



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Valorización de polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico

Carlos Mario Zuluaga Domínguez

Universidad Nacional de Colombia

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Facultad de Ingeniería.

Bogotá D.C., Colombia

2015

Valorización de polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico

Carlos Mario Zuluaga Domínguez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ingeniería - Ingeniería Química

Director:

Ph.D. Juan Carlos Serrato Bermúdez

Codirectora:

Ph.D. Marta Cecilia Quicazán

Línea de Investigación:

Alimentos – caracterización y generación de valor en productos apícolas

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la calidad de los alimentos y desarrollo de nuevos productos

Universidad Nacional de Colombia

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Facultad de Ingeniería.

Bogotá D.C., Colombia

2015

*A mi mamá, su nobleza, esfuerzo y tenacidad
son mi mejor ejemplo a seguir*

*A mi familia, por su apoyo y sus actos que
reconfortan el alma*

*A Andrea, por siempre estar ahí, desde
aquellos sábados interminables de
flavonoides*

*A mis amigos, por escucharme y dejarme
escucharlos*

*A la Universidad Nacional de Colombia, por
cambiar mi vida, hacerme crecer personal y
profesionalmente, y permitirme vivir y realizar
cosas que nunca imaginé*

Agradecimientos

Deseo agradecer a las siguientes instituciones su apoyo para la realización de esta tesis:

Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias

Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - ICTA

Departamento de Ingeniería Química y Ambiental - Facultad de Ingeniería

Dirección de Investigación y Extensión - DIEB

Vicedecanatura de Investigación y Extensión - Facultad de Ingeniería

Laboratorio Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos - IATA (España)

Departamento de Tecnología de Alimentos - Universidad Politécnica de Valencia (España)

Apiario los Cerezos

Apiarios el Pinar

También deseo extender mis agradecimientos a las siguientes personas:

Al Dr. Juan Carlos Serrato Bermúdez, por su apoyo, consejos y permanente impulso que le dió a este trabajo.

A la Dra. Marta Cecilia Quicazán, quien ha sido una mentora en mi formación profesional, y a quien le estaré eternamente agradecido por sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Antonio Martínez López y la Dra. Dolores Rodrigo, por su apoyo a la realización de la pasantía doctoral en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (Valencia, España).

A la Dra. Amparo Quiles por su apoyo desinteresado y por facilitar su laboratorio para la realización de análisis fisicoquímicos en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia (España).

Al Dr. Davide Ballabio del grupo de investigación en quimiometría y QSAR, de la Universidad de Milano-Bicocca (Italia), por sus enseñanzas en el manejo estadístico multivariado de datos y, por sobre todo, su valiosa amistad.

A los apicultores Baudilio Suárez y Juan José Ricardo por sus enseñanzas acerca de la apicultura y por facilitar el polen utilizado en este trabajo.

Al personal Técnico del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por su apoyo a la realización de esta tesis, en particular a Gregorio Medina, Wilson Castro, Héctor Monsalve, Martha Esguerra, Carolina Gutiérrez, Andrea Mojica, Alexander Erazo e Ivonne González.

Al personal técnico del Laboratorio de Ingeniería Química, especialmente a Ricardo Cortés.

A los estudiantes de pregrado y posgrado y pasantes que apoyaron la realización de ensayos relacionados a este trabajo: Andrés Durán, Claudia Salazar, Carolina Vega, Carlos Céspedes, Lizeth Castro, Mauricio Segura y Mario Gutiérrez.

A Carolina Acosta, María Sanz, José Fernández y Juan Vicente López, por toda la colaboración y apoyo que me ofrecieron a lo largo de mi estancia en Valencia.

Resumen

El polen constituye un recurso nutricional y bioactivo muy valioso que puede ser empleado para el consumo humano. Sin embargo, su estructura es altamente compleja, lo cual dificulta la absorción de los compuestos de interés en el sistema gastrointestinal. En este trabajo se estudió el efecto de diferentes tratamientos físicos (secado, esterilización y altas presiones hidrostáticas) y biotecnológicos (fermentación e hidrólisis enzimática) sobre la estructura, composición nutricional y bioactiva y calidad microbiológica de polen apícola. Se encontró que dentro de los tratamientos térmicos la esterilización a 121°C por 15 minutos logró un resultado satisfactorio en la reducción de la carga microbiológica inicial, así como un incremento en los compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante. Adicionalmente, con las altas presiones hidrostáticas, a diferencia de los procesos térmicos, se logró un incremento en el contenido de carotenoides. Dentro de los tratamientos biotecnológicos, el empleo de un cultivo láctico comercial demostró ser el más efectivo para fermentar polen; sin embargo, mediante procesos enzimáticos con proteasas se obtuvo un producto hidrolizado de polen con mejores características bioactivas y actividad antioxidante.

Palabras clave: altas presiones, compuestos bioactivos, esterilización, fermentación, hidrólisis, proteólisis, tratamiento térmico.

Abstract

Bee-pollen is a valuable nutritional and bioactive resource that can be used for human consumption. However, its structure is highly complex, which difficulties the absorption of compounds of interest in the human gastrointestinal tract. In this research, the effect of different physical treatments (drying, sterilization and high hydrostatic pressure) and biotechnological (fermentation and enzymatic hydrolysis) on the structure, composition and bioactive nutritional and microbiological quality of bee pollen was studied. It was found, for the thermal treatments, that a sterilization at 121 °C for 15 minutes achieved a satisfactory result in reducing the initial microbial load, and also, an increasing in the phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity. Additionally, an increase in the carotenoid content was obtained when bee-pollen was treated by high hydrostatic pressure, unlike thermal processes. For biotechnological treatments, the use of a commercial lactic culture proved to be the most effective for fermenting pollen; nevertheless, by an enzymatic process with a protease, a hydrolyzate bee-pollen product with improved bioactivity and antioxidant activity was obtained.

Keywords: high pressure, bioactive compounds, sterilization, fermentation, hydrolysis, proteolysis, thermal treatment.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Introducción.....	1
1. Revisión Bibliográfica	5
1.1. La apicultura en el contexto colombiano e internacional	5
1.2. Condiciones actuales de manejo y procesamiento del polen	7
1.3. Polen apícola.....	9
1.3.1. Generalidades	9
1.3.2. Características estructurales del polen	9
1.3.3. Composición fisicoquímica del polen	11
1.3.4. Disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos del polen	18
1.4. Alternativas para la transformación de polen	19
1.4.1. Transformación natural del polen en la colmena.....	20
1.4.2. Tratamientos artificiales para la transformación de polen	23
1.5. Conclusiones.....	44
2. Tratamientos físicos en polen	47
2.1. Introducción.....	47
2.2. Materiales y Métodos	49
2.2.1. Polen.....	49
2.2.2. Caracterización palinológica, estructural, microbiológica y fisicoquímica del polen	50
2.2.3. Descripción de los tratamientos térmicos y diseño experimental	51
2.2.4. Pasteurización fría y diseño experimental	53
2.2.5. