de significancia del 95%, mediante el uso del Software Matlab ®.

2.3 Resultados y Discusión

2.3.1 Caracterización fisicoquímica, bioactiva y microbiológica del polen apícola

Los resultados de la caracterización fisicoquímica y bioactiva se presentan en la Tabla 2-3:

Tabla 2-3: Caracterización fisicoquímica y bioactiva del polen apícola inicial y el pan de abejas*.

| Características fisicoquímicas y bioactivas | Polen húmedo | Pan de abejas |
|--|---------------------|----------------------|
| Humedad (%) | 18.27±2.35 | 15.87±1.83 |
| a_w | 0.70±0.03 | 0.69±0.03 |
| pH | 4.03±0.30 | 3.91±0.07 |
| Acidez (meq/kg) | 260.30±18.68 | 267.39±37.91 |
| TEAC (mM Trolox/g) | 0.041±0.002 | 0.061±0.001 |
| FRAP (mM Trolox/g) | 0.052±0.004 | 0.048±0.005 |
| Fenoles totales (mg ácido gálico/g polen) | 16.28±2.21 | 8.70±1.00 |
| Carotenoides (mg β-caroteno/kg polen) | 2149±122 | 127±32 |
| Vitamina E (μg α-tocoferol/g polen) | 119±12 | - |

*Resultados en base seca. n= 20 para polen apícola y n=5 para pan de abejas.

Observando la tabla anterior y comparándola con las Tablas 1-4 y 1-5 (composición bioactiva del polen apícola), se puede ver que todos los parámetros analizados, excepto el contenido de carotenoides totales están dentro del rango reportado por la bibliografía. El contenido de carotenoides totales expresado como β-caroteno encontrado en el polen apícola presenta un contenido muy superior (aproximadamente 10 veces) comparado

con valores reportados en otras latitudes, generado posiblemente por su origen botánico y geográfico [6, 20, 33-34].

El contenido de humedad entre el polen húmedo y el pan de abejas presenta diferencias, ocasionadas por el proceso de obtención de pan de abejas, debido a que este es almacenado a 34-36°C, lo que puede ocasionar la pérdida de agua [56]; sin embargo los valores de actividad de agua son muy similares.

El contenido de proteína observado fue $24.90\% \pm 1.85$ y $23.93\% \pm 1.26$ para polen húmedo y pan de abejas, respectivamente. Igualmente el contenido de cenizas fue de $2.39\% \pm 0.29$ y $2.49\% \pm 0.17$ para polen húmedo y pan de abejas. Se aprecia que no hay gran diferencia en la composición del polen y el pan de abejas, lo que indica que el proceso fermentativo no altera la composición de dichos nutrientes.

El contenido de grasa ($5.78\% \pm 0.87$ y $1.61\% \pm 0.79$) presenta un descenso considerable al efectuarse la conversión de polen a pan de abejas (aproximadamente el 70%), debido posiblemente a pérdida en los procesos de transformación. Igualmente se ha reportado que los microorganismos necesitan consumir grasa, aunque en menor cantidad respecto a compuestos como carbohidratos, nitrógeno y azufre [67]. Otro factor de pérdida de este nutriente puede ser el proceso de extracción, debido a que es un proceso manual y de forma individual en cada celda, lo que puede resultar en pérdidas de algunos nutrientes.

Respecto a los valores encontrados para pH y acidez se observa la correlación inversa de ambos parámetros. El aumento de acidez en el pan de abejas está relacionado con la fermentación realizada: muchos autores mencionan que dicho proceso es realizado por bacterias que producen principalmente ácido láctico, por tanto se ha considerado el proceso como una fermentación ácido-láctica y el producto final presenta las características mencionadas [6, 56, 71]. La leve diferencia entre la acidez del polen y el pan de abejas puede ser ocasionada por las bacterias provenientes del ambiente y las secreciones de las abejas en la recolección de polen [56, 83]; a pesar de que el pan de abejas tiene un ambiente propicio para la fermentación al interior de la colmena, la actividad de agua del polen, la temperatura ambiental y las condiciones de

almacenamiento pueden promover la fermentación, por ende la similitud de la acidez en la materia prima y el producto fermentado.

Las diferencias observadas en la actividad antioxidante pueden ser ocasionadas por los cambios bioquímicos que sufre el polen al transformarse en pan de abejas. El descenso observado en la determinación por FRAP está relacionado con compuestos lipofílicos, por tanto la disminución en el contenido de carotenoides (β -caroteno) en el pan de abejas afecta considerablemente su contenido, a pesar del contenido de vitamina K, también con características lipofílicas [71]. Las diferencias en la determinación por TEAC puede estar ocasionado por compuestos como crisina y apigenina, flavonoides solubles en agua y vitamina K, debido a que la metodología permite la determinación de compuestos tanto lipofílicos como hidrofílicos [73]; a pesar de la disminución del contenido de polifenoles (ácido gálico); encontrándose en el pan de abejas ácido p-cumárico y kamferol [72-73], mientras que en el polen además de los anteriores se han reportado ácido ferúlico y o-cumárico [60].

Al realizar la comparación del polen inicial y el pan de abejas con el contenido de los distintos compuestos en otros orígenes geográficos se obtienen diferencias apreciables en carotenoides totales y la actividad antioxidante (Tabla 2-4).

Tabla 2-4: Contenido de componentes bioactivos en polen apícola de diferentes orígenes.

| | Vitamina E (mg α - tocoferol /kg) | Carotenoides (mg β - caroteno /kg) | Polifenoles (mg GAE /g) | FRAP ($[\text{Fe}^{3+}]_{\text{mM}}$ reducido) | TEAC (mM Trolox/g) |
|---------------------------------|--|--|----------------------------|--|-----------------------|
| Campos [5] | 40-320 | 10-200 | | | |
| Bogdanov [49]- Brasil | 92 | | | | |
| Pulido [98] - Colombia | 39 - 116 | | | | |
| ICTA [40] - Colombia | 869 | | 10.24-13.24 | | 0.08-0.11 |
| Leja [99] - Cracovia | | | 3.8-23.07 | | |
| Morais [100] | | | 10.5-16.8 | | |
| LeBlanc [8] - USA | | | 15.91-34.85 | 0.93-3.96 | |
| Marghitas [62] - Rumania | | | 4.4 - 15.2 | 0.255 - 5.355 | 0.546 - 6.838 |
| Dominguez [33] - España | | 12.41 | | | |
| Xu [101] - China | | 271.6 | | | |
| Shulte [102] - Alemania | | 8.78 | | | |

Respecto al contenido de carotenoides totales, el polen apícola inicial presenta contenidos mayores respecto al polen chino (271.6mg/kg) [101], español (12.41 mg/kg) y alemán (8.78 mg/kg) [33]-[102]. Igualmente supera el rango que reporta el polen brasileño (10-200 mg/kg) [5].

El contenido de fenoles totales es mayor al reportado por Marguitas [62] y Morais [100] y estudios realizados en el ICTA [40], también se encuentra en el rango descrito por LeBlanc [8] y Leja [99]. Altos niveles de compuestos fenólicos suelen estar relacionados con una alta actividad antioxidante, sin embargo Leja [99] encontró que está relación no siempre es correcta, resultados acordes con los obtenidos en el presente trabajo, dado que la actividad antioxidante es menor a lo reportado por los autores, mientras que el contenido de fenoles totales es alto.

Los resultados de las pruebas microbiológicas de calidad se muestran en la Tabla 2-5:

Tabla 2-5: Contenido microbiológico del polen húmedo y seco– apiario Los Cerezos.

| Polen | Aerobios mesófilos ufc/g | Mohos y levaduras ufc/g | Coliformes totales NMP | Coliformes fecales NMP | Recuento <i>S. aureus</i> ufc/g | Presencia <i>Salmonella</i> sp. |
|---------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Húmedo | $7,9 \times 10^5$ | $2,4 \times 10^5$ | 43 | <3 | <10 | Ausencia |
| Seco | $6,0 \times 10^3$ | $3,8 \times 10^4$ | 9 | <3 | <10 | Ausencia |

De acuerdo a un estudio realizado en el 2006 [83] en la Universidad Nacional de Colombia se encontraron diferentes tipos de bacterias y hongos en el tracto digestivo de las abejas, lo cual indica que parte del contenido microbiológico presente en el polen es aportado por las abejas en el proceso de recolección, donde ellas le adicionan secreciones salivares para su transporte a la colmena [56]. Igualmente microorganismos como hongos y coliformes totales se encuentran en el ambiente circundante a las colmenas y las abejas incluyen durante el proceso de pecoreo [83]: suelo, plantas y sitios con actividades como ganadería, por tanto el polen presenta recuentos de dichos microorganismos. Es importante notar la ausencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* o *Staphylococcus aureus*, lo cual permite el consumo teniendo en cuenta los límites permitidos para la comercialización como alimento de consumo directo.

Actualmente, en Colombia no se cuenta con estándares de calidad del polen. Por lo tanto en la Tabla 2-6 se presentan los límites microbiológicos establecidos por normatividad internacional:

Tabla 2-6: Límites microbiológicos establecidos para el polen apícola.

| Microorganismo | Cuba [6] | Argentina [7, 36] | México [7, 36] | El Salvador [36] | Brasil [36] | Unión Europea [5] |
|---|----------|-------------------|----------------|------------------|-------------|-------------------|
| Aerobios (ufc/g) | 10.000 | | 10.000 | | | <10.000 |
| Coliformes (NMP/g) | Ausencia | Ausencia | Ausencia | Ausencia | Ausencia | |
| <i>E. coli</i> (Presencia/g) | Ausencia | | Ausencia | | | Ausencia |
| <i>Salmonella</i> (Presencia/25g) | Ausencia | Ausencia | Ausencia | | | Ausencia |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (Presencia/g) | Ausencia | | Ausencia | | | Ausencia |
| Levaduras y mohos (ufc/g) | 300 | 100 | 300 | 300 | 100 | <50.000 |

Comparando los resultados obtenidos con los límites microbiológicos de otros países (Tabla 2-6) se observa que el polen apícola utilizado en los ensayos cumple con los estándares para *Salmonella* en polen húmedo y seco, al igual que en mohos y levaduras para el polen seco (norma de la Unión Europea), mientras que en los otros parámetros se encuentra por encima de los límites permitidos, lo que indica que deben mejorarse las Buenas Prácticas Apícolas (BPA) en el proceso de recolección del polen por parte de los apicultores y en el proceso de poscosecha y beneficio (tamizado, secado y almacenamiento).

Analizando la Tabla 2-5 se observa una diferencia considerable entre el contenido de aerobios mesófilos, mohos y levaduras y coliformes totales entre el polen húmedo y seco, ocasionado por las condiciones de manejo y almacenamiento de la materia prima. El mayor crecimiento se presenta en el polen húmedo, debido a la cantidad de agua libre que permite el desarrollo microbiano, mientras que el polen seco, al tener una actividad de agua baja (~ 0.4) evita el crecimiento, la mayoría de microorganismos no pueden sobrevivir en a_w menores a 0.7 [64, 67]. Realizar la deshidratación permite conservar el polen durante un tiempo prolongado, evitando la proliferación de microorganismos, sin embargo para efectuar procesos de fermentación en fase sólida es necesario adecuar el polen para que la microbiota natural no entre en competencia con los microorganismos de interés utilizados en el bioproceso, además obtener una actividad de agua superior a

0.7 es fundamental para el desarrollo de los microorganismos, por tal razón se evaluó el efecto de la adición de agua en el sustrato.

2.3.2 Condiciones de proceso para la fermentación en fase sólida de polen apícola

Los resultados de la prueba de esterilidad comercial y actividad de agua en los distintos tratamiento térmicos se muestran a continuación:

Tabla 2-7: Esterilidad comercial y a_w de polen apícola en los diferentes tratamientos térmicos.

| Sustrato | | Tratamiento Térmicos | | | | | |
|------------------------------|------------|----------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|
| | | 121°C - 15min | | 115°C - 12min | | 110°C - 36min | |
| | | Esterilidad | a_w | Esterilidad | a_w | Esterilidad | a_w |
| Polen Húmedo | | Satisfactorio | 0.758 | Satisfactorio | 0.720 | No Satisfactorio | 0.721 |
| Relaciones Polen:Agua | 2:1 | Satisfactorio | 0.878 | Satisfactorio | 0.886 | No Satisfactorio | 0.887 |
| | 1:1 | Satisfactorio | 0.920 | Satisfactorio | 0.942 | No Satisfactorio | 0.951 |
| | 1:2 | Satisfactorio | 0.966 | No Satisfactorio | 0.963 | No Satisfactorio | 0.981 |
| Polen Seco | | Satisfactorio | 0.403 | No Satisfactorio | 0.459 | No Satisfactorio | 0.402 |

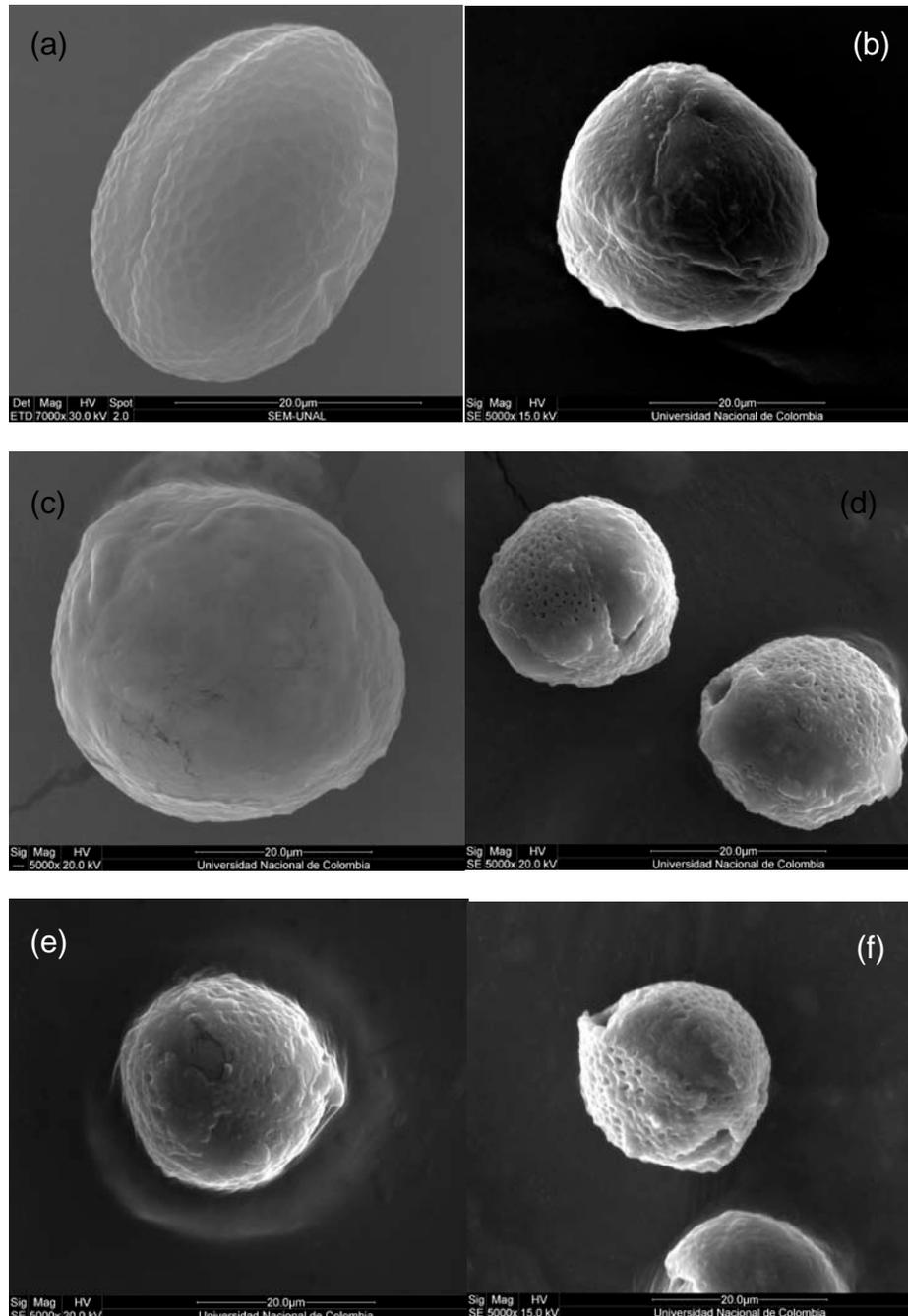
Se observó que los tratamientos térmicos a temperaturas iguales o menores a 80°C no lograron reducir la carga microbiana, resultados acordes con lo reportado por Fuenmayor [7], quien realizó tratamientos con calor seco en polen y encontró que no hay una reducción de la carga microbiana.

El tratamiento de 121°Cx15min fue el que reportó pruebas satisfactorias en todas las relaciones de polen-agua, es decir, no hay crecimiento de microorganismos, ni aerobios ni anaerobios, resultados acordes con los reportados por Fuenmayor en 2009 [7].

En la Figura 2-3 se presentan las micrografías del polen antes y después de la esterilización y en las distintas relaciones de polen-agua.

Figura 2-3: Micrografías con un aumento de 5000x de la estructura del grano de polen apícola.

En (a) polen húmedo sin TT, (b) polen seco sin TT, (c) polen húmedo tratado a 121°Cx15min, (d) 2:1 tratado a 121°Cx15min, (e) 1:1 tratado a 121°Cx15min y (f) 1:2 tratado a 121°Cx15min.



Se puede observar como el polen húmedo sin la esterilización (a) tiene bien definida su estructura mientras que el polen seco (b) y el sometido al tratamiento térmico (c-f) presenta cambios en la capa externa (pérdida de porosidad) o ruptura de la misma. En las micrografías (c-e) se puede ver el cambio de la capa externa, mientras que en el (f) se observa como la capa externa se ha abierto para exponer el contenido interno del grano de polen, debido posiblemente al mayor contenido de agua en la mezcla, el calor actúa más fácilmente sobre la estructura, generando los cambios observados. Es importante notar que la estructura va presentando apertura de la exina a medida que la adición de agua es mayor y que esto afecta igualmente el crecimiento microbiano: Laroche ha reportado estudios donde bajas actividades de agua generan una mayor resistencia a la destrucción de los microorganismos *S. cerevisiae* y *L. plantarum*, especialmente en el rango de actividad de agua entre 0.2 y 0.5, valores acordes con la actividad de agua reportada para el polen seco. El agua está en contacto con las proteínas de las células y al aplicar temperatura las moléculas de agua empiezan a vibrar y afectan la estructura tridimensional de las proteínas llevando a su desnaturalización. Al existir una menor cantidad de agua no existe tanta vibración y la estructura celular se mantiene [87]. Igualmente Ray reporta que a mayor actividad de agua los microorganismos son más susceptibles al daño por calor [64], por tanto el polen seco (con baja a_w) presenta mayor resistencia a la destrucción microbiana.

En el tratamiento de 115°Cx12min, la relación polen: agua 1:2 y el polen seco presentaron resultados no satisfactorios en la prueba de esterilidad comercial a pesar que en las otras relaciones la prueba fue satisfactoria, esto puede ser ocasionado por contaminación en el proceso de secado, en el horno, las mallas, los tamices, la manipulación o el contenido de agua en la matriz. Otro factor de resistencia es la composición de la matriz alimenticia, de acuerdo a Ray [64] a mayor cantidad de carbohidratos, proteínas y lípidos hay más protección para los microorganismos contra los daños por el calor, por ende el polen seco presenta un resultado no satisfactorio en la prueba de esterilidad comercial, debido a que su contenido nutricional no ha sido disminuido por la adición de agua, tal como ocurre en las relaciones utilizadas.

De acuerdo a Montville [91] al disminuir la temperatura de esterilización y aumentar el tiempo se logra el mismo efecto que al tener una alta temperatura con un menor tiempo

de exposición, sin embargo el tratamiento a 110°Cx36min no resultó igual de efectivo que el realizado a 121°Cx15min o 115°Cx12min, lo que indica que al disminuir la temperatura, el tratamiento no es eficiente en la destrucción bacteriana, a pesar de aumentar el tiempo de exposición.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el tratamiento a 121°C durante 15 minutos será el utilizado para acondicionar el polen apícola para el proceso de fermentación en fase sólida, debido a que presentó el mejor desempeño en la eliminación de la carga microbiana inicial. De acuerdo al análisis de microscopía electrónica de barrido se demuestra que los procesos térmicos generan cambios en la estructura, tal como lo mencionan Human, Fuenmayor y Domínguez, quienes utilizaron la técnica para evaluar cambios en la estructura de polen fresco y almacenado [39], a lo largo de procesos de fermentación [7] y procesos como saponificación, ozonólisis y acidólisis [29].

- **Estandarización del inóculo**

De acuerdo a pruebas preliminares, adicionar directamente el inóculo al polen genera una baja producción de biomasa, lo cual lleva a una pobre fermentación, debido posiblemente a que un medio tan complejo genera estrés en los microorganismos o a la exina [6]. Esta última se constituye por diversas sustancias orgánicas e inorgánicas, entre las que se encuentra la esporopolenina, polímero que le da la resistencia al polen a procesos de degradación física, biológica, acetólisis y tratamientos con ácidos y base fuertes [24-25, 29-30] lo cual evita la acción de los microorganismos sobre el polen. A pesar de que los tratamientos térmicos con presión lograron efectuar cambios en la exina (Figura 2-3), no fueron suficientes para que los microorganismos tuvieran un ambiente óptimo para su desarrollo, lo que sugiere que al interior de la colmena hay un proceso adicional que favorece el crecimiento microbiano. Por tanto es necesario hacer un escalado previo de la fermentación, es decir, empezar con un inóculo pequeño de polen, con el fin de que los microorganismos se adapten mejor al sustrato y puedan llevar a cabo el proceso fermentativo.

En la Tabla 2-8 se presenta el análisis de varianza para las distintas relaciones de polen-caldo en las horas de máxima producción de biomasa, encontrando que no hay

diferencias estadísticamente significativas entre las relaciones de polen-caldo ($p > 0.05$), por tanto se seleccionó la relación 1:10, debido a que es la más práctica al momento de realizar los experimentos.

Tabla 2-8: Recuentos de microorganismos en las últimas horas del proceso de fermentación en fase sólida.

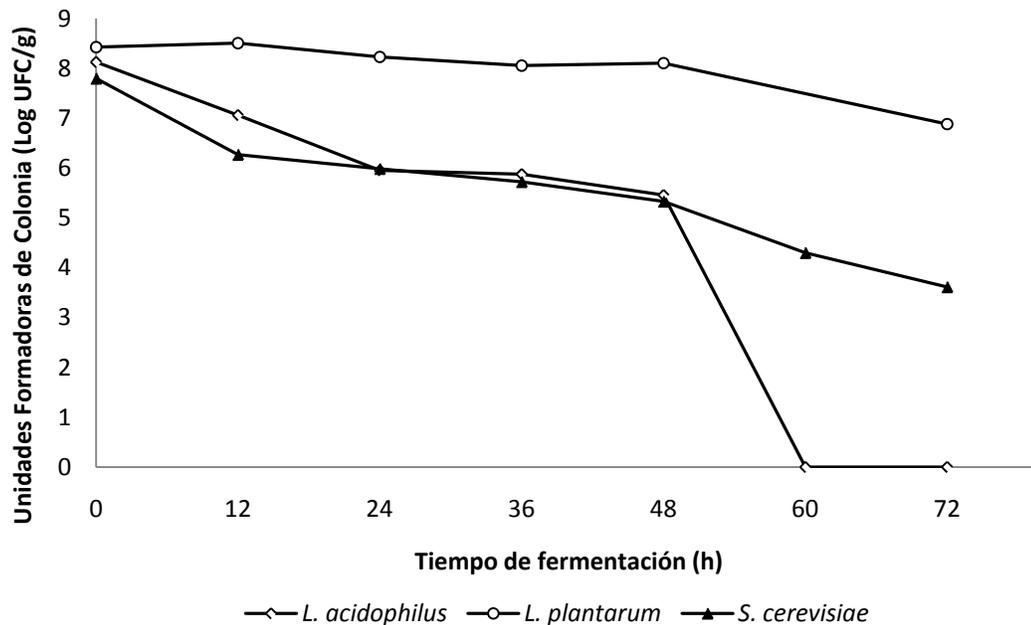
| Sustrato | Cepa (ufc/g) | | | | | |
|----------------------|----------------------|-------------|-----------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | <i>S. cerevisiae</i> | | <i>L. acidophilus</i> | | <i>L. plantarum</i> | |
| Relación Polen:Caldo | Hora 36 | Hora 48 | Hora 36 | Hora 48 | Hora 48 | Hora 72 |
| 1:10 | 6.12±0.44 a | 5.44±0.45 a | 5.93±0.32 a | 5.65±0.62 a | 8.11±0.09 a | 6.66±0.50 a |
| 1:25 | 5.97±0.67 a | 4.85±0.03 a | 6.05±0.43 a | 6.03±0.19 a | 8.14±0.32 a | 6.73±0.40 a |
| 1:50 | 5.49±0.22 a | 5.11±0.11 a | 6.38±0.05 a | 6.30±0.67 a | 7.99±0.11 a | 6.70±0.50 a |

Letras distintas en una misma columna para cada tratamiento indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%.

Se puede observar la diferencia en la producción de biomasa entre las cepas del género *Lactobacillus*, debido a la ruta fermentativa que siguen. El *L. acidophilus* es homofermentativo obligado, es decir, fermenta hexosas exclusivamente a ácido láctico, mientras que *L. plantarum* es heterofermentativo facultativo [80] y puede fermentar hexosas a varios productos así como pentosas a ácido láctico y acético [103]; la composición del polen le genera un mayor rango de sustancias para obtener la energía necesaria para su crecimiento, dado que el polen posee diversos carbohidratos, el *L. plantarum* tiene mayores posibilidades de nutrientes. Igualmente el *L. plantarum* tiene una mayor tolerancia a pH menores, lo que le da la posibilidad de continuar con el proceso fermentativo, aun cuando el *L. acidophilus* ha desaparecido [64, 69]. Respecto a *S. cerevisiae* el descenso observado puede estar ocasionado por el agotamiento del sustrato, dada la cantidad de glucosa que posee el polen (ver Tabla 1-1).

A continuación se presentan los resultados de las curvas de crecimiento para las diferentes cepas de microorganismos en la relación de polen-caldo 1:10.

Figura 2-4: Curvas de población microbiana para las cepas de microorganismos en la relación de polen-caldo 1:10.



Observando la Figura 2-4 la cepa de *L. acidophilus* presenta recuentos hasta la hora 48, después su conteo desciende hasta desaparecer. La cepa de *L. plantarum* presentan recuentos de aproximadamente 10^8 ufc/g hasta la hora 48, seguido de un descenso hasta 10^7 en la hora 72, que se mantiene hasta la hora 120. La cepa de *S. cerevisiae* presenta un descenso gradual en la población hasta aproximadamente 10^4 ufc/g en el último punto evaluado.

Analizando la Figura 2-4 es posible concluir que la cepa de *L. plantarum* es la cepa más adecuada para la obtención de un producto con características probióticas, porque presentan recuentos mayores o iguales a 10^7 ufc/g [104], por tal motivo es la seleccionada para trabajar en combinación con la cepa *S. cerevisiae*, con el fin de simular el proceso al interior de la colmena, dado que no sólo actúan bacterias ácido-lácticas sino también levaduras [6, 71].

El polen apícola es una matriz, que a pesar de la complejidad en su estructura, es una buena fuente de compuestos para realizar procesos fermentativos, debido a que tiene

todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos, sin embargo es necesario realizar operaciones de acondicionamiento. Para la adecuación de la materia prima se realizaron tratamientos térmicos, encontrando que la esterilización a 121°C durante 15 minutos es la que presenta un resultado satisfactorio en la destrucción microbiana de la carga inicial del polen apícola; mientras que la adaptación de los microorganismos al sustrato se realizó mediante un escalamiento, utilizando diferentes relaciones de polen-caldo nutritivo, encontrando que la mejor relación de polen-caldo nutritivo es la 1:10.

3. Capítulo 3: Cambios en parámetros fisicoquímicos, bioactivos, sensoriales y microestructurales del polen apícola durante el proceso de fermentación en fase sólida.

3.1 Introducción

El polen apícola es un alimento que contiene nutrientes como proteínas (aminoácidos), carbohidratos (azúcares reductores, polisacáridos, almidón, fibra dietaria), lípidos (ácidos grasos), compuestos minoritarios como minerales y vitaminas (hidrosolubles y liposolubles) y algunos compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides y carotenoides [5-6, 9-10, 34].

Estos compuestos tienen como función principal neutralizar los radicales libres y especies reactivas de oxígeno, así como descomponer peróxidos, que usualmente están asociados a enfermedades degenerativas y daño celular [62, 93, 105]. Estas características están asociadas a su estructura: los dobles enlaces conjugados y el número de grupos hidroxilo en los anillos aromáticos se encuentran principalmente en flavonoides y derivados de ácido cinámico, así mismo estos últimos se consideran buenos antioxidantes debido a las sustituciones en el anillo aromático y la estructura de la cadena lateral; ambos tipos de moléculas se han encontrado en polen apícola [99]. Por otro lado, la actividad antioxidante de los polifenoles está dada por sus propiedades redox [62]. Otra característica importante es la sinergia que tienen los antioxidantes para protegerse unos a otros de la destrucción oxidativa [62], lo que genera mejor protección contra los agentes oxidantes. En polen apícola también se encuentran carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico y algunos taninos [62, 93, 99].

Así como los compuestos antioxidantes son importantes para la nutrición, las características sensoriales influyen en la aceptación o rechazo de los consumidores y dependen de compuestos específicos como volátiles que afectan el aroma o minerales, carotenoides y flavonoides que afectan el color [5, 36-37, 48, 106].

Estos parámetros usualmente cambian cuando se realizan procesos en la matriz alimentaria, debido a la liberación o destrucción de compuestos por la acción de agentes externos, como la temperatura o la acción de microorganismos por fermentación [7, 107-109]. En el polen apícola los cambios pueden estar relacionados con el rompimiento de la exina y la liberación de los compuestos internos y los degradados de la capa externa. Contreras menciona que la exina solamente puede ser destruida por oxidantes fuertes o microorganismos, por tal razón se realiza el proceso de fermentación en fase sólida [110].

El objetivo de esta investigación fue establecer la composición del sustrato y el comportamiento de cepas de bacterias ácido-lácticas y levadura comercial en el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola, así como determinar los cambios en parámetros fisicoquímicos, bioactivos, sensoriales, microestructurales del polen apícola y evaluar el comportamiento cinético de las cepas durante el proceso de fermentación en fase sólida.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Materia Prima

- **Polen apícola húmedo y seco**

Se utilizó polen del mismo origen que el usado en la etapa de acondicionamiento.

- **Cultivos de Bacterias Ácido-Lácticas y Levadura**

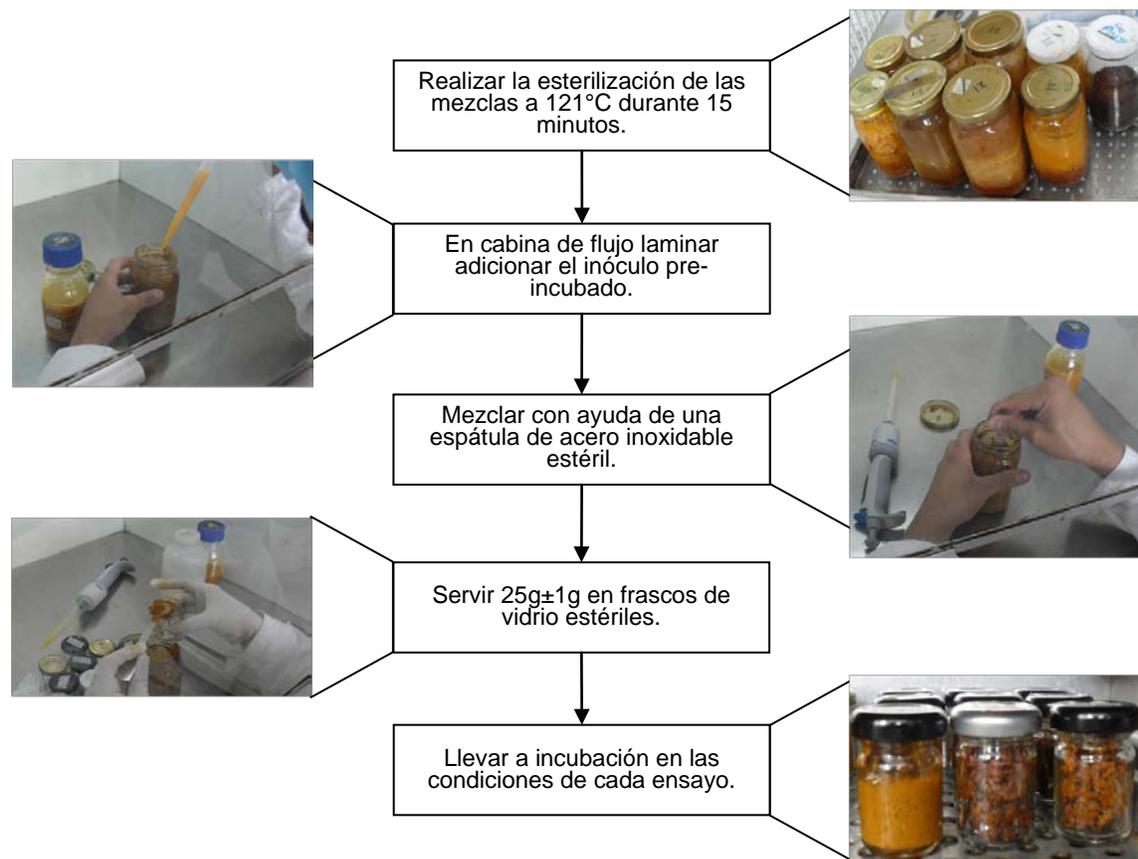
Se emplearon los mismos cultivos usados en la estandarización del inóculo.

3.2.2 Proceso de fermentación en fase sólida

- **Fermentación**

Para los ensayos de fermentación se utilizó polen húmedo y en las relaciones polen seco: agua 2:1 y 1:1. Las mezclas se agitaron hasta lograr completa homogenización y se sometieron a tratamiento térmico de esterilización a 121°C durante 15 minutos. A continuación se les adicionó el inóculo pre-incubado ($\sim 10^8$ ufc/g) de cada una de las cepas a evaluar y con una espátula de acero inoxidable previamente esterilizada se realizó la homogenización y se distribuyó la mezcla en frascos de aproximadamente 25g, para obtener muestras que se sometieron a las condiciones de cada ensayo, evaluando a lo largo del tiempo la producción de acidez y el pH, sin alterar el proceso de fermentación en el sustrato total. El proceso se llevó a cabo en una incubadora BLUE M (Ver Figura 3-1 y Tabla 3-1).

Figura 3-1: Procedimiento para ensayos de fermentación en fase sólida de polen apícola.



La fermentación en fase sólida se realizó empleando un modelo de medidas repetidas. En la Tabla 3-1 se presenta el diseño planteado.

El cultivo mixto se realizó con la levadura y la bacteria *L. plantarum*, debido a que presentó recuentos más elevados comparado con la cepa *L. acidophilus* (ver Figura 2-4). Se utilizó un inóculo de 10^8 ufc/g [7].

Tabla 3-1: Diseño experimental para comparar condiciones en el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola.

| Temperatura | Relación Polen:Agua | <i>L. acidophilus</i> | <i>L. plantarum</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Cultivo mixto |
|-------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------|
| 35°C | Polen Húmedo | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | 2:1 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | 1:1 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| 40°C | Polen Húmedo | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | 2:1 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | 1:1 | 3 | 3 | 3 | 3 |

3.2.3 Métodos

- **Análisis fisicoquímicos, bioactivos, microestructurales, microbiológicos y sensoriales**

Se realizaron los análisis de pH, acidez, actividad antioxidante mediante TEAC y FRAP, contenido de fenoles y carotenoides totales, vitamina E, microscopía electrónica de barrido y recuentos de microorganismos descritos en el capítulo 2. Adicionalmente se realizaron los siguientes análisis.

Color: se determinó mediante las coordenadas triestímulo del espacio CIELab, que se representa en coordenadas rectangulares como claridad o luminosidad (L^*) y a^* (tonalidades verde-rojo) y b^* (tonalidades azul-amarillo), las cuales se relacionan con los parámetros psicométricos croma (C) y tono (hue h). Se empleó un colorímetro marca Minolta [111].

Nariz electrónica: se pesaron 2 g de las muestras en viales de 15 mm de diámetro y se estabilizó durante 15 minutos a 20°C. Posteriormente se hizo la medición con un flujo de gas en la cámara de 200mL/min y se realizó la medición durante 220 segundos, después

de ciclos de limpieza de los sensores entre cada medida [112], utilizando una nariz electrónica Airsense Analytics GmbH PEN3 con diez sensores de óxido metálico (MOS), los cuales detectan compuestos específicos, como se muestra a continuación:

Tabla 3-2: Grupo de compuestos volátiles detectados por los sensores de la nariz electrónica.

| Sensor | Símbolo | Grupo de compuestos |
|--------|---------|--|
| 1 | W1C | Compuestos aromáticos |
| 2 | W5S | Amplio rango de compuestos, especialmente nitrogenados |
| 3 | W3C | Compuestos aromáticos |
| 4 | W6S | Principalmente hidrógeno |
| 5 | W5C | Compuestos aromáticos y alifáticos |
| 6 | W1S | Hidrocarburos de cadena corta |
| 7 | W1W | Compuestos azufrados |
| 8 | W2S | Alcoholes |
| 9 | W2W | Compuestos azufrados y clorados |
| 10 | W3S | Compuestos alifáticos de cadena corta |

Cinética: las curvas del crecimiento microbiano se realizaron mediante el recuento en placa de la población en los diferentes puntos de toma de muestra (0, 12, 24, 48 y 72 horas). El procedimiento se referencia en la Figura 2-2.

3.2.4 Análisis estadístico

Los cambios en las características fisicoquímicas (pH y acidez), la selección de la mejor relación de polen:agua para la fermentación y los cambios en los compuestos bioactivos y el color se evaluaron mediante un análisis de estadística descriptiva, seguido de un análisis de varianza – ANOVA y la prueba de Tukey como método de comparaciones múltiples empleando un nivel de significancia del 95%. La nariz electrónica y la comparación entre diversos parámetros evaluados se analizaron mediante un Análisis de Componentes Principales, así como la exploración de todos los datos obtenidos, con el

fin de determinar parámetros que identifiquen las condiciones de cada proceso de fermentación. El análisis estadístico fue efectuado mediante el uso del Software Matlab®.

3.3 Resultados y Discusión

Las abejas utilizan la miel en el bioproceso natural ocurrido en la colmena para generar el ambiente anaeróbico [56] y en estudios realizados anteriormente por Vamanu [16-17, 19] y Fuenmayor [7] se observó la adición de miel, sustancias prebióticas y enzimas, con el fin de favorecer el crecimiento microbiano; se planteó la opción de adicionar miel y fosfato de amonio a la mezcla de polen con el fin de poner disponible nutrientes como carbohidratos y nitrógeno para que los microorganismos pudieran iniciar la fermentación más fácilmente, y luego de un periodo de adaptación, utilizar los nutrientes que contiene el polen. El estudio muestra que no existen diferencias significativas entre los ensayos con la adición de miel, fosfato o miel-fosfato en la capacidad antioxidante (FRAP, TEAC), el contenido de fenoles totales y carotenoides totales, resultados que difieren de los obtenidos por Vamanu en un estudio realizado con la adición de prebióticos como inulina, lactulosa y rafinosa, donde encontró que la actividad aumentó después de 7 días de proceso en un 45% [19]; pero acordes a lo reportado por Fuenmayor en 2009 [7]. Esto puede ser ocasionado por las condiciones geográficas y medioambientales [10], que le proporcionan características únicas al polen dependiendo de su origen botánico [6, 20, 33-34], características nutricionales de la planta [32], rayos UV y aire [6]; y procesos como secado, manipulación y almacenamiento [6, 34]. El polen evaluado por Vamanu es de Rumania, factor que genera diferencias en el origen del polen y por ende en el proceso de adaptación de los microorganismos al sustrato de polen con miel, mientras que el polen utilizado por Fuenmayor es del mismo origen geográfico que el utilizado en el presente trabajo. Estos resultados permitieron decidir la mezcla del sustrato, con la cantidad de agua a adicionar, factor que influye en los costos de la materia prima.

La selección de las temperaturas de incubación se realizó basándose en la temperatura del interior de la colmena [56], en estudios previos [36-38] y recomendaciones realizadas por Fuenmayor [7].

Las cepas de microorganismos se escogieron con base en revisión bibliográfica, el proceso fermentativo es efectuado por bacterias del género *Lactobacillus* [6, 56, 71] y levaduras del género *Saccharomyces* [6]. En el estudio realizado por Fuenmayor se utilizaron cepas de *L. acidophilus* y *L. paracasei* [7] y Vamanu utilizó *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Lactococcus fermentum* y *Bifidobacterium bifidum* [16-17, 19]. Se ha encontrado que el *L. plantarum* realiza un buen proceso fermentativo, por tanto se escogió esta cepa para evaluar su comportamiento en polen colombiano; así como *L. acidophilus*, con el fin de comparar los resultados obtenidos por Fuenmayor. Igualmente estas bacterias se seleccionaron por su efecto como cepas probióticas [113]. La cepa de levadura seleccionada fue *S. cerevisiae*, por la facilidad de obtención y uso industrial en otras fermentaciones en alimentos, como pan y cerveza. La combinación se realizó con la levadura y la bacteria *L. plantarum*, debido a que esta presentó recuentos más elevados y constantes en el tiempo comparados con *L. acidophilus*, de acuerdo a ensayos previos realizados (Figura 2-4). El inóculo inicial de 10^8 ufc/g se seleccionó de acuerdo a los resultados obtenidos por Fuenmayor en un estudio previo [7].

3.3.1 Parámetros fisicoquímicos

El seguimiento de la fermentación se realizó mediante los parámetros de pH y acidez; con base en estos resultados, se seleccionó la relación de polen-agua que proporcionará un mejor ambiente para el desarrollo de la población microbiana y se utilizó en los ensayos finales de fermentación, representado en un aumento de acidez en el transcurso del proceso.

Durante el proceso se encuentra un aumento en la acidez y una disminución en el pH, correspondiente a la correlación inversa entre estos dos parámetros en las distintas cepas, lo que indica el desarrollo de la población de microorganismos y el progreso de la fermentación, de acuerdo a las rutas metabólicas seguidas por los *Lactobacillus*, el principal producto obtenido es ácido láctico [69]. En todos los ensayos realizados excepto

en el efectuado por *L. acidophilus* a 35°C se observa que el polen fresco presenta descensos en la acidez producida, es decir, no hay producción de sustancias ácidas, debido posiblemente a la muerte de los microorganismos, tal como se observó en los ensayos preliminares.

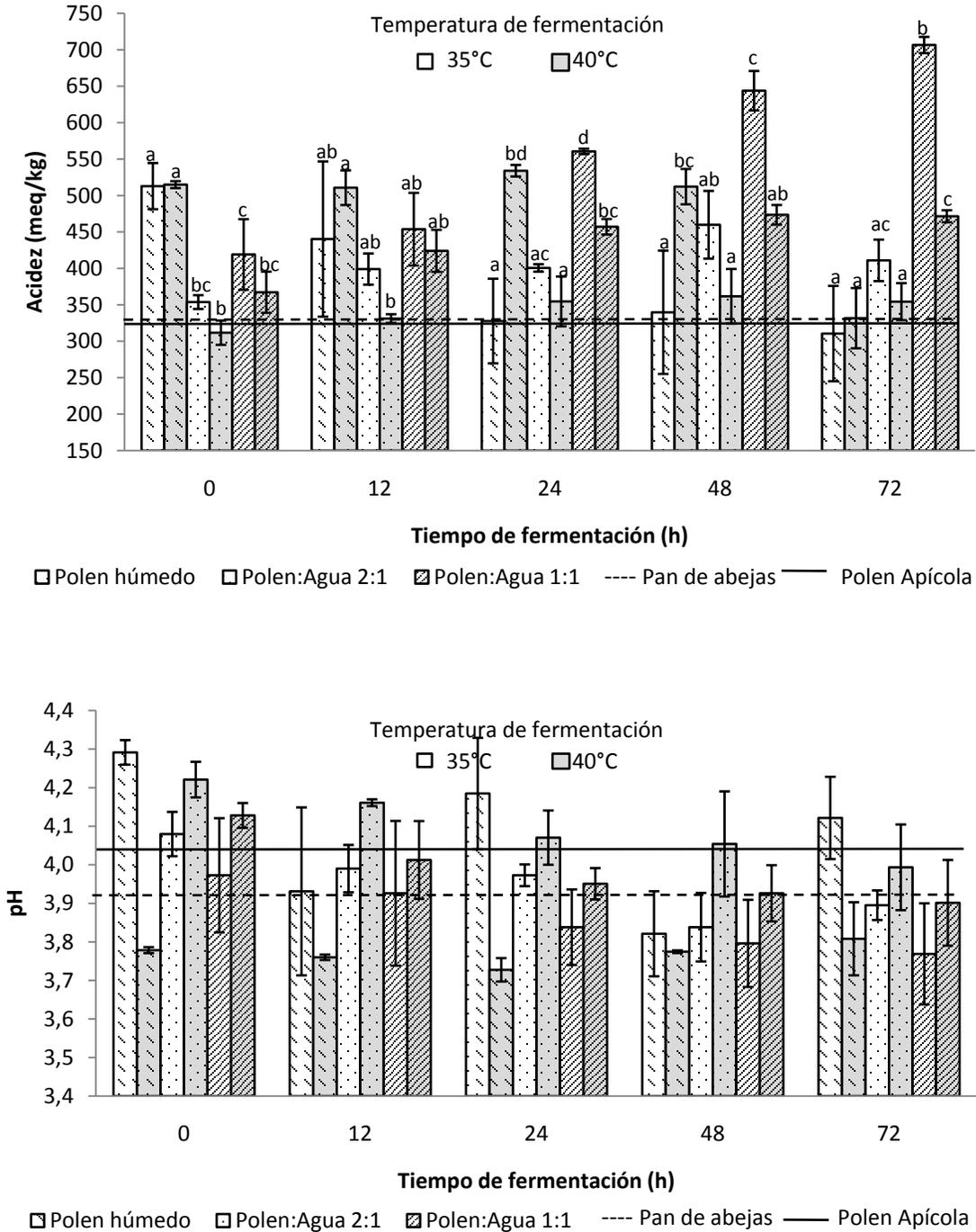
Los parámetros de pH y acidez producida evaluados en los distintos ensayos mostraron los comportamientos representados en las Figuras 3-2 a 3-5. Se observa como en algunas fermentaciones (mayormente en las de polen húmedo) hay puntos de aumento y descenso o viceversa en el contenido de acidez, esto puede estar ocasionado por el metabolismo microbiano. Los microorganismos utilizados realizan la degradación de los carbohidratos mediante rutas metabólicas en las que producen ácido láctico únicamente (homofermentativas), o ácido acético, ácido succínico, ácido láctico, diacetil, CO₂ o etanol (heterofermentativas) [64, 80, 114-116]; y teniendo en cuenta los valores de pKa de cada ácido se pueden apreciar las diferencias en el contenido de acidez. Si en la fermentación se produjo ácido acético, el contenido global de acidez será menor que si hay producción de ácido láctico, que tiene menor pKa, el cual se traduce en una mayor capacidad acidificante.

Igualmente al existir cambios en la microestructura del polen (Figura 2-3), es posible que sustancias como ácidos orgánicos y aminoácidos que aportan acidez, hayan sido liberados generando un aumento en este parámetro. La relación polen:agua 1:1 presentó mayor ruptura de la exina comparada con la relación polen:agua 2:1 y el polen húmedo, por tanto se presentó un aporte mayor al generado por el metabolismo bacteriano.

El comportamiento del pH presenta la misma tendencia de aumentos y descensos que la acidez (mayormente en los ensayos con polen húmedo), debido a la naturaleza de los ácidos generados.

El análisis estadístico se realizó entre las composiciones de los sustratos en cada hora de toma de muestra de las fermentaciones.

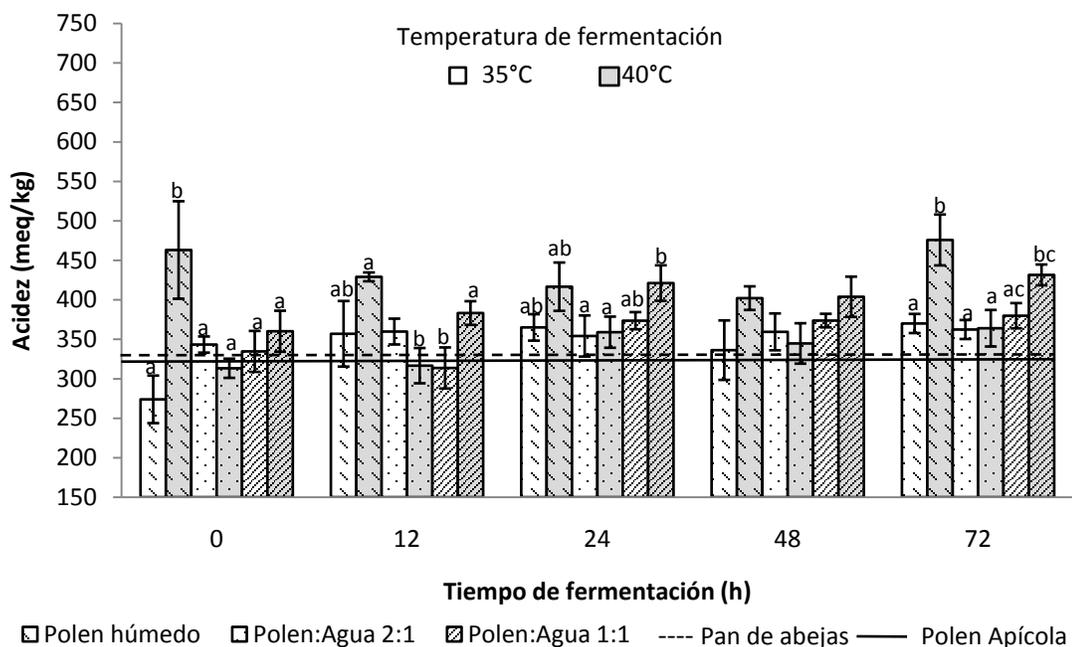
Figura 3-2: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con *L. plantarum*, evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C.

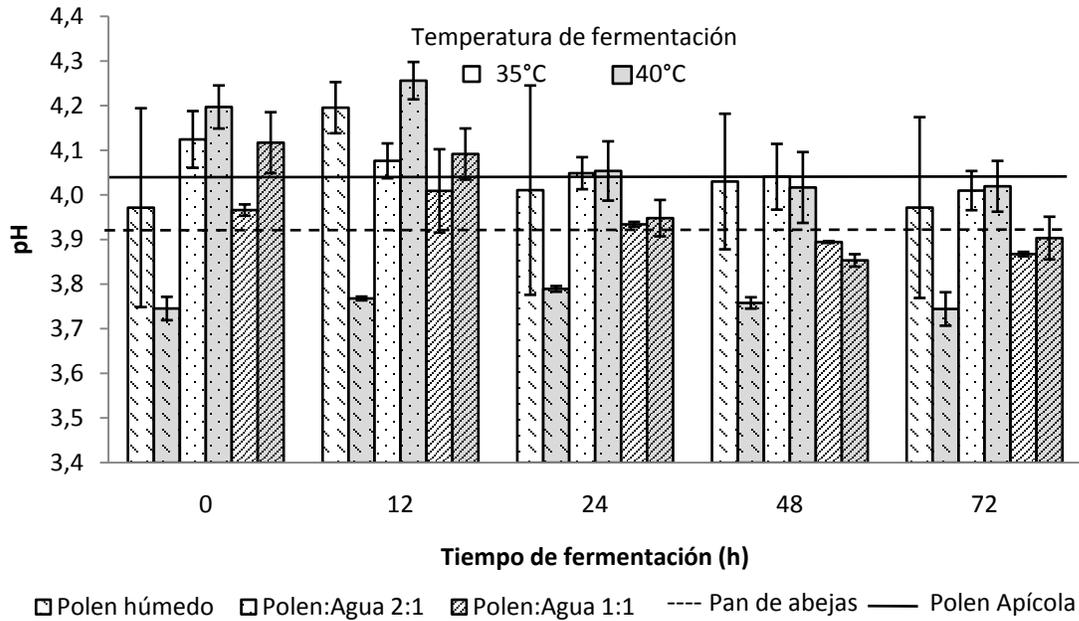


Resultados en base seca. Letras distintas para la misma hora indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%. Barras sin letras significa que no hay diferencias estadísticas significativas.

En la Figura 3-2 se observa la variación que tienen los resultados y las diferencias significativas entre los diferentes tiempos de fermentación en los distintos sustratos. En todo el bioproceso la composición del sustrato y la temperatura afectan la producción de acidez. Los ensayos realizados en las relaciones polen:agua 2:1 y 1:1 presentaron una producción de acidez elevada a 35°C (460 y 706 meq/kg, respectivamente), debido a la actividad de agua reportada (Tabla 2-6) que permite el crecimiento de microorganismos, mayormente en la relación 1:1, ya que la a_w es mayor a 0.90, valor ideal para su desarrollo [64, 67]. Igualmente esta bacteria al ser heterofermentativa, sigue rutas metabólicas alternas a otras bacterias ácido lácticas generando productos como ácido acético, que aportan en el contenido de acidez encontrado [69, 80]. A pesar de que se reportan temperaturas de crecimiento entre 30-40°C para las bacterias [69, 79-80], se puede observar que la mejor temperatura de crecimiento para *L. plantarum* es 35°C, por las diferencias en los valores de acidez, lo que es indicador de crecimiento y mantenimiento microbiano.

Figura 3-3: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con *L. acidophilus*, evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C.

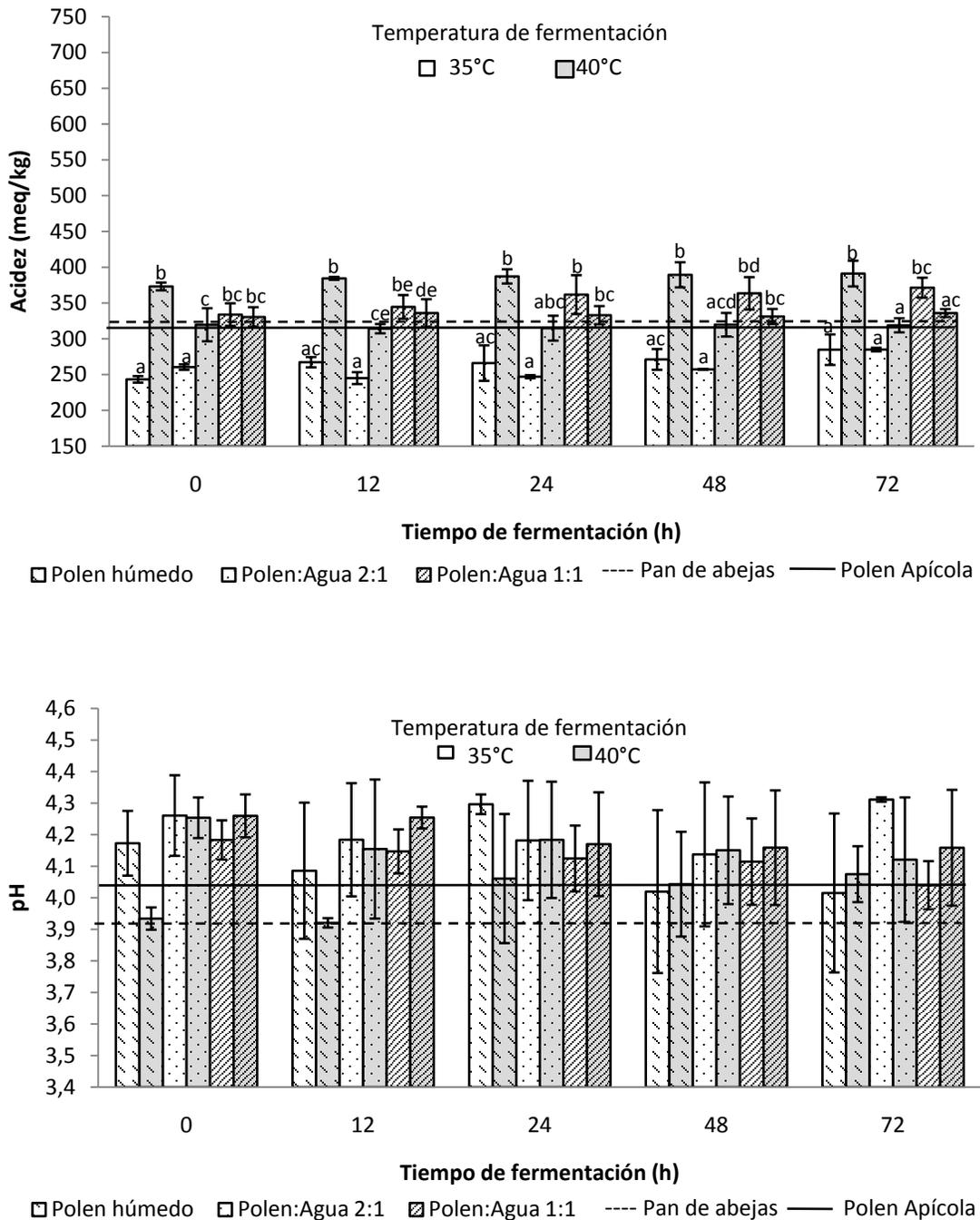




Resultados en base seca. Letras distintas para la misma hora indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%. Barras sin letras significa que no hay diferencias estadísticas significativas.

En la Figura 3-3 se pueden observar las variaciones obtenidas, apreciándose que las mayores desviaciones se encuentran en los ensayos realizados con polen húmedo. El sustrato de la fermentación y la temperatura de incubación generan diferencias significativas a lo largo del proceso, excepto en la hora 48. El aumento de acidez en el polen húmedo obtenido en la fermentación con *L. acidophilus* pudo ser ocasionado, por la ruptura de la exina y en un caso excepcional, por el aprovechamiento de los nutrientes del polen, que dieron sustento a los microorganismos, a pesar de la falta de agua en el medio. Analizando los resultados para las relaciones polen:agua 2:1 y 1:1 se observa que a 40°C el crecimiento es mejor (mayor producción de acidez), acorde con la literatura, que reporta rangos de temperatura de crecimiento entre 30-40°C [69, 79-80].

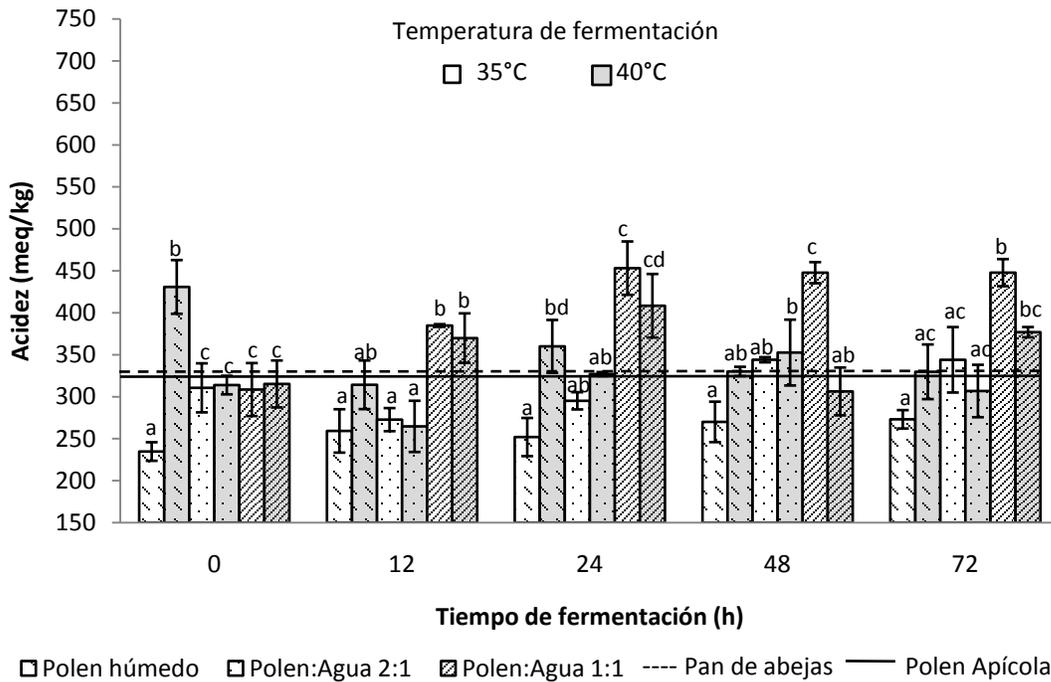
Figura 3-4: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con *S. cerevisiae*, evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C.

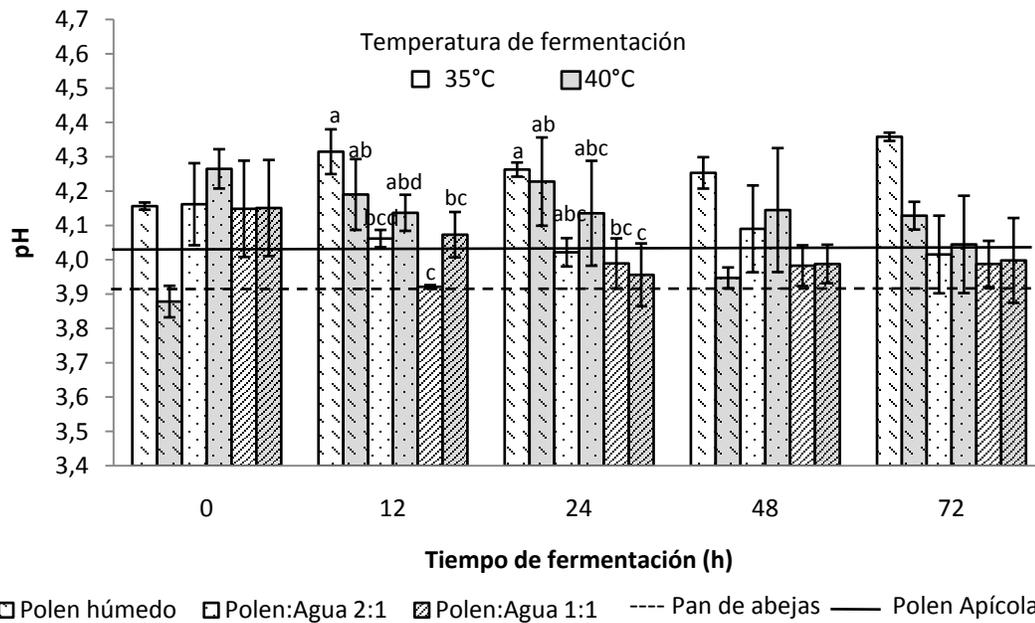


Resultados en base seca. Letras distintas para la misma hora indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%. Barras sin letras significa que no hay diferencias estadísticas significativas.

En la Figura anterior se observan las variaciones de los ensayos, encontrándose altas desviaciones en el pH, debidas a las diferencias en la producción de sustancias ácidas (pocas) u otros metabolitos por la levadura. La acidez presenta diferencias significativas en todo el bioproceso, lo que permite apreciar la influencia del tipo de sustrato y la temperatura. Las fermentaciones con *S. cerevisiae* están caracterizadas principalmente por la producción de alcohol, aunque dependiendo de la matriz, se generan algunos ácidos orgánicos [117], por tanto los aumentos en la acidez son dados por la producción de ácido succínico y acético por parte de las levaduras [115-116]. Igualmente se observa que a 35°C se obtienen mejores valores de acidez, lo que está de acuerdo con la cercanía del rango óptimo de crecimiento (25-30°C) [67, 81].

Figura 3-5: Comportamiento de la acidez y el pH en un proceso de fermentación con el cultivo mixto, evaluando diferentes relaciones polen:agua incubadas a 35°C y 40°C.





Resultados en base seca. Letras distintas para la misma hora indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%. Barras sin letras significa que no hay diferencias estadísticas significativas.

La Figura 3-6 presenta las variaciones y diferencias significativas obtenidas para la acidez y el pH. La hora de la fermentación y el sustrato ocasionan cambios en ambos factores. De acuerdo a los resultados obtenidos en la acidez, la temperatura óptima de crecimiento es 35°C, donde se observan aumentos de acidez progresivos, en contraste con los resultados a 40°C en los que estos valores tienen descensos, ocasionados posiblemente por la muerte de los microorganismos o la producción de ácidos menos acidificantes que el ácido láctico; los posteriores ascensos pueden estar relacionados con reacciones fisicoquímicas que permiten la liberación de algunos compuestos ácidos.

Realizando la comparación entre las muestras de la fermentación y el polen inicial y el pan de abejas se observa que la acidez es mayor en las fermentaciones con *L. plantarum*, *L. acidophilus* y algunos puntos de *S. cerevisiae* y el cultivo mixto. Los cambios en pH respecto al polen y al pan de abejas son más variados, algunos aumentan mientras que otros disminuyen en diferentes puntos del proceso.

Se observan picos de producción entre las 0 y 24 horas en todos los experimentos, después de lo cual se observa una fase de latencia que se mantiene hasta las 72 horas, lo que indica que el polen apícola es una matriz apropiada para el desarrollo de microorganismos, ya que permite el mantenimiento de la población microbiana en largos periodos de tiempo.

Los resultados obtenidos son acordes con la investigación previa realizada por Fuenmayor [7], donde se observan aumentos de acidez y descensos de pH en el transcurso del tiempo para la cepa *L. acidophilus*.

La selección de la mejor relación de polen-agua se realizó de acuerdo a la producción de acidez, tomando los puntos con mayor producción y aplicando un análisis de varianza – ANOVA, seguido de la prueba de Tukey como método de comparaciones múltiples empleando un nivel de significancia del 95%. No se observaron diferencias significativas entre el polen húmedo y las distintas relaciones de polen-agua (2:1 y 1:1) durante las dos temperaturas de fermentación evaluadas (35 y 40°C) para cada cepa (ver Anexo C), por tal razón se seleccionaron las condiciones que presentaron mayor producción de acidez. Observando la Figura 3-2 la mejor relación para *L. plantarum* es 1:1 a 35°C. Para *L. acidophilus* (Figura 3-3) se observa que el polen húmedo a 35°C es el que presenta mayor acidez producida, sin embargo de acuerdo a los recuentos efectuados, este sustrato no es ideal para el crecimiento debido a que después de las 12 horas hay muerte total de la población bacteriana, por tal razón se escoge el siguiente valor más elevado, el cual es en la relación 1:1 a 40°C. Para el cultivo mixto (Figura 3-5) es 1:1 a 35°C y dado que la levadura *S. cerevisiae* no produce en su metabolismo principalmente sustancias ácidas se determinó la relación de acuerdo a los recuentos obtenidos, seleccionándose la relación 2:1 a 35°C. Como se mencionó anteriormente la a_w en la relación 1:1 es superior a 0.90, valor que acorde a la literatura [64, 67] es el óptimo para el crecimiento bacteriano, por tal razón la producción de acidez es mayor en esa relación y es la seleccionada (menos en la cepa *S. cerevisiae*) para la determinación de los parámetros bioactivos. En todos los ensayos menos en los de *L. acidophilus* la óptima temperatura fue la de 35°C, valor acorde con estudios previos realizados por Vamanu y Fuenmayor [7, 16-19] y con la temperatura que es reportada se tiene al interior de la colmena.

Realizando la comparación de la acidez del producto final en las condiciones seleccionadas (relación polen-agua y temperatura de fermentación) con el pan de abejas se observa que la única cepa que no presenta diferencias significativas es la *S. cerevisiae* (Figura 3-4), mientras que las bacterias y el cultivo mixto si presentan diferencias. Esto puede ser generado por el acondicionamiento que se le efectuó al polen antes de iniciar el proceso fermentativo, ya que en la colmena no hay procesos de limpieza y esterilización. Igualmente el pan de abejas es elaborado por diferentes microorganismos [6, 56, 71], que pueden competir con las bacterias ácido-lácticas y disminuir la producción de acidez; estos procesos convierten el polen en un sustrato adecuado para la fermentación. La levadura tiene valores similares de acidez al pan de abejas, debido a que los principales productos de su metabolismo no son ácidos, por tanto no hay un aumento considerable de este parámetro. Respecto al pH, se observan descensos en todas las cepas, excepto para *S. cerevisiae*, lo que concuerda con el aumento de acidez reportado en los ensayos.

Se observa que comparando los resultados de los productos finales obtenidos con la materia prima inicial hay un aumento en la acidez y un descenso en el pH (excepto para *S. cerevisiae*), lo que indica efectivamente el desarrollo de la fermentación.

3.3.2 Características bioactivas, microbiológicas, microestructurales y sensoriales

Con el fin de evaluar el cambio en los parámetros bioactivos de acuerdo a la esterilización y fermentación, se realizaron análisis de la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales en las distintas relaciones de polen-agua en la esterilización, para ver si la adición de agua generaba algún efecto. En la fermentación se evaluaron la actividad antioxidante, el contenido de fenoles y carotenoides totales, vitamina E, nariz electrónica, color, cinética y se realizaron fotografías mediante microscopía electrónica de barrido.

En la Tabla 3-3 se presentan los resultados obtenidos para la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales antes y después de la esterilización. Realizando el análisis estadístico se observan diferencias significativas entre el polen antes y después de someterlo al tratamiento térmico en la actividad antioxidante mediante TEAC, igualmente hay diferencias entre el polen antes del tratamiento y las distintas relaciones con agua. La capacidad antioxidante mediante FRAP presenta diferencias significativas entre el polen antes y después del tratamiento; de la misma manera las relaciones con agua y el polen seco presenta valores que son significativamente diferentes del polen húmedo, debido posiblemente a compuestos provenientes de la exina como ácidos fenólicos (ferúlico y p-cumárico), carotenoides y tocoferoles [28, 33], que aportan al carácter antioxidante del polen y pueden ser liberados al cambiar la estructura externa por la exposición a altas temperaturas [28-30]. De acuerdo a Zilic, productos de origen vegetal, como la soya tienen una estructura compleja que protege compuestos como los ácidos fenólicos de degradación térmica [118], por tanto el contenido de fenoles totales en polen apícola, también con una compleja estructura, no presenta diferencias significativas después del tratamiento térmico. Igualmente estudios realizados por Sogi [119] y Solgajova [120], quienes trabajaron con mango y bebidas a base de malta enriquecidas con polen respectivamente, en tratamientos con infrarrojo y enriquecimiento, encontraron que los fenoles totales aumentan con el tiempo de exposición y la cantidad de polen adicionada.

Tabla 3-3: Características antioxidantes de los distintos sustratos antes y después del tratamiento térmico*.

| | | TEAC (mM Trolox/g polen) | FRAP (mM Trolox/g polen) | Fenoles totales (mg ácido gálico/g polen) |
|---------------------|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---|
| | | $\bar{X} \pm SD$ | | |
| Polen húmedo | Antes Tratamiento Térmico | 0.041±0.002 a | 0.052±0.004 a | 16.28±2.21 a |
| Polen húmedo | Después Tratamiento Térmico | 0.055±0.003 b | 0.055±0.001 a | 16.14±0.91 a |
| 2:1 | | 0.056±0.002 b | 0.060±0.001 b | 15.46±0.91 a |
| 1:1 | | 0.060±0.004 b | 0.066±0.002 c | 15.59±0.62 a |
| Polen seco | | 0.059±0.003 b | 0.061±0.003 bc | 17.35±0.97 a |

*Resultados en base seca. Letras distintas en una misma columna para cada tratamiento indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%.

La reacción de Maillard, es una reacción no enzimática que involucra azúcares reductores y aminoácidos, generando diferentes compuestos que afectan las propiedades sensoriales y antioxidantes de los alimentos [107, 121-122]. La variación en los productos de esta reacción depende del pH, temperatura, tipo de azúcares, lípidos y aminoácidos involucrados, actividad de agua y ambiente de la reacción [107-109]. Debido a que el polen apícola posee un alto contenido de proteína y una cantidad apreciable de carbohidratos [7, 35, 37], es muy susceptible a generar esta reacción, y esto genera la variación en la actividad antioxidante.

De acuerdo a Eric y Vhangani la reacción de Maillard contribuye con el potencial antioxidante de los alimentos [122-123] y en un estudio realizado en girasol Eric encontró que la capacidad antioxidante aumentó a medida que incrementaba el contenido de los productos de la reacción. Igualmente al aumentar la temperatura, los productos generados en la reacción de Maillard incrementan la actividad antioxidante [107, 118]. En un estudio realizado por Yilmaz en la reacción de glucosa e histidina a diferentes temperaturas, encontró que a 120°C se obtiene más capacidad antioxidante que a 100°C

[107]. En un estudio realizado por Zilic, se evaluaron distintos tratamientos térmicos en soya, encontrando que la actividad se incrementa al aumentar la temperatura [118]. Se ha encontrado que los productos de Maillard están relacionados con la actividad antioxidante en mieles canadienses [121], lo cual sugiere que algunos productos de la colmena presentan esta correlación. Estas investigaciones corroboran los valores encontrados en la actividad antioxidante en las diferentes relaciones polen-agua después de aplicar el tratamiento térmico, lo que permite concluir que la adición de agua no genera diferencias en la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales.

Teniendo en cuenta las relaciones de polen-agua seleccionadas para cada cepa, 1:1 para *L. plantarum*, *L. acidophilus* y el cultivo mixto y 2:1 para *S. cerevisiae*; así como la temperatura de fermentación, 35°C para *L. plantarum*, *S. cerevisiae* y el cultivo mixto y 40°C para *L. acidophilus*, se realizaron los ensayos finales en las relaciones seleccionadas para cada cepa y se presentan los resultados de las micrografías y los parámetros bioactivos a lo largo del proceso fermentativo.

Figura 3-6: Micrografías con un aumento de 1600x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con *L. plantarum*.

En (a) 0 horas, (b) 12 horas, (c) 24 horas, (d) 48 horas y (e) 72 horas.

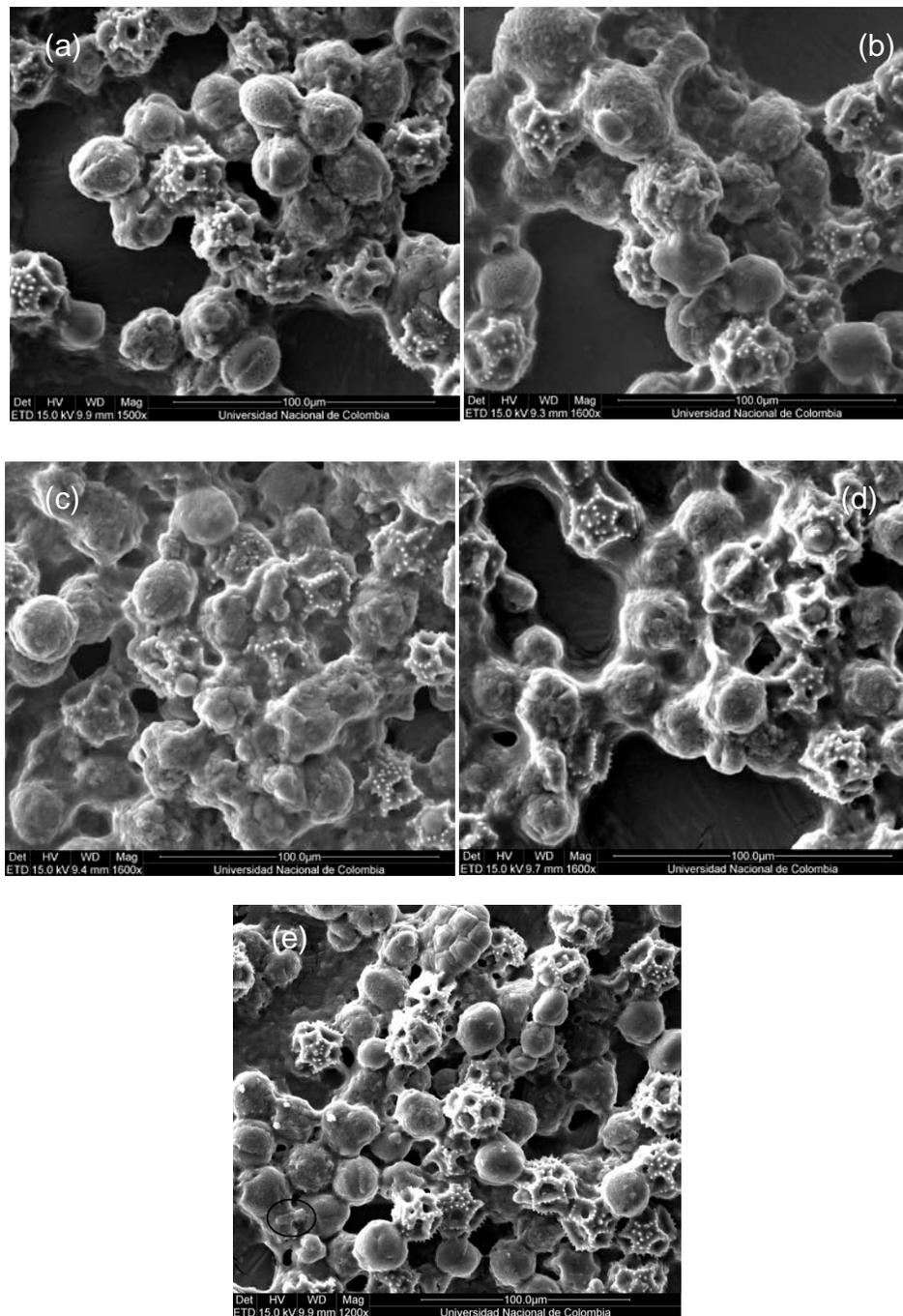


Figura 3-7: Micrografías con un aumento de 1200x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con *L. acidophilus*.

En (a) 0 horas, (b) 12 horas, (c) 24 horas, (d) 48 horas y (e) 72 horas.

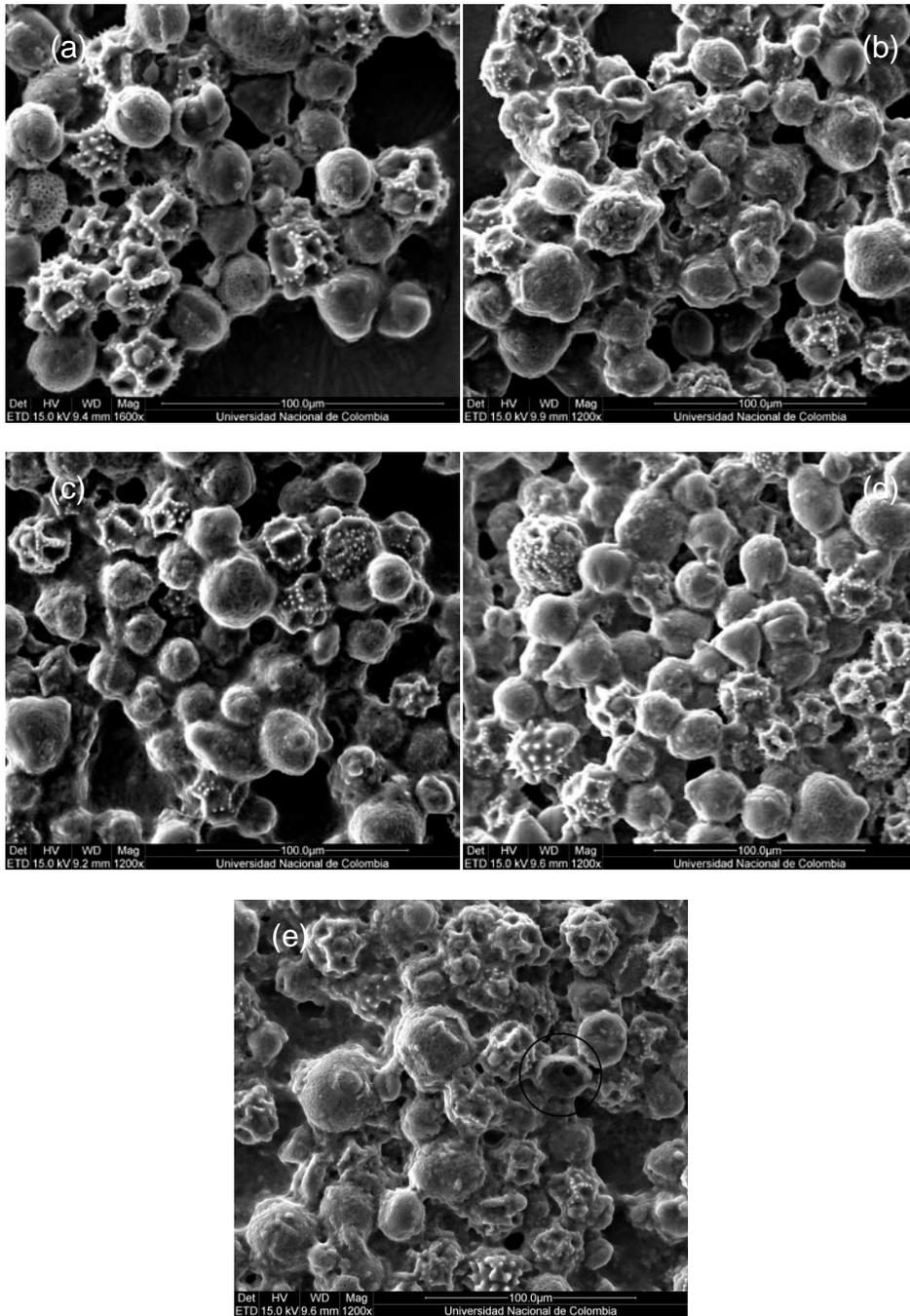


Figura 3-8: Micrografías con un aumento de 1200x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con *S. cerevisiae*.

En (a) 0 horas, (b) 12 horas, (c) 24 horas, (d) 48 horas y (e) 72 horas.

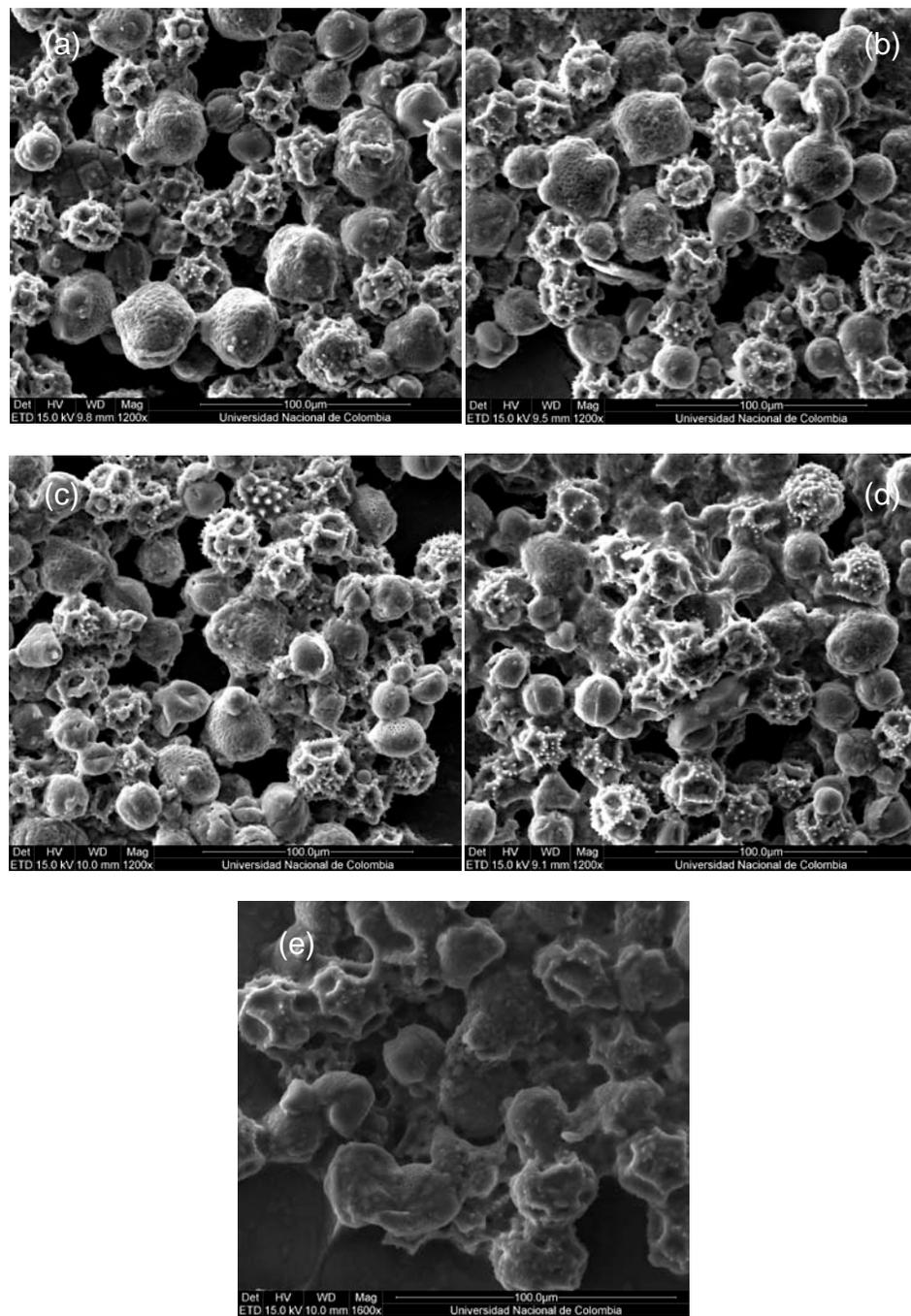
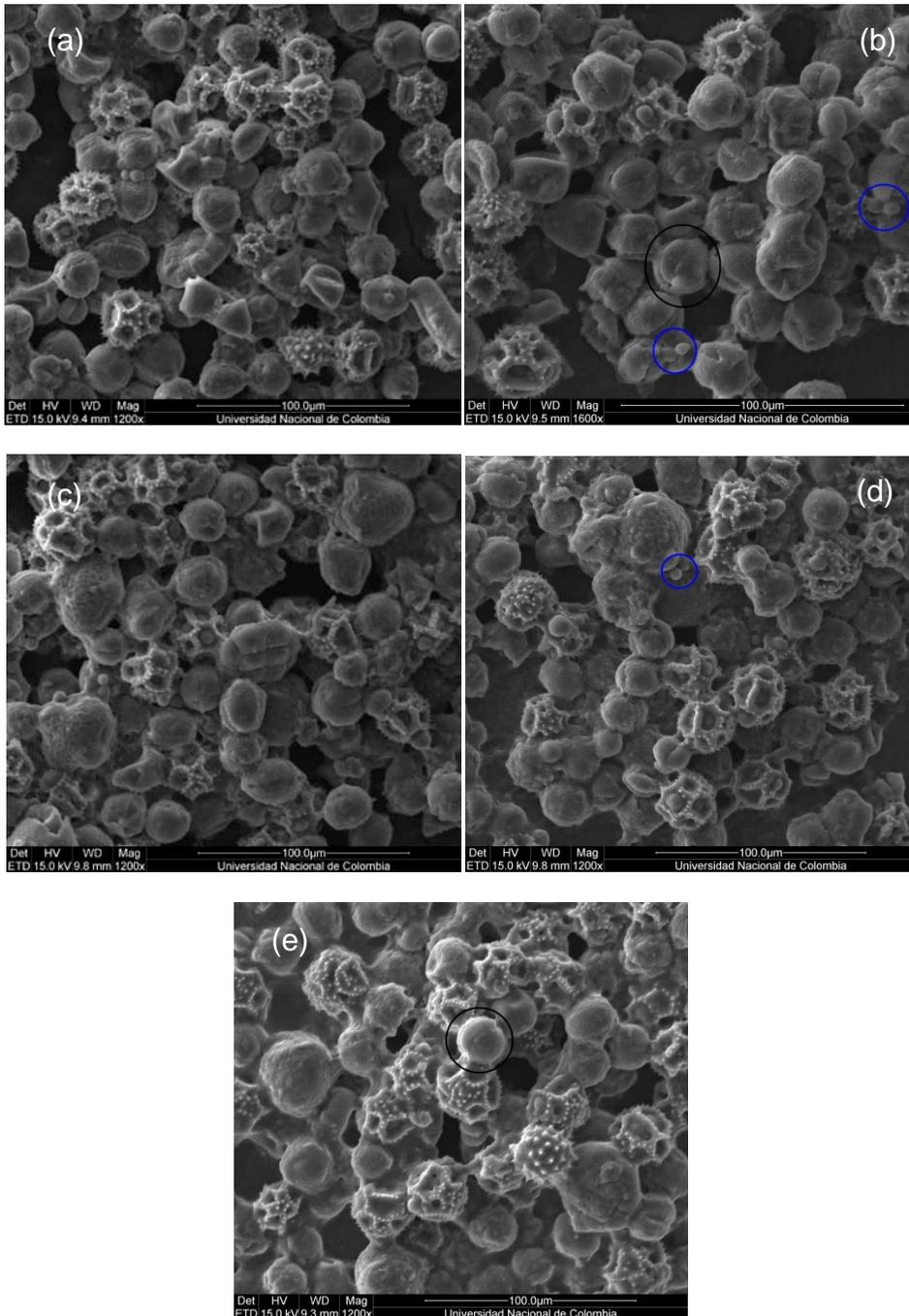


Figura 3-9: Micrografías con un aumento de 1200x de la estructura del grano de polen sometido a un proceso de fermentación con el cultivo mixto.

En (a) 0 horas, (b) 12 horas, (c) 24 horas, (d) 48 horas y (e) 72 horas.

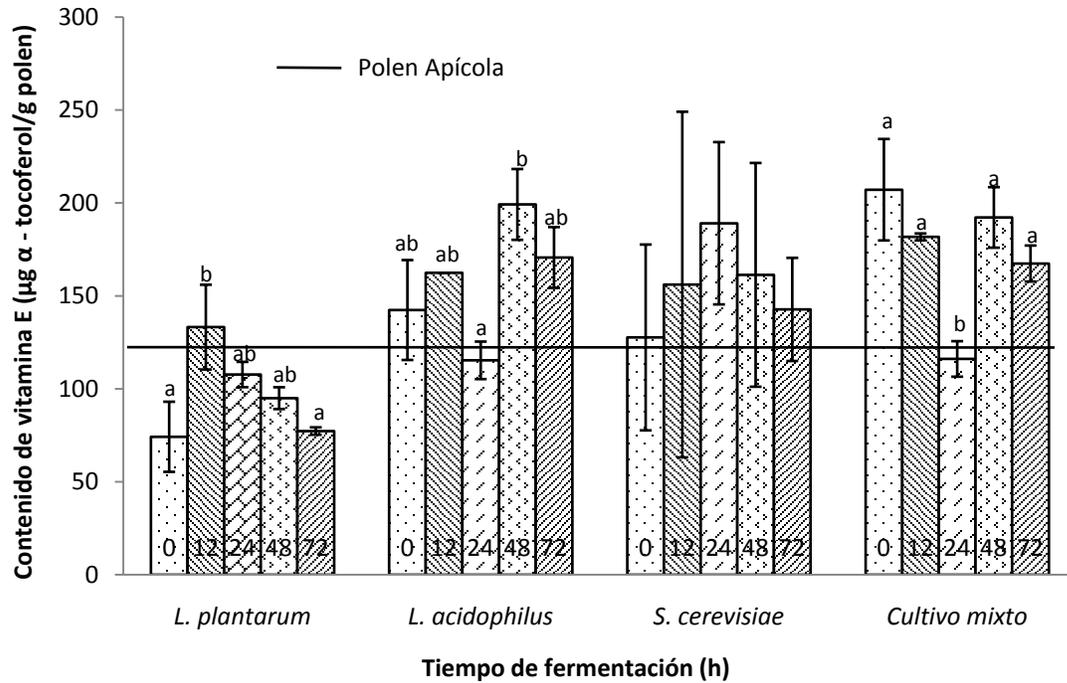


En las Figuras 3-6 a 3-9 se pueden observar los cambios estructurales a lo largo de la fermentación para los distintos microorganismos, destacándose como en el avance de la fermentación se va aglomerando el polen por la apertura de la exina y la mezcla de los compuestos internos, así como el hinchamiento y la generación de orificios en algunos tipos de polen, que permiten el aprovechamiento de los nutrientes, por la exposición del contenido interno. En la Figura 3-6e se puede observar una bacteria, con lo cual se comprueba su mantenimiento en el tiempo, así como el cambio en la estructura, que presenta diferencias hasta la hora 48. En la Figura 3-7 se observa como el polen va cambiando su estructura, principalmente el de forma estrellada, hasta la hora 72; es importante notar en el apartado (e) la presencia de una capa externa (exina) sin su contenido interno, lo que indica que la fermentación efectivamente rompe la estructura para el aprovechamiento de los nutrientes en el interior del polen. Igualmente en la Figura 3-8 se observa que la estructura se va abriendo a medida que transcurre el tiempo, evidenciándose cambios hasta la hora 72. La Figura 3-9 presenta varios pellets de polen con su contenido interno expuesto (círculos negros, apartados (b) y (e)), además de algunas levaduras (círculos azules), el cambio en la estructura presenta un avance hasta la hora 24, donde se observa el aglomeramiento de las partículas, después de lo cual no se observan cambios apreciables.

Se observa como el origen botánico claramente influencia el polen, encontrándose aproximadamente 5 tipos diferentes de polen, que posiblemente afectaran los parámetros bioactivos; así como los cambios estructurales.

Realizando el análisis de varianza – ANOVA y la prueba de Tukey se encontró que no hay diferencias significativas a lo largo del tiempo en ninguno de los parámetros evaluados en cada una de las cepas utilizadas excepto en la vitamina E en las cepas *L. plantarum*, *L. acidophilus* y el cultivo mixto.

Figura 3-10: Comportamiento comparativo de cada cepa en el contenido de vitamina E a lo largo del bioproceso.



Resultados en base seca. Letras distintas para la misma cepa indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%. Barras sin letras significa que no hay diferencias estadísticas significativas.

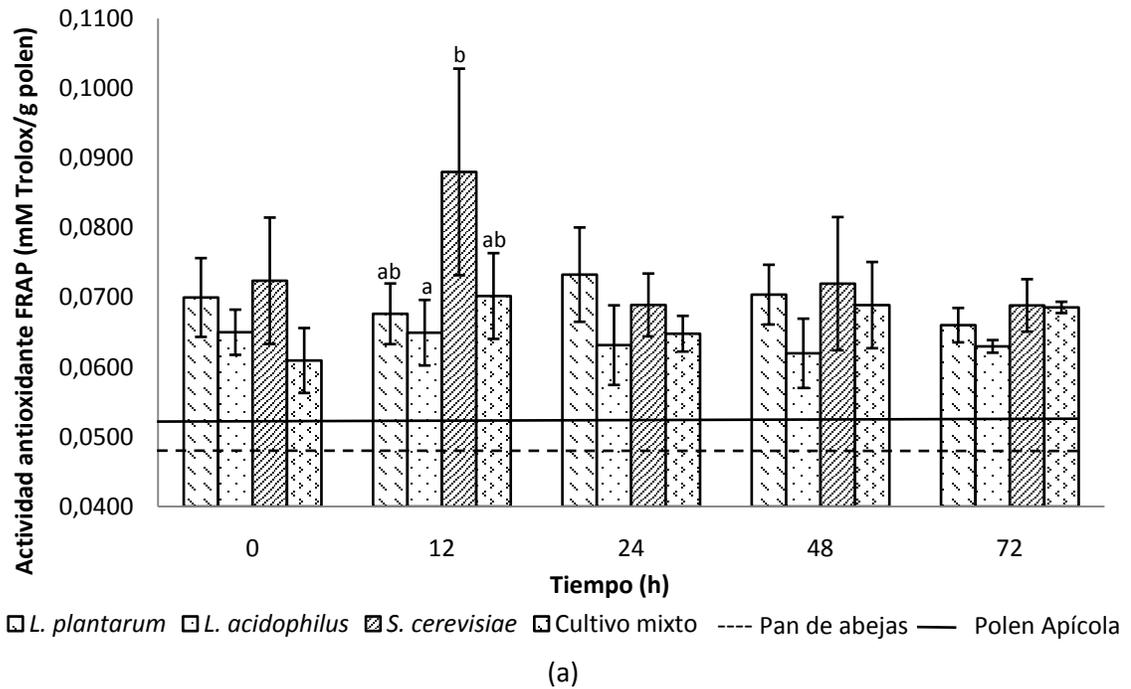
En la Figura 3-10 se observan las variaciones y las diferencias significativas a lo largo de la fermentación para cada cepa.

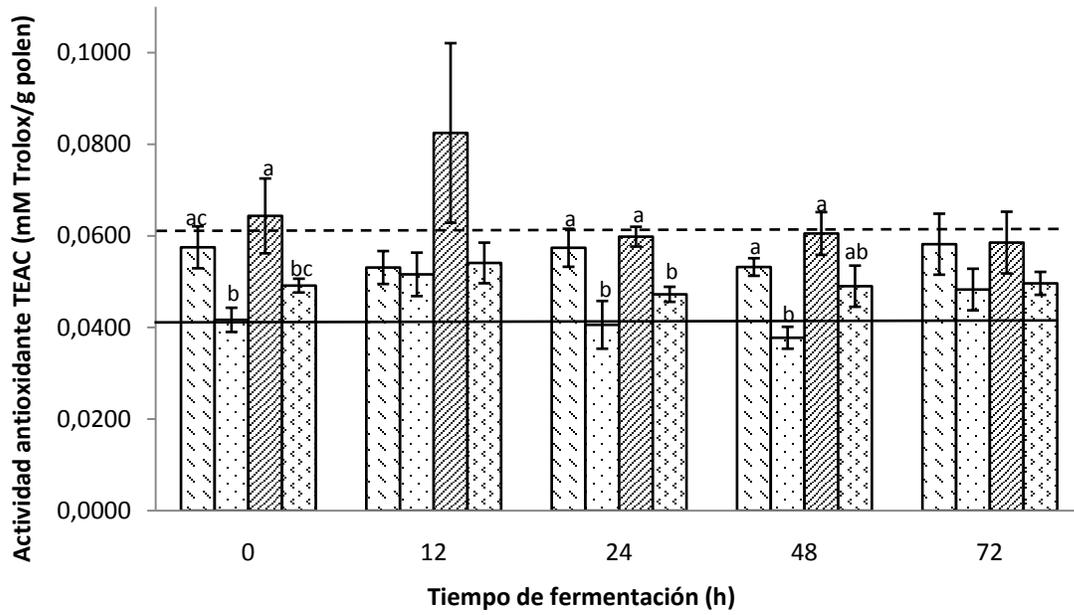
En los ensayos realizados con *L. plantarum* se presentó un pico alrededor de las 12 horas, relacionado posiblemente con la degradación de la exina, con lo cual hay liberación de la vitamina E, seguido de un descenso debido al consumo del compuesto por el microorganismo. El ensayo con la levadura presenta un máximo de producción a las 24 horas, después de lo cual hay disminución por el consumo o la degradación. El comportamiento en los ensayos con *L. acidophilus* y el cultivo mixto presenta un descenso significativo en la hora 24, seguido de un aumento entre la horas 24-48 y un

posterior descenso gradual, ocasionado en gran medida por el mismo efecto del *L. plantarum* sobre el polen apícola, debido a que tanto el cultivo mixto como la bacteria siguen comportamientos de crecimiento similares al *L. plantarum*.

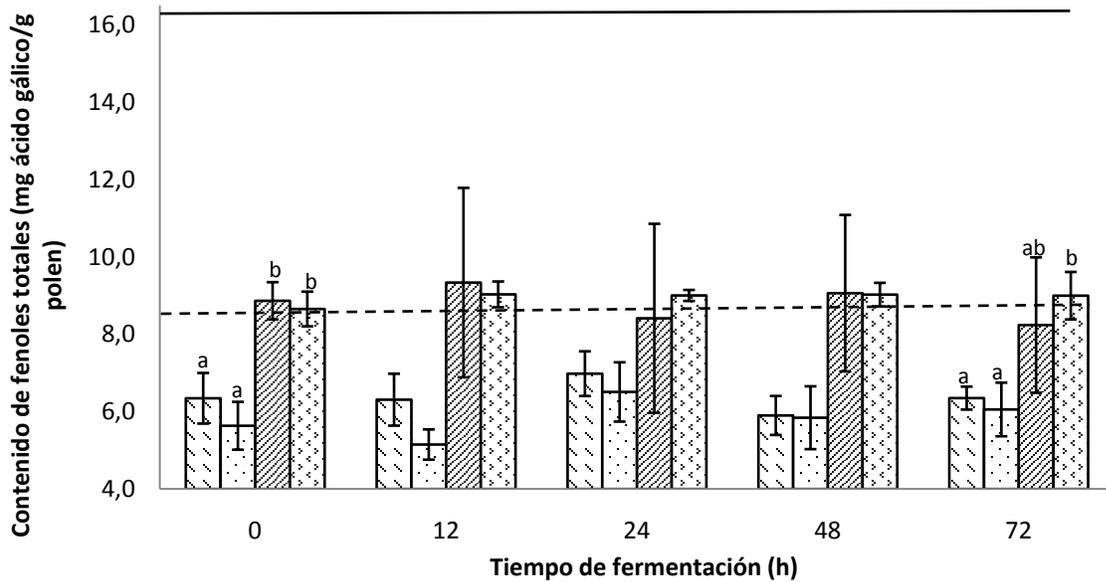
Figura 3-11: Comparación entre los ensayos con cada cepa de los diferentes compuestos bioactivos a lo largo de la fermentación.

Actividad antioxidante total medida por (a) FRAP, (b) TEAC y compuestos bioactivos individuales (c) fenoles totales, (d) carotenoides totales y (e) vitamina E.

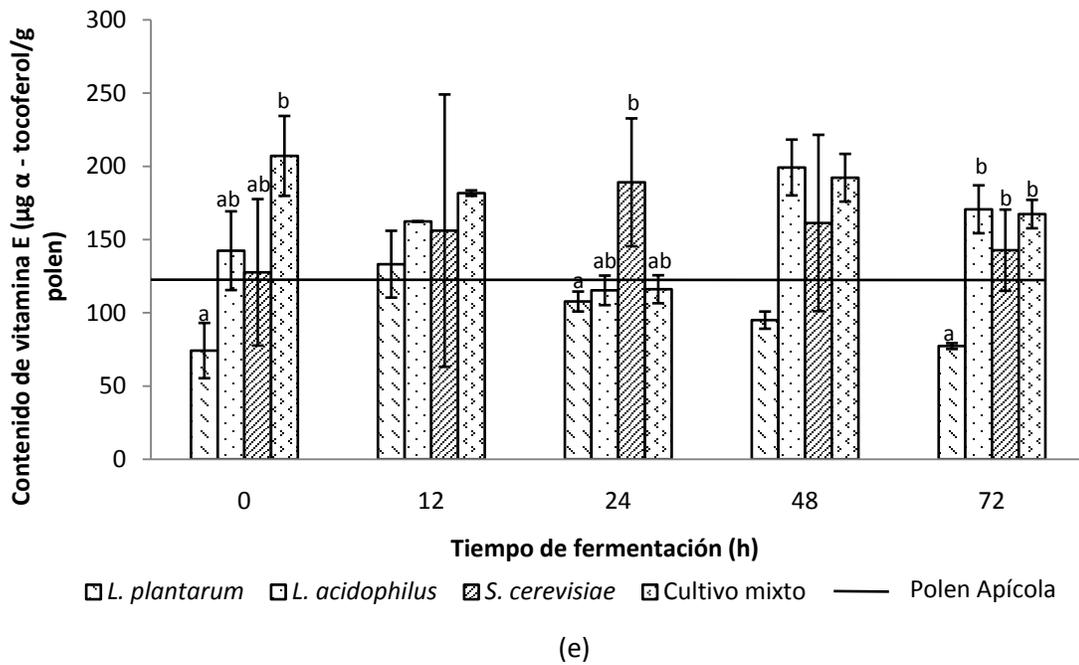
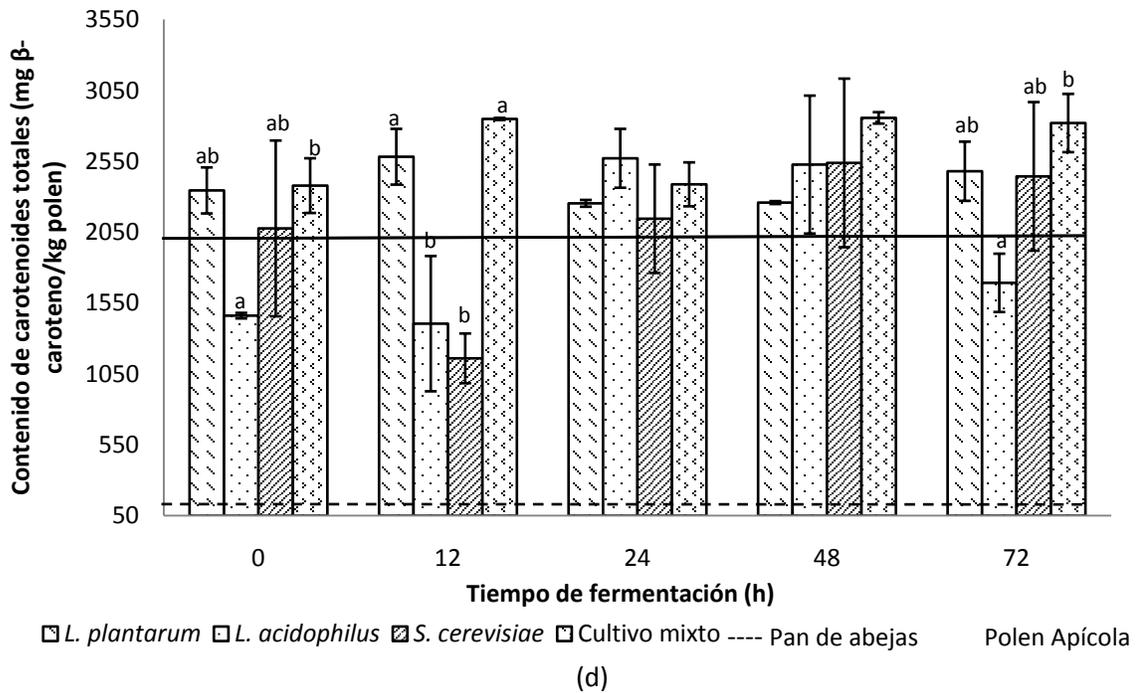




(b)



(c)



Resultados en base seca. Letras distintas para la misma hora indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%. Barras sin letras significa que no hay diferencias estadísticas significativas.

Se observa que el inicio de la fermentación presenta diferentes valores, es decir, no todos los ensayos inician del mismo contenido en los parámetros evaluados, debido posiblemente a la producción y destrucción de compuestos por efecto de la esterilización [28-30], y que a pesar del mismo origen geográfico de la materia prima, no es una matriz homogénea, que depende de condiciones geográficas y medioambientales [10, 20], lo que genera la variación en el punto inicial de los ensayos. Esto mismo puede observarse en el pH (3.75-4.32) y en la acidez inicial (230-515meq/kg). Igualmente el almacenamiento puede generar reacciones de deterioro o fermentación, lo que afecta los parámetros mencionados.

En la Figura 3-11 se observan las variaciones que existen en los distintos puntos de las fermentaciones para cada cepa, encontrándose que la cepa *S. cerevisiae* es la que tiene las mayores variaciones.

Analizando la Figura 3-11a solo existen diferencias significativas entre las cepas *L. acidophilus* y *S. cerevisiae* en la hora 12 de fermentación, donde la levadura presenta un aumento considerable que luego desciende por el consumo de algunos compuestos que aportan en la actividad antioxidante medida por FRAP. Respecto a la medición realizada por TEAC hay diferencias significativas en las horas 24 y 48. En la hora 24 se observa la similitud entre las cepas *L. plantarum* y *S. cerevisiae*, mientras que el cultivo mixto presentó disminución, lo que indica un efecto antagónico entre las cepas, mientras que la bacteria presenta diferencias posiblemente al consumo de algún compuesto antioxidante diferente a las otras cepas. Sin embargo en la hora 48 el cultivo mixto no presenta diferencias con ninguna de las cepas individuales, solo hay diferencias entre *L. acidophilus* y *S. cerevisiae*, debido al metabolismo microbiano. Comparando de forma general los resultados del cultivo mixto y las cepas individuales, se observa que en la actividad antioxidante (TEAC y FRAP) el efecto sinérgico de las cepas en el cultivo mixto no genera mejoras respecto a las cepas individuales.

Comparando el producto final (fermentación de 72 horas) con los valores de la materia prima inicial se observan diferencias significativas (Anexo C) en la actividad antioxidante total. Analizando las diferencias entre el producto final y el pan de abejas, se observan descensos en los parámetros de actividad antioxidante –TEAC-, afectado principalmente

por el contenido de fenoles totales, debido a que TEAC determina compuestos hidrofílicos y los fenoles tienen esta propiedad [73]. La actividad antioxidante por FRAP se vio incrementada, debido al aumento en el contenido de carotenoides totales, compuestos lipofílicos, que son determinados por este método.

El contenido de fenoles totales (Figura 3-11c) presenta diferencias significativas en la última hora de fermentación, principalmente entre el cultivo mixto y las bacterias ácido lácticas, este compuesto debe ser consumido en mayor cantidad por las bacterias y al existir un efecto combinado en el cultivo mixto se minimiza el consumo y por eso se genera la diferenciación. Comparando el cultivo mixto con las cepas individuales, este tiende a actuar similar a *S. cerevisiae*.

Comparando el producto final (fermentación de 72 horas) con los valores del polen inicial se observan diferencias significativas en el contenido de fenoles totales (ver Anexo C). El descenso en el contenido puede ser debido a degradación, por la diferencia de tiempo entre la realización de la esterilización y el inicio de la fermentación. Las diferencias entre el producto final y el pan de abejas, se dan con el descenso del contenido de fenoles totales en todas las cepas, excepto el cultivo mixto.

No siempre la actividad antioxidante está relacionada de forma directamente proporcional con el contenido de polifenoles [62, 99] algo usualmente aceptado, esto es debido a que no sólo dichos compuestos aportan en la actividad antioxidante. Se puede comprobar esto observando la cepa de *L. acidophilus*, en la cual la actividad antioxidante medida por FRAP y TEAC presenta comportamiento similares, mientras que el contenido de fenoles actúa de manera inversamente proporcional, principalmente en la hora 12 de la fermentación. En la cepa *S. cerevisiae* y el cultivo mixto se observan comportamientos similares en la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales, con un leve descenso en la hora 12 en los valores de polifenoles. También puede presentarse una relación directamente proporcional entre estos parámetros, tal como ocurre en los ensayos con *L. plantarum*.

En la Figura 3-11d se pueden observar las diferencias encontradas en las horas 12 y 72 para el contenido de carotenoides totales. En la hora 12 la similitud entre el cultivo mixto y la cepa *L. plantarum* está dada por la contribución de la bacteria más que la levadura en el cultivo mixto. La levadura después de las 12 horas presenta un aumento que sugiere la degradación de la exina y la liberación de los carotenoides, lo que genera similitud con el cultivo mixto en la hora final. Comparando globalmente, el efecto combinado presenta mejores resultados respecto a los microorganismos separados.

El producto final (fermentación de 72 horas) comparado con los valores de la materia prima inicial presenta diferencias significativas únicamente para el cultivo mixto (ver Anexo C). A pesar de no existir diferencias significativas en las otras cepas, se pueden apreciar los aumentos excepto para el ensayo con *L. acidophilus*. El contenido de carotenoides totales presenta variaciones respecto a la materia prima inicial, debido a que el tratamiento térmico genera la liberación de este nutriente. En la exina se han encontrado carotenoides como luteína, zeaxantina y β -caroteno [29-30, 33], que pueden ser liberados al romperse la estructura por efecto del tratamiento térmico (Figura 2-3) y la acción de microorganismos en la fermentación (Figura 3-6 a 3-9) [110]. En el tratamiento térmico se ha reportado la producción de isómeros de β -caroteno, generados por efecto de la luz y la temperatura [124], así como un posible rompimiento de la pared celular, que libera y aumenta el contenido de carotenoides totales. En tratamientos con infrarrojo se ha observado una variación respecto al contenido inicial, sin embargo a mayor tiempo de exposición se obtiene un contenido mayor [119]. La comparación del producto final con el pan de abejas presenta un resultado interesante, la obtención del producto natural se ha estudiado por varios autores, sin embargo no se han determinado con claridad las condiciones exactas del bioproceso así como todos los microorganismos que actúan en el, esto sugiere algún cambio adicional generado por condiciones o microorganismos diferentes a los utilizados en este trabajo, por tal razón el contenido de carotenoides totales difiere en esa magnitud.

La vitamina E (Figura 3-11e) presenta diferencias significativas en las horas 24 y 72 del proceso. El pico de producción generado por el ensayo con la levadura ocasiona las diferencias en la hora 12, sin embargo el cultivo mixto se comporta similar a ambas cepas. En la hora 72 la bacteria *L. plantarum* tiene un descenso que produce las

diferencias. De forma general el efecto del cultivo mixto presenta mejores resultados a las cepas individuales, excepto en la hora 12.

La comparación del producto final (fermentación de 72 horas) con la materia prima inicial no presenta diferencias significativas (ver Anexo C), sin embargo puede apreciarse el aumento en el contenido *L. plantarum*. La vitamina E es un compuesto que se ve afectado por los tratamientos térmicos, tal como lo menciona Hwang [124], quien sugiere que el rompimiento de la pared celular de la matriz ocasiona la liberación del compuesto.

En un estudio realizado por Vamanu en fermentación de polen apícola se encontró que la actividad antioxidante aumentaba después de 7 días de proceso [19], resultados que difieren a lo observado en este trabajo, donde se observó que el proceso fermentativo mantiene constante la actividad antioxidante (TEAC, FRAP), debido a la disminución del contenido de fenoles totales y a su vez el aumento del contenido de carotenoides totales y la vitamina E.

Adicional a las diferencias en cada uno de los puntos (tiempos de fermentación) del proceso, se realizó un análisis global comparando las características bioactivas entre las cepas, mediante un análisis de varianza ANOVA seguido de la prueba de comparación, encontrando diferencias significativas entre todas las cepas en todos los compuestos.

Tabla 3-4: Comparación de los compuestos bioactivos entre las distintas cepas*.

| | TEAC (mM Trolox/g polen) | FRAP (mM Trolox/g polen) | Fenoles totales (mg ácido gálico/g polen) | Carotenoides (mg β-caroteno/kg polen) | Vitamina E (μg α-tocoferol/g polen) |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>L. plantarum</i> | 0.056±0.004 a | 0.069±0.005 ab | 6.41±0.58 a | 2388±180 ab | 98±24 a |
| <i>L. acidophilus</i> | 0.044±0.008 b | 0.064±0.004 a | 5.82±0.69 a | 1931± 595 a | 158±32 b |
| <i>S. cerevisiae</i> | 0.065±0.012 c | 0.074±0.010 b | 8.78±1.52 b | 2072±630 a | 155±49 b |
| Cultivo mixto | 0.050±0.004 ab | 0.067±0.005 a | 8.96±0.36 b | 2611±269 b | 172±33 b |

*Resultados en base seca. Letras distintas en una misma columna para cada tratamiento indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%.

Realizando una comparación de los resultados del cultivo mixto con las cepas individuales (Tabla 3-4), se puede observar que la actividad antioxidante y el contenido de carotenoides totales presentan similitud con los resultados de la cepa *L. plantarum*, contradiciendo los resultados para el contenido de fenoles totales y vitamina E, en el cual la similitud está con la cepa *S. cerevisiae*. Lo anteriormente analizado permite concluir que en el cultivo mixto hay una acción conjunta de las dos cepas sobre los distintos compuestos bioactivos. Así mismo se puede decir que el cultivo mixto permite obtener un producto final con mayores contenidos de carotenoides totales, fenoles totales y vitamina E en la fermentación en fase sólida de polen apícola, y que el bioproceso, de acuerdo a la comparación con el polen inicial, genera cambios bioquímicos, que afectan dichos parámetros.

Observando el aumento en la vitamina E y el contenido de carotenoides totales, así como el correspondiente incremento en la actividad antioxidante (FRAP), puede encontrarse una relación con el cambio generado en la estructura del polen observado en las Figuras 2-3 y 3-6 a 3-9. En el transcurso de la fermentación la exina va degradándose dejando el contenido interno del polen expuesto; igualmente la estructura de la exina va cambiando, promoviendo la liberación de los compuestos mencionados.

Debido a que los parámetros sensoriales son importantes en el desarrollo de un producto se evaluaron los cambios de color y de perfil aromático durante el proceso de fermentación, obteniéndose los siguientes resultados.

Figura 3-12: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con *L. plantarum*.

En (a) se presenta los resultados del *score plot* a lo largo del proceso y en (b) el *loading plot* presenta los sensores de la nariz electrónica (variables).

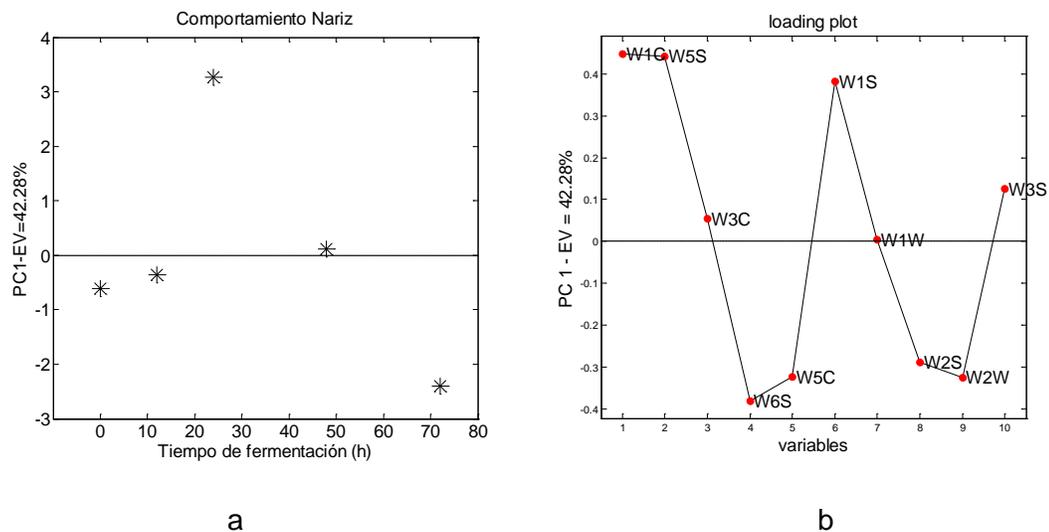


Figura 3-13: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con *L. acidophilus*.

En (a) se presenta los resultados del *score plot* a lo largo del proceso y en (b) el *loading plot* presenta los sensores de la nariz electrónica (variables).

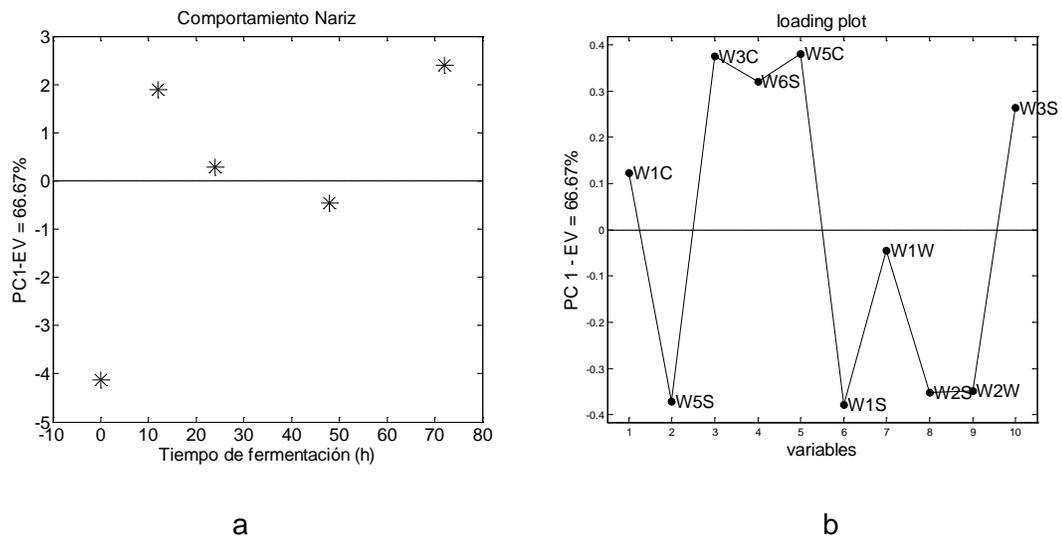


Figura 3-14: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con *S. cerevisiae*.

En (a) se presenta los resultados del *score plot* a lo largo del proceso y en (b) el *loading plot* presenta los sensores de la nariz electrónica (variables).

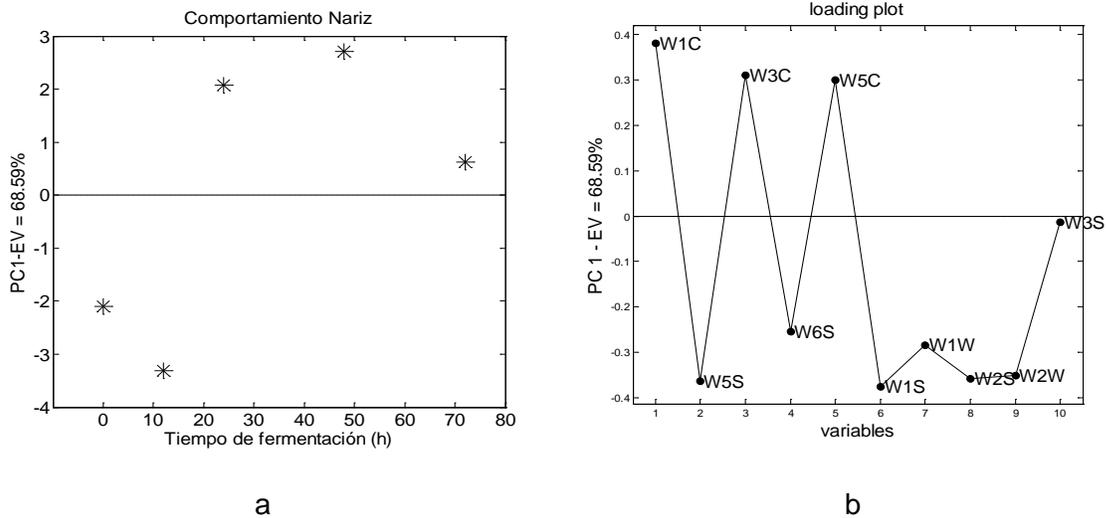
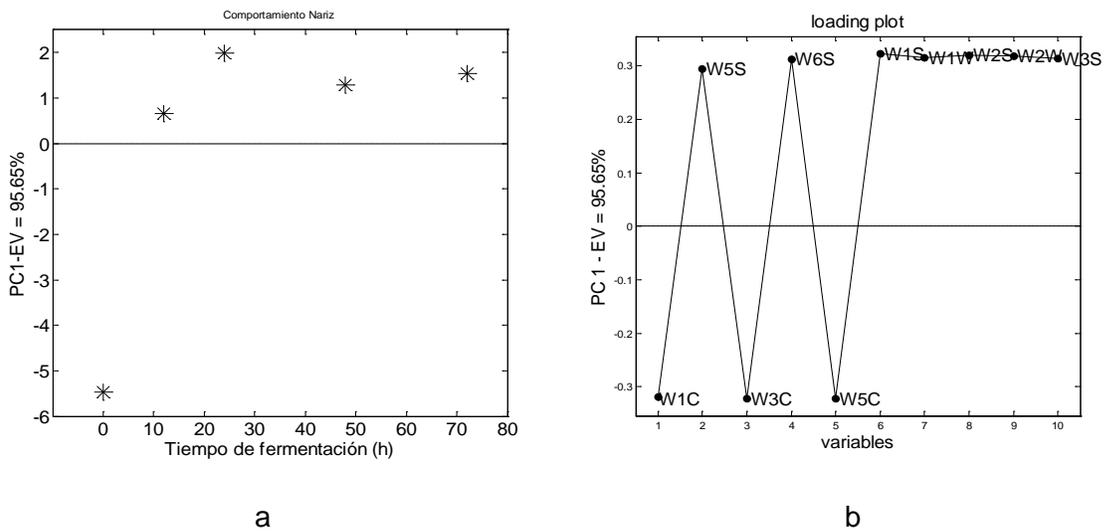


Figura 3-15: Comportamiento del perfil aromático a lo largo de la fermentación con el cultivo mixto.

En (a) se presenta los resultados del *score plot* a lo largo del proceso y en (b) el *loading plot* presenta los sensores de la nariz electrónica (variables).



En la Figura 3-12 se observa que para la cepa de *L. plantarum* el primer componente explica el 42.3% de la varianza de los datos y analizando la relación con las variables se puede encontrar que en el inicio y final de la fermentación los sensores con mayor respuesta son los asociados a compuestos aromáticos y alifáticos, azufrados, clorados y alcoholes (sensores W5C, W6S, W2W y W2S). La mayor tasa de cambio del componente principal 1 se encuentra entre las 12 y 24 horas, lo que se puede interpretar como el rango de tiempo de mayor producción de aroma; en este punto, hay prevalencia de compuestos aromáticos y nitrogenados e hidrocarburos de cadena corta (W1C, W5S y W1S). Los sensores W3C, W1W y W3S no tienen relevancia en la diferenciación de las etapas de la fermentación.

En la Figura 3-13 el primer componente explica el 66.7% de la varianza de los datos para la cepa *L. acidophilus*, encontrando que los sensores W1W y W1C no tienen relevancia para la diferenciación de las etapas mientras que los sensores W3C, W5C, W3S y W6S (compuestos aromáticos, alifáticos e hidrógeno) son los que presentan mayor respuesta para la hora 12 y el punto final de la fermentación. En el punto inicial se observan compuestos nitrogenados, alcoholes, azufrados, clorados e hidrocarburos de cadena corta (W5S, W2S, W2W y W1S), punto donde inicia la mayor producción aromática (0-12 horas).

La cepa *S. cerevisiae* (Figura 3-14) presenta una varianza de los datos del 68.6% en el primer componente. Compuestos nitrogenados, azufrados, clorados, alcoholes, hidrógeno, hidrocarburos de cadena corta (W5S, W1W, W2W, W2S, W6S y W1S) están relacionados con las primeras horas de fermentación (0-12h), mientras que compuestos aromáticos y alifáticos (W1C, W3C y W5C) influyen en el transcurso del proceso desde las 24 horas hasta el punto final. Se puede observar la mayor tasa de cambio del componente principal 1 entre las 12 y 24 horas, es decir, mayor producción aromática.

En la Figura 3-15 el 95.7% de la varianza de los datos está explicada por el componente principal 1 para la fermentación realizada con el cultivo mixto (*L. plantarum* y *S. cerevisiae*). Los sensores W5S, W3S, W1W, W2W, W2S, W6S y W1S (compuestos nitrogenados, alifáticos, azufrados, clorados, alcoholes, hidrógeno, hidrocarburos de

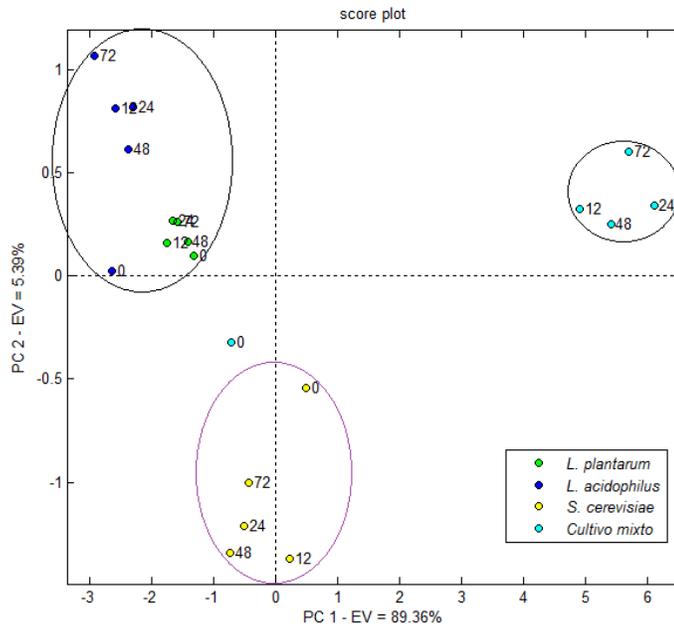
cadena corta) presentan una respuesta mayor en las horas 24, 48 y 72, mientras que el punto inicial tiene una producción predominante de compuestos aromáticos y alifáticos (W1C, W3C y W5C). El mayor pico de producción aromática se encuentra entre el inicio y la hora 12 de la fermentación.

Comparando el comportamiento de los distintos cultivos (Figura 3-16) se observa que los dos primeros componentes principales explican el 94.8% de la varianza de los datos, encontrando similitud entre las bacterias del género *Lactobacillus* influenciada por los sensores W1C, W3C y W5C (compuestos aromáticos y alifáticos), mientras que el cultivo mixto tiene una mayor relación con el sensor W6S (principalmente hidrógeno). Al pertenecer al mismo género y realizar el proceso fermentativo sobre el mismo sustrato, las bacterias evaluadas presentan respuestas similares, debido posiblemente a que siguen rutas metabólicas semejantes y los productos generados tienen características parecidas [69]. Es posible notar la diferencia entre los cultivos individuales y el mixto, concluyendo así que la producción de compuestos aromáticos está influenciada por las distintas cepas y realizar la mezcla genera productos totalmente diferentes, debido a un efecto sinérgico entre las dos cepas; sin embargo se observa la similitud entre el punto inicial de las cepas individuales y el ensayo con la mezcla, dado que los microorganismos no han empezado su desarrollo, y por ende la producción de aroma es parecida en todas las cepas.

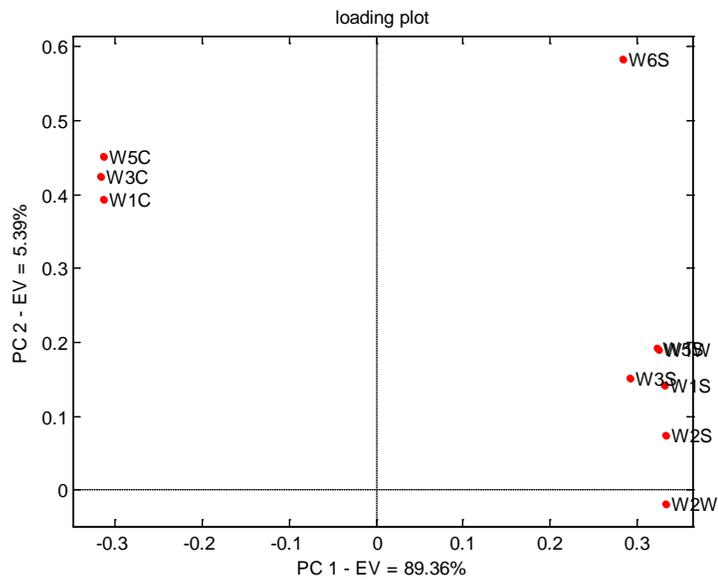
En diversos estudios se ha reportado el uso de la nariz electrónica para seguimientos de procesos de fermentación [125-126].

Figura 3-16: Comparación del perfil aromático entre las diferentes cepas.

En (a) se presentan los resultados del *score plot* a lo largo del proceso. En (b) se muestra el *loading plot* del análisis en donde se ubican los sensores de la nariz electrónica (variables).



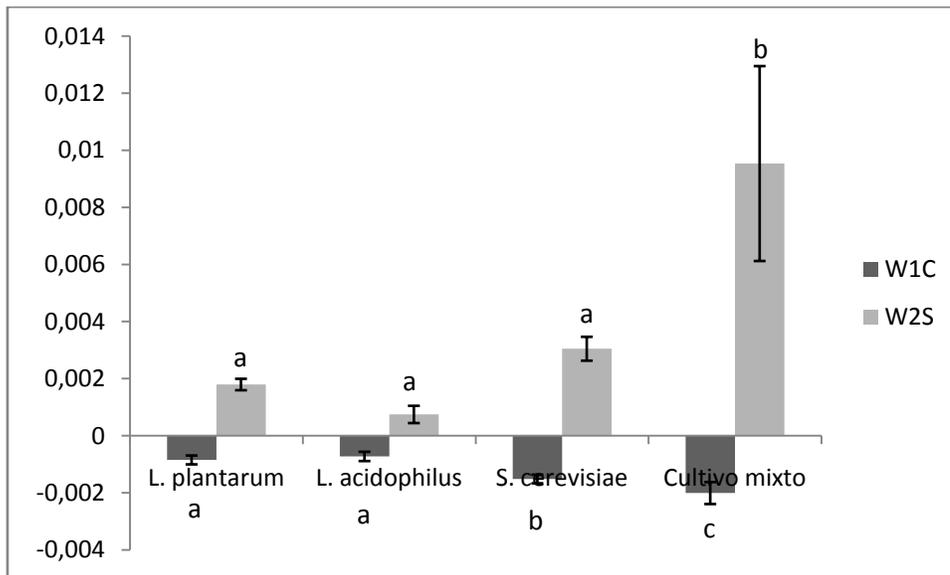
(a)



(b)

La estadística anterior permitió hacer un análisis cualitativo entre las cepas individuales y el cultivo mixto, de acuerdo a la respuesta de los distintos sensores, por tanto se escogieron los sensores W1C (cepas individuales) y W2S (cultivo mixto) para evaluar si existen diferencias estadísticas entre los distintos cultivos. En la Figura 3-17 se presentan los resultados.

Figura 3-17: Análisis de varianza entre los sensores W1C y W2S.

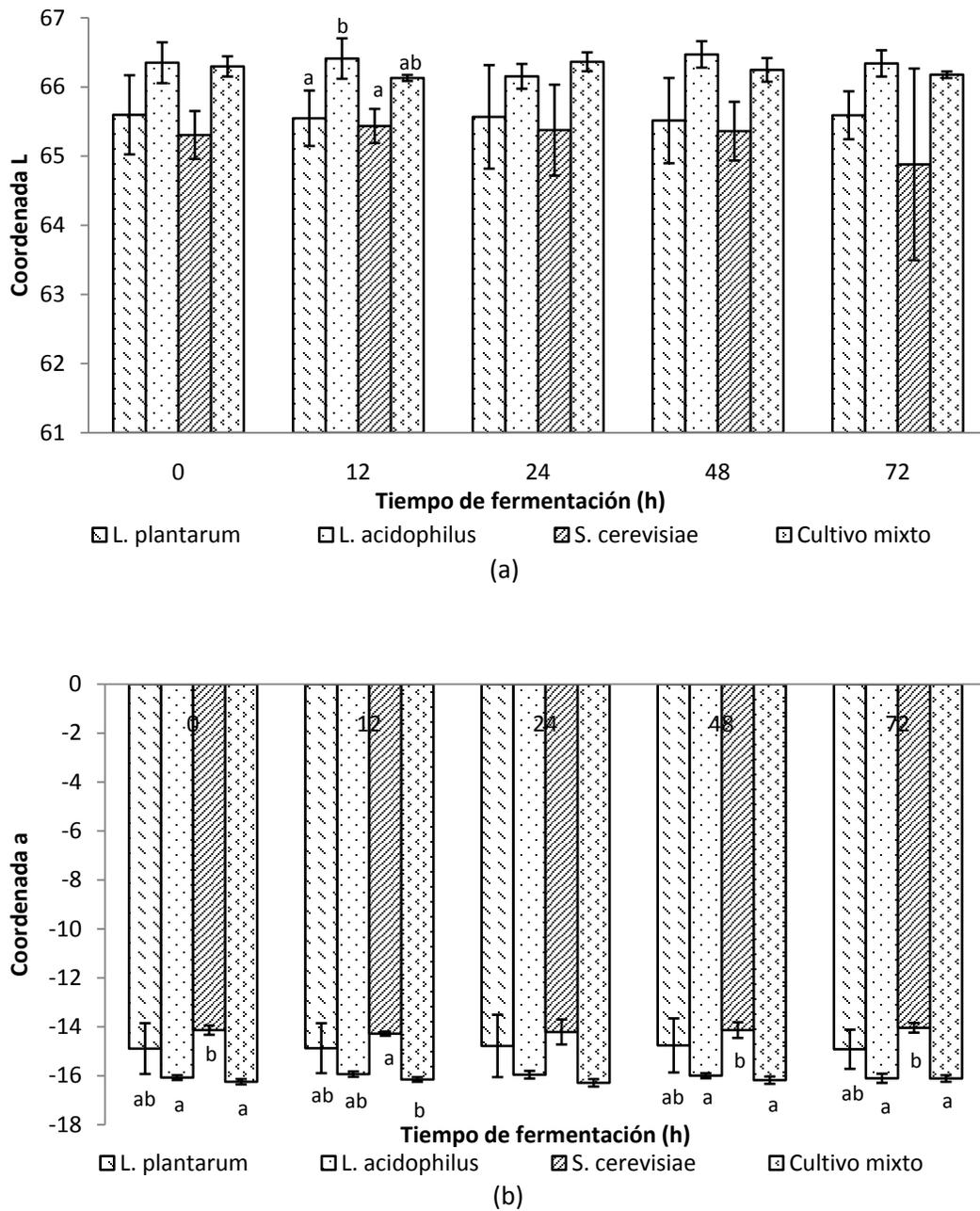


En ambos sensores se observa que existe una diferencia significativa entre las cepas individuales y el cultivo mixto, sin embargo el sensor W1C diferencia también las cepas de bacterias de la levadura, lo que confirma el análisis de datos realizado mediante PCA, en el que se diferencian claramente 3 grupos: bacterias, levadura y cultivo mixto. Esto permite concluir que la nariz electrónica es capaz de diferenciar productos fermentados de acuerdo a la cepa inoculada.

Evaluando el color se obtuvieron los parámetros en coordenadas CIELab, encontrando que no había diferencias significativas a lo largo del proceso para ninguna de las cepas en ninguna de las coordenadas. Igualmente en la coordenada b no existieron diferencias significativas entre las cepas en los distintos tiempos evaluados (ver Anexo C).

Figura 3-18: Parámetros de color en las distintas cepas analizadas.

En (a) la coordenada L y en (b) la coordenada a.



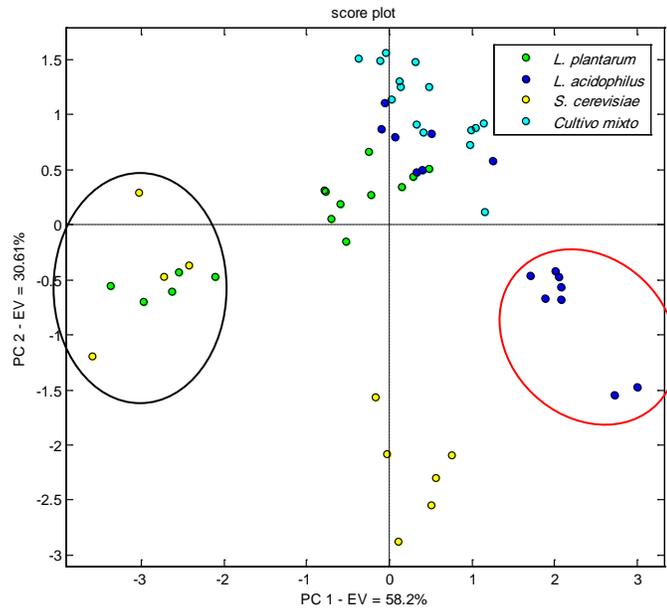
Tanto en la coordenada *L* como en la coordenada *a* se observaron diferencias significativas entre las cepas en distintos momentos de la fermentación. Se observa que en *a* los ensayos del cultivo mixto presenta similitudes con los de la cepa *L. plantarum*, y que las fermentaciones con *L. acidophilus* y el cultivo mixto son las que presentan más coloraciones verdosas (menor valor de *a*).

De acuerdo a bibliografía, el contenido de carotenoides totales está relacionado con el color medido mediante coordenadas CIELab, especialmente con las coordenadas *a* (tonalidades rojo a verde) y *b* (tonalidades azul a amarillo) [106], por tanto se realizó un análisis de componentes principales, para evaluar la relación entre estos parámetros en las fermentaciones con cada una de las cepas.

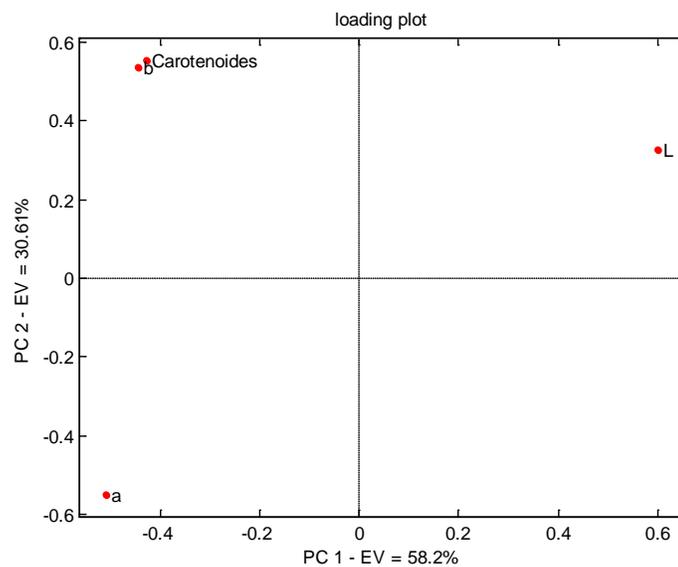
En la Figura 3-19 se observa que los dos primeros componentes explican el 88.8% de la varianza de los datos. Respecto a la coordenada *L* se aprecia que las muestras de la fermentación con *L. acidophilus* presentan más luminosidad, comparadas con las que están en el lado negativo del componente principal 1 (eje *x*). Algunas muestras de *L. plantarum* y *S. cerevisiae* (círculo negro) están influenciadas por el contenido de carotenoides totales y la coordenada *b*, relacionadas con las tonalidades amarillas del polen. La mayoría de las muestras de fermentación tienen poca influencia de la coordenada *a*.

Figura 3-19: Correlación entre el contenido de carotenoides totales y las coordenadas de color.

En (a) se presentan los resultados del *score plot* a lo largo del proceso. En (b) se muestra el *loading plot* del análisis en donde se ubican las variables analizadas.



(a)



(b)

Estudios reportan la relación entre el contenido de carotenoides totales y la coordenada *b*, a menor contenido de carotenoides menor valor en dicha coordenada. Los ensayos con *L. acidophilus* y *S. cerevisiae* son los que presentan los menores valores en la coordenada *b*, es decir, son los menos amarillos, por tanto su contenido de carotenoides totales debería ser menor que en los otros ensayos, lo que puede verificarse en la Tabla 3-4. Estos resultados son acordes a lo reportado por Contreras [110], quien encontró diferencias significativas entre pólenes con coloraciones amarillas y naranjas.

Meléndez [106] reporta las coordenadas de color para extractos de β -caroteno: L (95.84), *a* (-3.11) y *b* (44.89) y realizando la comparación con los extractos de las muestras de polen, se observa la cercanía a los valores de las coordenadas *a* y *b* de las fermentaciones, lo que demuestra la relación entre el contenido de carotenoides totales y el color. Igualmente encontró una correlación entre las coordenadas de color y los carotenoides, especialmente diferenciado por los dobles enlaces conjugados de su estructura.

En la siguiente Tabla se muestra el análisis comparativo entre las distintas cepas para cada una de las coordenadas del espacio CIELab.

Tabla 3-5: Comparación de las coordenadas de color entre las cepas evaluadas.

| | L | a | b |
|------------------------------|--------------|---------------|---------------|
| <i>L. plantarum</i> | 65.56±0.47 a | -14.84±0.89 a | 68.37±1.14 ac |
| <i>L. acidophilus</i> | 66.34±0.23 b | -16.01±0.13 b | 64.82±3.51 b |
| <i>S. cerevisiae</i> | 65.27±0.59 a | -14.16±0.24 c | 64.80±5.16 b |
| Cultivo mixto | 66.24±0.13 b | -16.19±0.13 b | 67.16±1.43 bc |

Estadísticamente se encontraron diferencias significativas entre los distintos ensayos, sin embargo visualmente no se pueden diferenciar, lo que permite apreciar la dificultad del ojo humano para diferenciar el polen con colores semejantes (tonalidades amarillas y naranja); el proceso de homogenización afecta notoriamente esta capacidad, debido a que pellets de coloraciones amarillas, naranjas y verdosas son mezcladas. Sin embargo métodos instrumentales pueden llevar a cabo la diferenciación.

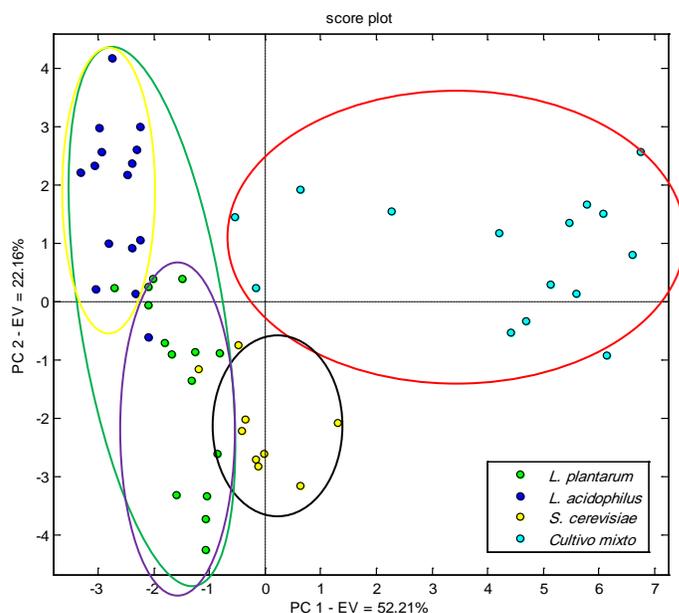
Las fermentaciones efectuadas por *L. acidophilus* y el cultivo mixto son las más opacas (menor valor de luminosidad L) y tienen mayores coloraciones verdosas (menor valor de a). La cepa *L. plantarum* y el cultivo mixto generaron mayores coloraciones amarillas.

Se encuentran similitudes comparando el color del producto final con un estudio realizado en polen colombiano por Durán, donde encontró que el polen del altiplano Cundiboyacense presenta tonalidades amarillo-verdosas [84].

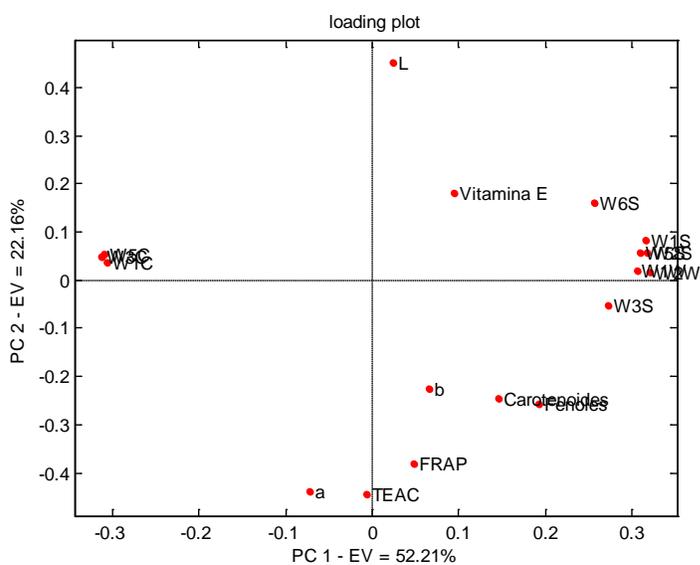
Con el fin de observar el comportamiento de las cepas de acuerdo a las variables bioactivas y sensoriales evaluadas se realizó un análisis de componentes principales, presentado en la Figura 3-20. Los dos primeros componentes explican el 74.4% de la varianza de los datos, sin embargo el segundo componente principal no aporta mucho en la descripción del comportamiento de las cepas con respecto a las variables planteadas, por tanto la luminosidad L no influencia a ninguna cepa. Los parámetros evaluados permitieron realizar la clasificación de las fermentaciones de acuerdo a la cepa utilizada. Se puede observar como los ensayos con las bacterias (*L. plantarum* y *L. acidophilus*) están mayormente influenciadas por los sensores de la nariz electrónica W1C, W3C y W5C (compuestos aromáticos y alifáticos), mientras que los de la levadura presenta mayores en los parámetros de color a y b, así como la actividad antioxidante (TEAC y FRAP). El ensayo con el cultivo mixto se diferencia de las cepas individuales por sus contenidos en Vitamina E y los restantes sensores de la nariz. Respecto al contenido de carotenoides y fenoles, se observa una relación entre ellos; los ensayos con el cultivo mixto y la levadura tienen un contenido apreciable, mientras que la fermentación con la bacteria *L. acidophilus* es la que presenta el menor contenido de estos compuestos, tal como se observa en la Figura 3-11d y 3-11c, respectivamente. Se puede apreciar que las bacterias se agrupan (círculo verde), debido a la producción de compuesto similares entre ellas [69].

Figura 3-20: Comparación de los compuestos bioactivos y sensoriales de los sustratos fermentados entre las distintas cepas de microorganismos evaluados.

En (a) se presentan los resultados del *score plot*. En (b) se muestra el *loading plot* del análisis en donde se ubican los diferentes análisis (variables).



(a)



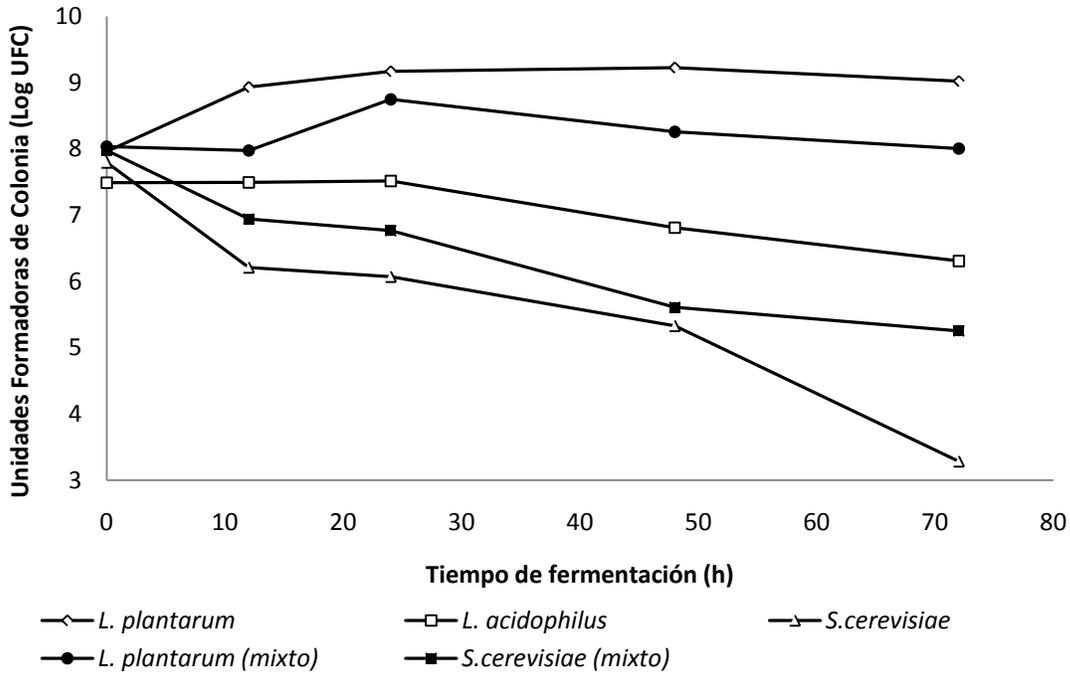
(b)

La prueba estadística de Wilk's Lambda es una medida de la calidad de separación entre clases; es una generalización multivariada de la distribución F univariada, siendo comúnmente usada en bases de datos en las que se desea seleccionar variables de manera gradual mediante la inclusión de aquellas que mayor capacidad discriminante posean [127]. En este caso, el análisis permite encontrar las variables que mayor aportan en la descripción de los ensayos de fermentación; el análisis encontró que los sensores W3C, W5C, W1S, W2S y la coordenada de color *a* son los que permiten una mejor separación entre productos obtenidos en el proceso de fermentación por cada cepa evaluada.

Finalmente se realizó el conteo de células viables en las distintas cepas. Igualmente se realizaron fotografías de las cepas ATCC y las obtenidas en los ensayos de fermentación para corroborar la cepa utilizada (ver Anexo D.)

En la Figura 3-21 se puede observar como la cepa de *L. plantarum* es la que presenta una mayor producción de biomasa ($\sim 10^9$ ufc/g), manteniéndose hasta el final de la fermentación, en comparación con las cepas de *L. acidophilus* y *S. cerevisiae* que descendieron hasta valores aproximados de 10^6 y 10^3 ufc/g, respectivamente. Analizando el cultivo mixto (*L. plantarum* y *S. cerevisiae*) se observa que la bacteria presenta recuentos inferiores, contrariamente a la levadura respecto a las cepas individuales.

Figura 3-21: Cinética de crecimiento de los distintos microorganismos.



Los resultados obtenidos están acordes con lo realizado por Fuenmayor, quien encontró que después de 24 horas la viabilidad celular del cultivo *L. acidophilus* empieza a descender [7].

La diferencia en la cantidad de biomasa generada por las dos bacterias se debe principalmente a la ruta metabólica seguida: *L. acidophilus* es una bacteria homofermentativa, que utiliza únicamente la glucosa como fuente de energía y realiza el proceso fermentativo mediante la glucólisis o el mecanismo Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), mientras que *L. plantarum* sigue esa misma ruta aprovechando el mismo sustrato o también puede seguir la ruta derivación de hexosa-monofosfato (Hexose Monophosphate Shunt - HMS) en la cual utilizan hexosas pero también pueden utilizar pentosas [64, 80, 103, 114]. Igualmente se ha encontrado que el *L. plantarum* puede metabolizar la lactosa [80], lo que le da al microorganismo otra fuente de energía. Al tener una mayor disponibilidad de nutrientes *L. plantarum* tiene más posibilidades de aumentar su biomasa, igualmente es una bacteria que puede tolerar valores de pH inferiores a los de la mayoría de bacterias [64, 69], el pH inferior debido a la producción de ácido láctico no afecta su desarrollo por lo que su tiempo de supervivencia en el

sustrato es mayor. Igualmente el *L. plantarum* ha sido utilizado en procesos de ensilaje, que utilizan una fermentación en fase sólida para realizar la conversión, por tal razón son microorganismos que se adaptan más fácilmente a sustratos complejos [14, 67], mientras que *L. acidophilus* se utiliza mayormente en productos más sencillos, como en la producción de bebidas fermentadas. Dado que el polen es un sustrato complejo el *L. plantarum* puede realizar el bioproceso de forma más efectiva y aprovechar mejor los nutrientes.

S. cerevisiae utiliza la glucosa para la generación de energía mediante la ruta EMP [64, 103], y debido que el polen posee los nutrientes al interior del grano, la levadura debe terminar de degradar la exina para obtener más sustrato, por lo cual la falta de glucosa actúa como nutriente limitante y afecta la supervivencia de la levadura. Observando los resultados del cultivo mixto se aprecia la sinergia entre los dos cultivos: la población de *S. cerevisiae* aumenta respecto a la fermentación con la cepa individual mientras que la de *L. plantarum* desciende. Es posible que la ruta seguida por el cultivo mixto sea la degradación de la exina por parte de la bacteria, con lo cual la levadura aprovecha las hexosas liberadas manteniendo la sobrevivencia de la población en el tiempo; al degradar la exina la bacteria empieza a utilizar las hexosas (después de 12 horas) y su biomasa aumenta hasta las 24 horas, después el crecimiento empieza a descender en ambos microorganismos. En la levadura la disminución poblacional es menos marcada que en el ensayo de la cepa individual. Es importante tener en cuenta que ambos microorganismos utilizan fosfatos para su crecimiento [128-129], por tanto entran en competencia por el nutriente y eso también ocasiona el comportamiento observado (disminución en la bacteria y aumento en la levadura). Igualmente la bacteria puede obtener energía de otros compuestos como lactosa o pentosas [64, 80, 103, 114] lo que le permite aumentar y mantener su población.

Evaluando el potencial probiótico de las cepas trabajadas se puede asumir que sólo las bacterias tienen las condiciones necesarias para considerarse probióticas, ya que su población está en el rango 10^6 - 10^9 [104, 130] necesario para tener esta característica. Sin embargo se observa que la cepa *L. plantarum* mantiene su biomasa por un periodo de tiempo mayor, importante para la administración y paso por el sistema digestivo.

La fermentación en fase sólida es un bioproceso que necesita de condiciones específicas para su óptimo desarrollo dependiendo del microorganismo que va a efectuar la transformación. Evaluando la composición del sustrato y temperatura en las cepas *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *S.cerevisiae* y un cultivo mixto (*L. plantarum* y *S.cerevisiae*) en la fermentación en fase sólida de polen apícola, se encontró que para la cepa *L. plantarum* y el cultivo mixto las mejores condiciones son una temperatura de incubación de 35°C en un sustrato polen:agua 1:1, mientras que para la cepa *L. acidophilus* la temperatura óptima fue de 40°C trabajando en el mismo sustrato y la levadura reportó mejores condiciones a 35°C en el sustrato polen:agua 2:1. Realizada la selección de las mejores condiciones de proceso se evaluaron parámetros bioactivos, microestructurales, sensoriales y cinéticos para seleccionar la mejor cepa encontrando que el cultivo mixto es el que presenta mayores contenidos de vitamina E, contenido de carotenoides totales y fenoles totales, igualmente mantiene la población microbiana en valores que caracterizan el producto obtenido como un alimento probiótico ($\sim 10^8$ ufc/g). Teniendo en cuenta los costos de la materia prima, puede usarse únicamente la cepa *L. plantarum*, que presenta características bioactivas ligeramente menores al cultivo mixto pero considerablemente mejores a la materia prima, además mantiene también la población microbiana, con lo cual se considera un producto probiótico ($\sim 10^9$ ufc/g).

De acuerdo a las características bioactivas y probióticas del nuevo producto, puede ser utilizado como suplemento nutricional o incluido en alimentos de consumo diario, para mejorar las deficiencias nutricionales actuales.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El polen apícola es un sustrato complejo, su contenido de proteína (24.9%), grasa (5.78%), cenizas (2.39%), actividad antioxidante (0.041 y 0.052mM trolox/g para TEAC y FRAP, respectivamente), fenoles totales (16.28mg ácido gálico/g), carotenoides totales (2149mg β -caroteno/kg) y vitamina E (119 μ g α -tocoferol/g) lo hacen una buena fuente de nutrientes para el desarrollo de microorganismos, además de tener aptitud tecnológica para realizar un bioproceso con posibilidad de escalar a nivel industrial.

El polen apícola necesita operaciones de acondicionamiento previas al proceso, para mejorar la acción de los microorganismos, como tamizado para eliminar impurezas macroscópicas, tratamientos térmicos para disminuir la carga microbiana, aumentar la vida útil y realizar un escalamiento de las cepas. Para el escalamiento se utilizó una relación de polen-caldo nutritivo 1:10, dado que no existieron diferencias significativas con las otras relaciones evaluadas.

El tratamiento térmico con mayor efectividad para eliminar la carga microbiana inicial del polen apícola es una esterilización efectuada a 121°C durante 15 minutos, ensayo con resultado satisfactorio en la prueba de esterilidad comercial. Tratamientos térmicos más suaves no permiten obtener las condiciones necesarias para el buen desarrollo del bioproceso.

La actividad antioxidante del polen apícola es favorecida por el tratamiento térmico de esterilización (121°C por 15 minutos), originada debido a la reacción de Maillard, a la presencia de carotenoides contenidos en el sustrato que son beneficiados por efecto de la temperatura, aumentando su actividad. La microestructura del polen sufre cambios

que favorecen el proceso de fermentación, debido a que degrada parcialmente la exina y los microorganismos pueden utilizar los nutrientes que se liberan del sustrato.

Durante este trabajo se estandarizaron las condiciones del proceso de fermentación en fase sólida con polen apícola proveniente de boque andino en el altiplano cundiboyacense, determinado por el aumento de acidez en los ensayos y el comportamiento cinético de cepas comerciales de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y una mezcla. Los factores que mayor influencia tienen sobre el proceso son la temperatura y la composición del sustrato en función del microorganismo.

La evaluación de la mayor acidez producida por las cepas estudiadas no tiene diferencia significativa por influencia de la relación polen:agua y la temperatura de incubación utilizada.

La acidez final expresada en meq/kg polen del sustrato fermentado con *Saccharomyces cerevisiae* no tiene diferencias significativas con el pan de abejas natural, sin embargo la acidez del producto final obtenido de la fermentación con *Lactobacillus acidophilus* y el cultivo mixto son iguales entre sí pero diferentes al pan de abejas natural. Finalmente la acidez del producto final obtenido de la fermentación con *Lactobacillus plantarum* es la más alta obtenida en todos los procesos de fermentación, diferente a la acidez del pan de abejas natural y a la acidez de los productos finales de las otras cepas estudiadas.

Evaluando la composición del sustrato y temperatura en las cepas *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* y un cultivo mixto (*Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae*) en la fermentación en fase sólida de polen apícola, se encontró que para la cepa *Lactobacillus plantarum* y el cultivo mixto las mejores condiciones son una temperatura de incubación de 35°C en un sustrato polen:agua 1:1, mientras que para la cepa *Lactobacillus acidophilus* la temperatura óptima fue de 40°C trabajando en el mismo sustrato y la levadura reportó mejores condiciones a 35°C en el sustrato polen:agua 2:1.

El proceso de fermentación en fase sólida no genera cambios significativos en la actividad antioxidante evaluada por los métodos de TEAC y FRAP, el contenido de carotenoides totales, fenoles totales y el color a lo largo del proceso, mientras que la microestructura, el contenido de la vitamina E y el perfil aromático obtenido mediante la nariz electrónica si muestran cambios significativos.

La acción de las cepas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 generan diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. La actividad antioxidante evaluada mediante TEAC presenta similitud entre las fermentaciones realizadas con el cultivo mixto y las cepas *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus*, sin embargo las cepas individuales presentan diferencias entre sí. La actividad antioxidante evaluada mediante FRAP es similar entre todas las cepas excepto para *Saccharomyces cerevisiae*. El contenido de fenoles totales presenta diferencias significativas entre las cepas de bacterias y las otras cepas analizadas. El contenido de carotenoides totales difiere entre los ensayos del cultivo mixto con las cepas *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, pero es similar al de la cepa *Lactobacillus plantarum*. La vitamina E sólo presenta diferencias significativas entre la cepa *Lactobacillus plantarum* respecto a las demás.

En el cultivo mixto hay una acción conjunta de las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae* sobre los compuestos bioactivos del polen apícola, mostrando incrementos en el contenido de carotenoides totales, fenoles totales y vitamina E durante el proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola.

La microestructura del polen apícola presenta cambios debido al proceso de fermentación en fase sólida, evidenciados en la degradación de la exina. La fermentación genera mayores cambios en la microestructura que el tratamiento térmico de esterilización.

El monitoreo del perfil aromático del bioproceso explica entre un 42.3% y un 95.7% de la varianza de la información y permite diferenciar el comportamiento del sustrato frente a cada cepa utilizada, identificando el grupo de compuestos que mayor influencia tienen durante el tiempo de proceso, así como las tasas de cambio más significativas.

Un análisis de componentes principales permite comparar el comportamiento del perfil aromático de los distintos cultivos, explicando el 94.8% de la varianza de los datos, encontrando similitud entre las bacterias del género *Lactobacillus*. Se diferencia claramente entre los cultivos individuales y el mixto, la producción de compuestos aromáticos está influenciada por las distintas cepas y realizar la mezcla genera productos totalmente diferentes, debido a un posible efecto sinérgico de las cepas del cultivo mixto.

El contenido de carotenoides y la coordenada de color *b* tienen una correlación directa en los sustratos de polen fermentados.

Las variables sensoriales que mayor aportan en la descripción de los ensayos de fermentación y que permiten diferenciar los productos finales son los sensores de la nariz electrónica W3C, W5C, W1S, W2S (compuestos aromáticos y alifáticos, hidrocarburos de cadena corta y alcoholes) y la coordenada de color *a*.

La fermentación en fase sólida de polen apícola en un sustrato con relación polen agua 1:1 incubado a 35°C, que utiliza *Lactobacillus plantarum* tiene el mayor incremento de acidez de las cepas estudiadas, es la que genera mayor carácter probiótico de acuerdo a la población microbiana final obtenida y la que presenta mayor estabilidad en el tiempo.

El estudio selecciona el cultivo mixto con la adición de un inóculo de 10^8 ufc/g en un sustrato polen:agua 1:1 incubado a 35°C como las mejores condiciones de proceso, de acuerdo a los resultados obtenidos tanto en el monitoreo de las características bioactivas como en el conteo de la población microbiana final.

4.2 Recomendaciones

Realizar la determinación de carbohidratos fermentables, para evaluar cuáles son los utilizados por los diferentes microorganismos en la fermentación en fase sólida.

Realizar la determinación de los aminoácidos en polen apícola a lo largo del proceso de fermentación, para ver el efecto sobre el proceso y el crecimiento microbiano.

Analizar el contenido de ácidos orgánicos en la fermentación, para realizar el seguimiento de crecimiento microbiano mediante el monitoreo del producto del metabolismo.

Realizar el bioproceso utilizando cultivo de microorganismos nativos, es decir, aislados de pan de abejas.

Realizar un perfil de las sustancias que aportan en el contenido de carotenoides y vitamina E, con el fin de observar cuáles son las que generan los cambios observados después del tratamiento térmico y la fermentación.

Evaluar el tiempo en el cual el producto pierde la calidad probiótica realizando fermentaciones hasta la disminución de la población microbiana a valores menores a 10^6 ufc/g.

Evaluar la adición del polen apícola fermentado en matrices alimenticias como productos lácteos, de bollería o de frutas, mediante el desarrollo de procesos y nuevos productos para mejorar la calidad nutricional y bioactiva.

Realizar pruebas *in vivo* para observar la biodisponibilidad y biodigestibilidad de los nutrientes y componentes con características funcionales.

A. Anexo: Fichas técnicas de los microorganismos utilizados.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| <p>Specifications Microorganism Name: <i>Lactobacillus acidophilus</i> Catalog Number: 0043 Lot Number: 243-26 Reference Number: ATCC® 4356™ Purity: ~ 0.1% Total Pellet CFU Recovery: N/A (Pellet is grown in MRS broth) Passage from Reference: 4</p> | | <p>Expiration Date: 2013/08 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Mum Release Date: 2011/9/14</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|---|---------|-------------------------|---|-------------|---|-------------------------|---|----------------------------|---|-------------|---|----------|---|--------------------|---|----------------------------|---|------------------------|---|----------------------|---|------------|---|-------------------|---|-----------|---|------------|---|-----------------|---|--------------------------------|---|-----------------------|---|-------|---|-------------------|---|--------------|---|-------|---|--------------------|---|-------------|---|------------------|---|---|---|------------------------|---|--------------------|---|------------|---|---------------------|---|---------------------|---|----------|---|----------|---|-------------|---|-------------|---|-------------------|---|-------------------|---|------------|---|--------------------|---|-------------------|---|--------|---|----------|---|--|
| Performance | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Macroscopic Features: Two colony types are present. The predominant colonies are medium to large, circular to slightly irregular, low convex, erose edge and rough; the other type is small, circular, convex, entire edge and smooth. Colonies are translucent and weakly alpha hemolytic.</p> <p>Microscopic Features: Gram positive rods with rounded ends, occurring singly in pairs, end in short chains.</p> | | <p>Medium:</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Vitek CBC (1)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ORNITHINE DECARBOXYLASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Phenylethylene ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ARGININE GP</td><td>-</td></tr> <tr><td>PYRUVATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SUCCINATE alkalisation</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-G LUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-G LUCOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-XYLOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>OPT29 RESISTANCE (comp.vibrio)</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>URASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MELEZITOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>URASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>CITRATE (SODIUM)</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide</td><td>-</td></tr> <tr><td>L LACTATE alkalisation</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-G LUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Glycine ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MALATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>MALTOTRIOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-GLUTAMINE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Phenylphosphonate</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-D-FUCOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>COURMARATE</td><td>+</td></tr> <tr><td>2-Fero-D-Glucosate</td><td>+</td></tr> <tr><td>ESCULIN hydrolyse</td><td>+</td></tr> <tr><td>ELLMAN</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-XULOSE</td><td>-</td></tr> </tbody> </table> | | Phenotypic Features | Results | Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | + | D-GALACTOSE | - | ORNITHINE DECARBOXYLASE | - | Phenylethylene ARYLAMIDASE | + | ARGININE GP | - | PYRUVATE | - | BETA-GALACTOSIDASE | - | L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | SUCCINATE alkalisation | - | Tyrosine ARYLAMIDASE | - | D-G LUCOSE | + | BETA-G LUCOSIDASE | + | D-MALTOSE | - | D-MANNITOL | - | BETA-XYLOSIDASE | - | OPT29 RESISTANCE (comp.vibrio) | + | L-Proline ARYLAMIDASE | - | URASE | - | ALPHA-MANNOSIDASE | - | D-MELEZITOSE | - | URASE | - | SACCHAROSE/SUCROSE | + | D-TREHALOSE | + | CITRATE (SODIUM) | - | 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide | - | L LACTATE alkalisation | - | ALPHA-G LUCOSIDASE | - | D-SORBITOL | - | ALPHA-GALACTOSIDASE | - | Glycine ARYLAMIDASE | - | D-MALATE | - | D-RIBOSE | - | MALTOTRIOSE | - | L-GLUTAMINE | - | Phenylphosphonate | - | BETA-D-FUCOSIDASE | + | COURMARATE | + | 2-Fero-D-Glucosate | + | ESCULIN hydrolyse | + | ELLMAN | - | D-XULOSE | - | <p>Other Features/Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative</p> <div style="text-align: center;">  Brad Godkovic, President AUTHORIZED SIGNATURE </div> |
| Phenotypic Features | Results | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-GALACTOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ORNITHINE DECARBOXYLASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phenylethylene ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARGININE GP | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PYRUVATE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-GALACTOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SUCCINATE alkalisation | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyrosine ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-G LUCOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-G LUCOSIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MALTOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MANNITOL | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-XYLOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| OPT29 RESISTANCE (comp.vibrio) | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Proline ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| URASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-MANNOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MELEZITOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| URASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SACCHAROSE/SUCROSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-TREHALOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CITRATE (SODIUM) | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L LACTATE alkalisation | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-G LUCOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-SORBITOL | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-GALACTOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Glycine ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MALATE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-RIBOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| MALTOTRIOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-GLUTAMINE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phenylphosphonate | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-D-FUCOSIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| COURMARATE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2-Fero-D-Glucosate | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ESCULIN hydrolyse | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ELLMAN | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-XULOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| | |
|---|--|
| <p>Specifications Microorganism Name: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Catalog Number: 0699 Lot Number: 639-88 Reference Number: ATCC® 9783™ Purity: > 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFU per Pellet Passage From Reference: 4</p> | <p>Expiration Date: 2015/10 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Mum Release Date: 2011/12/21</p> |
| <p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Mitek®: Although the Mitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="margin-right: 20px;">   TESTING CERT #2655.01 </div> <div> <p>(1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p>(2) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> </div> | |



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| | |
|--|--|
| <p>Specifications Microorganism Name: Lactobacillus acidophilus Catalog Number: 0243 Lot Number: 243-25 Reference Number: ATCC® 4356™ Purity: ~ 0.1% Total Pellet CFU Recovery: N/A (Pellet is grown in MRS broth) Passage from Reference: 4</p> | <p>Expiration Date: 2013/08 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Mum Release Date: 2011/01/14</p> |
| <p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p> TESTING CERT #2655.01</p> | |



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

| | |
|---|--|
| <p>Specifications: Microorganism Name: <i>Lactobacillus plantarum</i> Catalog Number: 0234 Lot Number: 234-23 Reference Number: ATCC® 8014™ Purity: > 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4</p> | <p>Expiration Date: 2014/02 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J. Stenoch Release Date: 2012/4/10</p> |
| <p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC styling marks are trademarks of ATCC, Microbiology, Inc. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>ACCREDITED TESTING CERT #2655.01</p> | |

B. Anexo: Procedimiento de activación de las cepas ATCC.

1. Dejar la bolsa que contiene la cepa sin abrir a temperatura ambiente.
2. Abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad.
3. Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta que debe ser colocada en la caja de Petri que contiene el agar. No desarmar el dispositivo durante la hidratación.
4. Apretar una sola vez la ampolla en la parte superior, situada en la tapa (debajo del menisco de líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
5. Sujetar en posición vertical y golpear sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido hacia la parte inferior que contiene el sedimento, permitiendo que todo el líquido hidrate el sedimento.
6. Triturar cuidadosamente el sedimento entre el líquido hasta lograr una solución homogénea.
7. Inmediatamente saturar completamente un hisopo en el material hidratado y transferir al medio de cultivo a un tercio del agar. Luego continuar la siembra por aislamiento con un asa bacteriológica.
8. Incubar a la temperatura y condiciones específicas de acuerdo con el microorganismo.
9. Después de transcurrido el tiempo de incubación de la cepa, tomar un inóculo con un asa bacteriológica e inocular en el medio conservante contenido dentro del vial de criopreservación.
10. Cerrar el vial y agitarlo suavemente para que la cepa se impregne en las crioperlas.
11. Extraer el medio conservante con una pipeta Pasteur estéril.
12. Cerrar el criovial y congelar.

C. Anexo: Análisis estadísticos.

Análisis complementarios al documento de tesis.

Acidez producida durante los ensayos de fermentación*.

| Acidez producida (meq/kg) | | | | | | |
|---------------------------|--------|---------------------|-----------------------|----------------------|----------------|----------------|
| Relación Polen:Agua | T (°C) | <i>L. plantarum</i> | <i>L. acidophilus</i> | <i>S. cerevisiae</i> | Cultivo mixto | |
| Polen Húmedo | 35 | -72.62±106.50 a | 96.08±12.11 a | 41.44±21.36 a | 38.36±10.96 a | |
| | | 2:1 | 106.03±46.47 a | 19.04±12.02 a | 24.47±2.52 a | 33.47±3.06 a |
| | | 1:1 | 287.49±11.10 a | 45.17±15.99 a | 37.61±13.95 a | 144.60±31.80 a |
| Polen Húmedo | 40 | 19.07±7.94 a | 12.73±32.22 a | 17.99±17.98 a | -70.79±31.47 a | |
| | | 2:1 | 49.97±37.47 a | 50.72±23.14 a | 0.11±16.44 a | 38.70±39.21 a |
| | | 1:1 | 106.30±13.48 a | 71.34±13.19 a | 5.59±19.31 a | 93.15±37.85 a |

*Resultados en base seca. Letras distintas en una misma columna para cada tratamiento indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%.

Comparación de la acidez y el pH del producto final con el pan de abejas*.

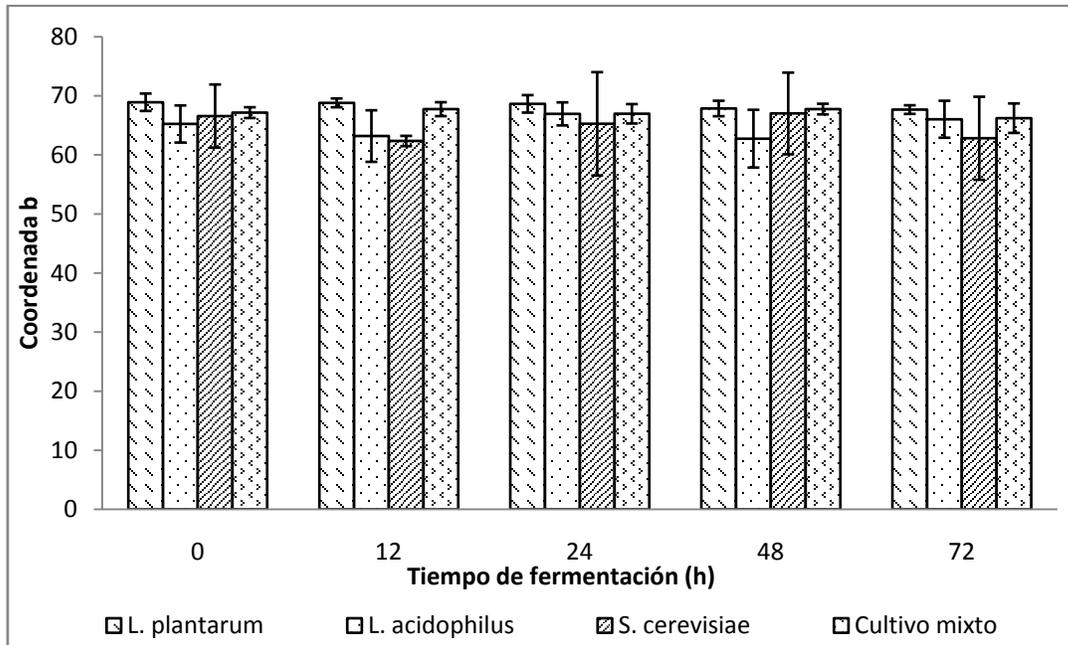
| | Acidez final (meq/kg) | pH |
|------------------------------|-----------------------|--------------|
| Pan de abejas | 267.39±37.91 a | 3.91±0.07 ab |
| <i>L. plantarum</i> | 706.68±11.10 b | 3.77±0.13 a |
| <i>L. acidophilus</i> | 431.46±13.19 c | 3.90±0.05 ab |
| <i>S. cerevisiae</i> | 284.85±2.52 a | 4.17±0.24 b |
| Cultivo mixto | 447.75±0.07 c | 3.99±0.07 ab |

*Resultados en base seca. Letras distintas en una misma columna para cada tratamiento indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%.

Características bioactivas en las fermentaciones con las distintas cepas de microorganismos*.

| Sustrato | Parámetros de calidad bioactiva | | | | |
|------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------------------|
| | TEAC (mM Trolox/g polen) | FRAP (mM Trolox/g polen) | Fenoles totales (mg ácido gálico/g polen) | Carotenoides (mg β-caroteno/kg polen) | Vitamina E (μg α-tocoferol/g polen) |
| | $\bar{X} \pm SD$ | | | | |
| Pan de abejas | 0.061±0.001 | 0.048±0.005 | 8.70±1.00 | 127±32 | - |
| <i>L. plantarum</i> | | | | | |
| Polen inicial | 0.041±0.002 a | 0.052±0.004 a | 16.28±2.21 a | 2149±122 a | 119±12 a |
| Producto final | 0.058±0.007 b | 0.066±0.002 b | 6.35±0.30 b | 2479±209 a | 77±2 a |
| <i>L. acidophilus</i> | | | | | |
| Polen inicial | 0.041±0.002 a | 0.052±0.004 a | 16.28±2.21 a | 2149±122 a | 119±12 a |
| Producto final | 0.048±0.005 a | 0.063±0.001 b | 6.06±0.69 b | 1692±206a | 171±16 a |
| <i>S. cerevisiae</i> | | | | | |
| Polen inicial | 0.041±0.002 a | 0.052±0.004 a | 16.28±2.21 a | 2149±122 a | 119±12 a |
| Producto final | 0.059±0.007 b | 0.069±0.004 a | 8.24±1.75 b | 2443±524a | 143±28 a |
| Cultivo mixto | | | | | |
| Polen inicial | 0.041±0.002 a | 0.052±0.004 a | 16.28±2.21 a | 2149±122 a | 119±12 a |
| Producto final | 0.050±0.003 b | 0.069±0.001 b | 9.00±0.61 b | 2819±206 b | 167±10 a |

*Resultados en base seca. Letras distintas en una misma columna para cada tratamiento indica diferencias significativas, con un nivel de confianza de 95%.

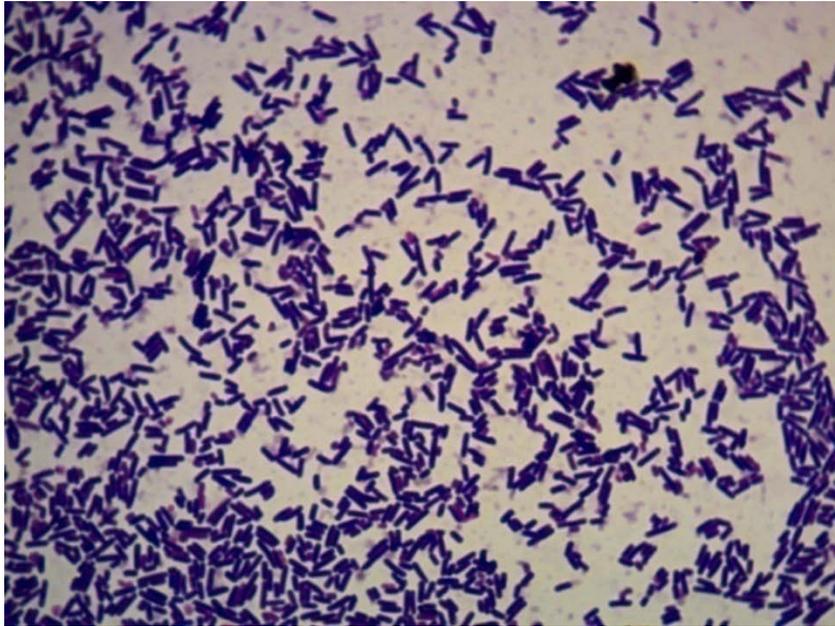


D. Anexo: Fotografías de microorganismos.

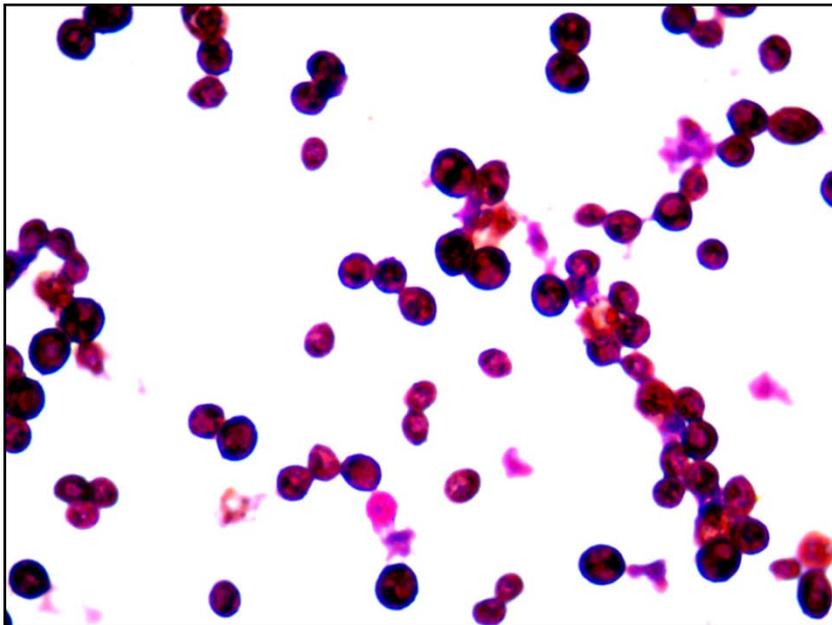
Cepa *L. acidophilus* ATCC 4356



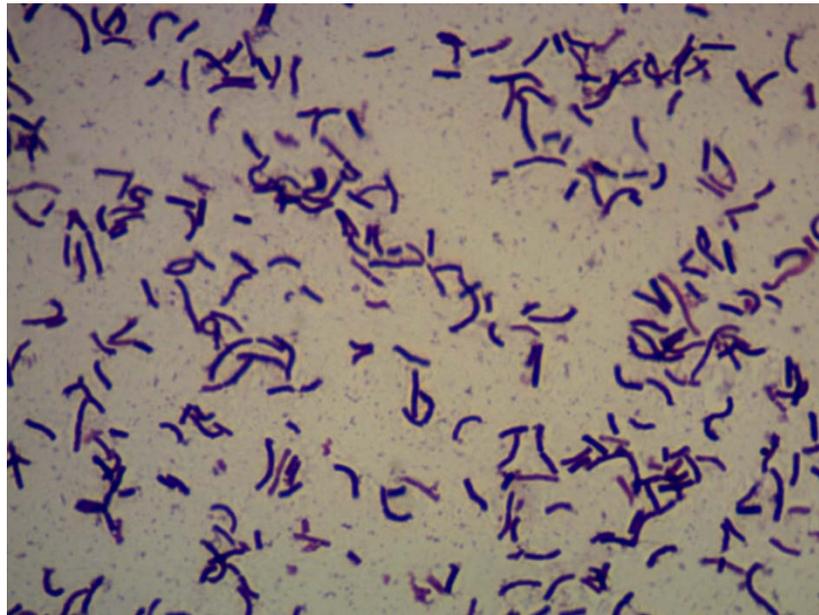
Cepa *L. plantarum* ATCC 8014



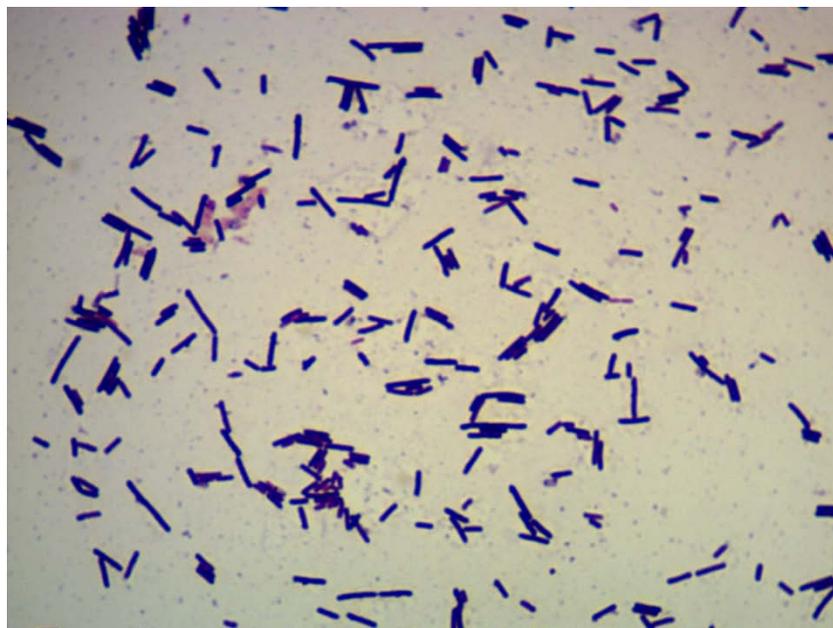
Cepa *S. cerevisiae* ATCC 8014



Ensayo con *L. acidophilus*



Ensayo con *L. plantarum*



Bibliografía

1. Ramírez, N., Juan Sebastián., *Alimentos Funcionales*. Revista Virtual Pro - Procesos Industriales, 2010. **101**: p. 2.
2. Sarmiento, R., L.A., *Alimentos Funcionales, una Nueva Alternativa de Alimentación*. Orinoquía, 2006. **10**(1): p. 16-23.
3. Martínez, T. and Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Dirección de Cadenas Productivas, *Diagnóstico de la Actividad Apícola y de la Crianza de Abejas en Colombia*. 2006: Bogotá. p. 121.
4. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, U.N.d.C., *Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura en Colombia con énfasis en Miel de Abejas*. 2010, Giro Editores Ltda: Bogotá. p. 224.
5. Campos, M., et al., *Pollen composition and standardisation of analytical methods*. Journal of Apicultural Research and Bee World 2008. **47**(2): p. 156-163.
6. Del Risco, R., Carlos Alberto., *Polen-Pan de Abejas: Composición, Nutrición, Acción en la Salud Humana y Microbiología*. 2004: p. 13.
7. Fuenmayor, C.A., *Aplicación de Bioprocesos en Polen de Abejas para el Desarrollo de un Suplemento Nutricional Proteico*, in *Tesis Magister en Ingeniería Química*. 2009, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 225.
8. LeBlanc, B.W., et al., *Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen*. Food Chemistry, 2009. **115**(4): p. 1299-1305.
9. Bogdanov, S., *The Pollen Book, Chapter 1. Pollen Collection, Harvest, Composition, Quality*. Bee Product Science, 2011: p. 12.
10. Food and Agriculture Organization of the United Nations, F., *Value-added Products from Beekeeping. Chapter 3. Pollen* Corporate Document Repository, 2009: p. 28.
11. Krishna, C., *Solid-State Fermentation Systems - An Overview*. Critical Reviews in Biotechnology, 2005. **25**: p. 1-30.
12. Rani, S., Reeta., , et al., *Recent advances in solid-state fermentation*. Biochemical Engineering, 2009. **44**: p. 13-18.
13. Rodríguez, S. and M.Á. Sanromán, *Application of solid-state fermentation to food industry - A review*. Journal of Food Engineering, 2006. **76**: p. 291-302.

14. Ortiz, P., Libia Mercedes., *Evaluación del Potencial de Producción de Bacteriocinas de Lactobacillus aislados de Ensilajes a base de Maíz*, in *Facultad de Ciencias*. 2007, Universidad Nacional de Colombia: Bogotá. p. 33.
15. Hubert, J., et al., *Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ*. *Food Chemistry*, 2008. **109**(4): p. 709-721.
16. Vamanu, E., et al., *Probiotic Product Based on Pollen and Honey*. 2008: p. 14.
17. Vamanu, A., et al., *Obtaining of a Symbiotic Product Based on Lactic Bacteria, Pollen and Honey*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2008. **11**(4): p. 613-617.
18. Vamanu, A., et al., *Identification of a Lactic Bacterium Strain Used for Obtaining a Pollen-Based Probiotic Product*. *Turk J Biol*, 2006. **30**: p. 75-80.
19. Vamanu, E., et al., *The Antioxidant Effect of a Functional Product Based on Probiotic Biomass, Pollen and Honey*. *Animal Science and Biotechnologies* 2010. **43**(1): p. 6.
20. Morgano, M.A., et al., *A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2012. **23**: p. 727-736.
21. González, G., et al., *Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen*. *International Journal of Food Microbiology*, 2005. **105**(1): p. 1-9.
22. Austin, A.J.E., *Estudio del Mercado Nacional para productos de la Apicultura*, C. CEA, Editor. 2002: Bogotá. p. 70.
23. FAO, *Value-added Products from Beekeeping. Chapter 3. Pollen* Corporate Document Repository, 2009: p. 28.
24. Atkin, S.L., et al., *UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from Lycopodium clavatum (club moss) and Ambrosia trifida (giant ragweed)*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2011. **102**(3): p. 209-217.
25. Kovacik, L., et al., *Electron tomography of structures in the wall of hazel pollen grains*. *Journal of Structural Biology*, 2009. **166**(3): p. 263-271.
26. Özler, H., et al., *Pollen morphology of the genus Salvia L. (Lamiaceae) in Turkey*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 2011. **206**(4): p. 316-327.
27. Xu, F.-X. and B.K. Kirchoff, *Pollen morphology and ultrastructure of selected species of Magnoliaceae*. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2008. **150**(1-4): p. 140-153.
28. Barrier, S., et al., *Access to a primary aminosporopollenin solid support from plant spores*. *The Royal Society of Chemistry*, 2010. **12**: p. 234-240.
29. Domínguez, E., et al., *Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation*. *Sex Plant Reproduction*, 1999. **12**: p. 171-179.

30. Thomasson, M.J., et al., *Electrochemistry and charge transport in sporopollenin particle arrays*. *Electrochemistry Communications*, 2010. **12**(10): p. 1428-1431.
31. Martins, S., et al., *Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review*. *Biotechnology Advances*, 2011. **29**(3): p. 365-373.
32. Soares de Arruda, V.A., et al., *Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2013. **29**(2): p. 100-105.
33. Domínguez-Valhondo, D., et al., *Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen*. *International Journal of Food Science & Technology*, 2011. **46**(10): p. 2204-2211.
34. Szczêsna, T., *Study on the Sugar Composition of Honeybee-collected Pollen*. *Journal of Apicultural Science*, 2007. **51**(1): p. 15-22.
35. Serra, B., J., and J. Escolá, R., *Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain*. *Agriculture Food Chemistry*, 1997. **45**: p. 725-732.
36. Prado, J.V., *Caracterización físico-química y microbiológica del polen de abejas de cinco departamentos de Honduras*. 2005, Zamorano: Honduras. p. 93.
37. Saavedra, K., C. Rojas, and G. Delgado, *Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque - Perú)*. *Revista chilena de nutrición*, 2013. **40**: p. 71-78.
38. Bogdanov, S., *Quality and Standards of Pollen and Beeswax*. *Apiacta*, 2004. **38**: p. 334-341.
39. Human, H. and S.W. Nicolson, *Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of Aloe greatheadii var. davyana (Asphodelaceae)*. *Phytochemistry*, 2006. **67**: p. 1486-1492.
40. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, I., *Diferenciación por Origen de Polen Apícola del Altiplano Cundiboyacense*. 2011: Universidad Nacional de Colombia.
41. Fuenmayor, C., et al., *Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen*. *Revista Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Córdoba*, 2014. **19**(1): p. 4003-4014.
42. Vit, P. and B. Santiago, *Composición química de polen apícola fresco recolectado en el páramo de Misintá de los andes venezolanos*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 2008. **58**: p. 411-415.
43. Barajas-Ortiz, J.P., T. Martínez, and E. Rodríguez-Sandoval, *Evaluación del Efecto de la Temperatura en el Secado de Polen Apícola Procedente de dos Zonas de Cundinamarca*. *DYNA*, 2011. **78**: p. 48-57.
44. Morgano, M.A., et al., *Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration*. *Food Control*, 2011. **22**(10): p. 1604-1608.

45. Dirección de Industria Alimentaria, *Código Alimentario Argentino - Capítulo X in Polen* 1990. p. 2.
46. Ramos, F., *Productos Alimenticios no Industrializados para Consumo Humano - Polen -(Pollinis). Especificaciones.*, in *NMX-FF-094-SCFI-2008* 2008: México D.F. p. 16.
47. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, C., *Norma Salvadoreña. NSO 65.38.01:05, in Calidad del Polen de Abejas. Especificaciones.* . 2005: San Salvador. p. 6.
48. Saavedra C, K.I., Rojas I, Consuelo., Delgado P, Guillermo E., *Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque - Perú)*. Revista chilena de nutrición, 2013. **40**: p. 71-78.
49. Bogdanov, S., *The Pollen Book, Chapter 2. Pollen: Nutrition Functional Properties Health*. Bee Product Science, 2011: p. 28.
50. Almeida-Muradian, L.B., et al., *Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets*. Journal of Food Composition and Analysis, 2005. **18**(1): p. 105-111.
51. Szczêsna, T., *Long -Chain Fatty Acids Composition of Honeybee-collected Pollen*. Journal of Apicultural Science, 2006. **50**(2): p. 65-79.
52. Xu, X., J. Dong, and X. Mu, Sun, Liping., *Supercritical CO2 extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (Nelumbo nucifera Gaertn) bee pollen*. Food and Bioproducts Processing 2011. **89**: p. 47-52.
53. Standifer, L.N., et al., *Biochemistry and Microbiology of Pollen Collected by Honey Bees (Apis mellifera L.) from Almond, Prunus Dulcis, II. Protein, Amino Acids and Enzymes (1)*. Apidologie, 1980. **11**(2): p. 163-171.
54. González, A.M., et al., *HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen)*. Food Chemistry, 2006. **95**(1): p. 148-156.
55. Melø, R., et al., *Minerals and trace elements in commercial infant food*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**(10): p. 3339-3342.
56. Loper, G.M., et al., *Biochemistry and Microbiology of Bee-collected Almond (Prunus Dulcis) Pollen and Bee Bread*. Apidologie, 1980. **11**(1): p. 63-73.
57. Pulido, N., C. Salazar, and C. Díaz, *Cuantificación de Vitamina E en Muestras Comerciales de Polen Apícola*. Vitae - Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 2012. **19**(1): p. 357-359.
58. Almaraz-Abarca, N., et al., *Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (Prosopis juliflora, Leguminosae)*. Journal of Food Composition and Analysis, 2007. **20**(2): p. 119-124.
59. Lins, A.C.S., et al., *Flavonóides isolados do pólen coletado pela abelha Scaptotrigona bipunctata (canudo)*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2003. **13**: p. 40-41.

60. Fanali, C., L. Dugo, and A. Rocco, *Nano-liquid chromatography in nutraceutical analysis: Determination of polyphenols in bee pollen*. Journal of Chromatography A, 2013(0).
61. Morais, M., et al., *Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity*. Food and Chemical Toxicology, 2011. **49**(5): p. 1096-1101.
62. Mărghitaș, L.A., et al., *In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania*. Food Chemistry, 2009. **115**(3): p. 878-883.
63. Domínguez-Valhondo Diana., B.G.D., Hernández María Teresa., González-Gómez David., *Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen*. International Journal of Food Science & Technology, 2011. **46**(10): p. 2204-2211.
64. Ray, B., *Fundamental Food Microbiology*. 3 ed. 2004: CRC Press LLC. 625.
65. Fuenmayor, C.A., M.C. Quicazán, and J. Figueroa, *Desarrollo de un Suplemento Nutricional mediante la Fermentación en Fase Sólida de Polen de Abejas empleando Bacterias Ácido Lácticas Probióticas*. 2011. Vol. 20. 2011.
66. Pandey, A., C.R. Soccol, and D. Mitchell, *New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products*. Process Biochemistry, 2000. **35**(10): p. 1153-1169.
67. Ward, O.P., M. Calvo, and E. Sevillano, *Biotechnología de la Fermentación*. 13 ed. 1989, Zaragoza: Acribia. 274.
68. Julián, M.C., Ramos, Luis B. , *Fermentación en Estado Sólido (I). Producción de Alimento Animal*. Teconología Química 2007. **27**(3): p. 17-22.
69. Samaniego, L.M., *Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Editorial Universitaria, 2000: p. 21.
70. Bellon-Maurel, V., O. Orliac, and P. Christen, *Sensors and measurements in solid state fermentation: a review*. Process Biochemistry, 2003. **38**(6): p. 881-896.
71. Gilliam, M., *Microbiology of Pollen and Bee Bread: The Yeasts*. Apidologie, 1979. **10**(1): p. 43-53.
72. Isidorov, V.A., et al., *Gas chromatographic–mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread*. Food Chemistry, 2009. **115**(3): p. 1056-1063.
73. Baltrušaitytė, V., P.R. Venskutonis, and V. Čeksterytė, *Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts*. Food Chemistry, 2007. **101**(2): p. 502-514.

74. Anzola, T.M., *Comportamiento de la Microbiota Durante la Elaboración del Pan De Abejas por Apis Mellifera.*, in *Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia 2006*, Universidad Nacional de Colombia. : Bogotá.
75. Hernández, D.I. and J. Figueroa, *Calidad Microbiológica del Polen Apícola seco recolectado en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca.*
76. Puig-Peña, Y., et al., *Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado.* CENIC Ciencias Biológicas, 2011. **43**(1): p. 23-27.
77. Ljungh, A. and T. Wadström, *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics.* 2009, Caister Academic Press. p. 3.
78. Carlile, M.J., G.W. Gooday, and S.C. Watkinson, *The Fungi.* 2 ed. 2001.
79. Caplice, E. and G.F. Fitzgerald, *Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation.* International Journal of Food Microbiology, 1999. **50**(1-2): p. 131-149.
80. Fennema, O.R., et al., eds. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects.* ed. M. Dekker. 2004: New York. 628.
81. Farnworth, E.R., *Handbook of Fermented Functional Foods.* 2 ed. 2008, Boca Ratón: CRC/Taylor y Francis.
82. Bamforth, C.W., *Food, Fermentation and Micro-organisms.* 2008, Chichester, England: Wiley.
83. García, D., M.A. Rojas, and J. Sánchez, *Contenido Microbiológico Cultivable del Tracto Intestinal y Polen Almacenado de Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae).* Acta Biológica Colombiana, 2006. **11**(1): p. 123 - 129.
84. Durán, A., et al., *Caracterización granulométrica y colorimétrica del polen apícola: efecto del procesamiento* in *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID*, U.N.d.C.-D.d. Investigación, Editor. 2013, Goldentech Ltda: Medellín. p. 7.
85. Segura, M., et al., *Estimación del deterioro nutricional de polen apícola sometido a deshidratación y tratamientos térmicos higienizantes*, in *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID*, U.N.d.C.-D.d. Investigación, Editor. 2013, Goldentech Ltda.: Medellín. p. 4.
86. Bevilacqua, A. and M.R. Corbo, *Characterization of a Wild Strain of Alicyclobacillus acidoterrestris: Heat Resistance and Implications for Tomato Juice.* JOURNAL OF FOOD SCIENCE, 2011. **76**(2): p. M130-M136.
87. Laroche, C., F. Fine, and P. Gervais, *Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders.* International Journal of Food Microbiology, 2005. **97**(3): p. 307-315.
88. Durán, A., et al., *Application of oleo/aqueous separation method for discrimination of impurities in pollen by flotation and sedimentation.*, in *Apimondia 2013: Ucrania.* p. 2.

89. John, R.P., K.M. Nampoothiri, and A. Pandey, *Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 2006. **41**(4): p. 759-763.
90. de Castro, A., et al., *Lactic acid fermentation and storage of blanched garlic*. *International Journal of Food Microbiology*, 1998. **39**(3): p. 205-211.
91. Montville, T.J. and K.R. Matthews, *Microbiología de los Alimentos*. Acribia, S.A ed, ed. A. S.A.
92. Official Methods of Analysis, A., *Official Methods of Analysis of AOAC International (18th edn)*. 2005: W. Horwitz.
93. Stratil P., K.B., Kubán V., *Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables - evaluation of spectrophotometric methods*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006: p. 607-616.
94. Rodriguez-Amaya, D.B. and M. Kimura, *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. HarvestPlus Technical Monograph 2*. . 2004, Washington, D.C-USA and Cali-Colombia.
95. Schulte, F., et al., *Characterization of Pollen Carotenoids with in situ and High-Performance Thin-Layer Chromatography Supported Resonant Raman Spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(20): p. 8426–8433.
96. American Public Health Association., *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. 2001, Washington: Pouch, F. & Keith, I. Edits.
97. Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos, I., *Manual de técnicas de análisis para el control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano*. , h.M. Holguin M, Rubio B, Vargas M, Muñoz A, Diaz G. , Editor. 1998, Bogotá - Colombia.
98. Pulido CH N., S.G.C., Díaz C., *Cuantificación de Vitamina E en Muestras Comerciales de Polen Apícola*. *Vitae - Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 2012. **19**(1): p. 357-359.
99. Leja, M., et al., *Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species*. *Food Chemistry*, 2007. **100**(1): p. 237-240.
100. Morais M., M.L., Feás X, Estevinho L.M., *Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity*. *Food and Chemical Toxicology*, 2011. **49** p. 1096–1101.
101. Xiang Xu, J.D., Xuefeng Mu, Liping Sun, *Supercritical CO2 extraction of oil, carotenoids, squalene and sterols from lotus (Nelumbo nucifera Gaertn) bee pollen*. *Food and Bioproducts Processing* 2011. **89**: p. 47-52.
102. Schulte F., M.J., Kroh L.W., Panne U., Kneipp J., *Characterization of Pollen Carotenoids with in situ and High-Performance Thin-Layer Chromatography Supported Resonant Raman Spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(20): p. 8426–8433.
103. Nielsen, J., V. John., and G. Lidén, *Bioreaction Engineering Principles*. 2 ed. 2003, New York, USA: Plenum Publishers. 554.

104. Salar-Behzadi, S., et al., *Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of Bifidobacterium bifidum BB-12*. Food Research International, 2013. **54**(1): p. 93-101.
105. Sarmento, S., Tania Maria., et al., *Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee Melipona subnitida Ducke*. Journal of Food Composition and Analysis, 2005. **19**(6-7): p. 507-511.
106. Meléndez-Martínez, A.J., et al., *Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments*. Food Chemistry, 2007. **101**(3): p. 6.
107. Yilmaz, Y. and R. Toledo, *Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products*. Food Chemistry, 2005. **93**(2): p. 273-278.
108. Morales, F.J. and S. Jiménez-Pérez, *Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence*. Food Chemistry, 2001. **72**(1): p. 119-125.
109. Joubran, Y., A. Mackie, and U. Lesmes, *Impact of the Maillard reaction on the antioxidant capacity of bovine lactoferrin*. Food Chemistry, 2013. **141**(4): p. 3796-3802.
110. Contreras, O., *Relación entre el Contenido de Caroteno, Color y Características Botánicas del Polen Corbicular*, in *Facultad De Ciencias Agrarias, Escuela De Ingeniería En Alimentos*. 2004, Universidad Austral De Chile: Valdivia, Chile. p. 102.
111. C.I.E., *Colorimetry, (Official recommendations of the International Commission on Illumination)*, CIE 15:2004 3ed. 2004, Paris, Francia.: Bureau Central de la CIE.
112. Zuluaga, C.M., A.C. Díaz, and M.C. Quicazán, *Estandarización y validación del método de análisis del perfil aromático por nariz electrónica*. Ingeniería e Investigación, 2011. **31**(2): p. 65-73.
113. Nowroozi, J., M. Mirzaii, and M. Norouzi, *Study of Lactobacillus as Probiotic Bacteria*. Iranian J Publ Health, 2004. **33**(2): p. 1-7.
114. Madigan, M.T., et al., *Biology of Microorganisms*. 13 ed, ed. B. Cummings. 2011, San Francisco, USA: PEARSON. 1155.
115. Mendes-Ferreira, A., et al., *Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae for mead production*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **144**(1): p. 193-198.
116. Roldán, A., et al., *Influence of pollen addition on mead elaboration: Physicochemical and sensory characteristics*. Food Chemistry, 2011. **126**(2): p. 574-582.
117. Acosta, C., *Evaluación de la Fermentación Alcohólica para la Producción de Hidromiel*, in *Ingeniería*. 2012, Nacional De Colombia: Bogotá. p. 150.
118. Zilic, S., et al., *Effects of extrusion, infrared and microwave processing on Maillard reaction products and phenolic compounds in soybean*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014. **94**(1): p. 45-51.

119. Sogi, D.S., et al., *Total Phenolics, Carotenoids, Ascorbic Acid, and Antioxidant Properties of Fresh-cut Mango (Mangifera indica L., cv. Tommy Atkin) as Affected by Infrared Heat Treatment*. Journal of Food Science, 2012. **77**(11): p. C1197-C1202.
120. Solgajová, M., et al., *Antioxidant activity and polyphenol content of malt beverages enriched with bee pollen*. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2014. **3**(3): p. 281-284.
121. Brudzynski, K. and D. Miotto, *The relationship between the content of Maillard reaction-like products and bioactivity of Canadian honeys*. Food Chemistry, 2011. **124**(3): p. 869-874.
122. Eric, K., et al., *Sensory attributes and antioxidant capacity of Maillard reaction products derived from xylose, cysteine and sunflower protein hydrolysate model system*. Food Research International, 2013. **54**(2): p. 1437-1447.
123. Vhangani, L.N. and J. Van Wyk, *Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose-lysine and ribose-lysine model systems*. Food Chemistry, 2013. **137**(1-4): p. 92-98.
124. Hwang, E.-S., M. Stacewicz-Sapuntzakis, and P.E. Bowen, *Effects of Heat Treatment on the Carotenoid and Tocopherol Composition of Tomato*. Journal of Food Science, 2012. **77**(10): p. C1109-C1114.
125. Li, C., et al., *Identification of the aroma compounds in stinky mandarin fish (Siniperca chuatsi) and comparison of volatiles during fermentation and storage*. International Journal of Food Science & Technology, 2013. **48**(11): p. 2429-2437.
126. Peris, M. and L. Escuder-Gilabert, *On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: A review*. Analytica Chimica Acta, 2013. **804**(0): p. 29-36.
127. Todeschini, R., et al., *CAIMAN (Classification and Influence Matriz Analysis): A new approach to the classification based on leverage-scaled functions, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2007. **87**(1): p. 3-17.
128. Buitrago, J. and D. Tenjo, *Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de Saccharomyces cerevisiae*, in *Facultad de Ciencias*. 2007, Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá. p. 120.
129. Estela, W., et al., *Producción de ácido láctico por Lactobacillus plantarum L10 en cultivos batch y continuo*. Revista peru. biol, 2007. **14**(2): p. 271-275.
130. Velasco-Benítez, C.A., *Probióticos fúngicos en pediatría*. Revista Gastrohnutp, 2012. **14**(3 Suplemento 1): p. S13-S19.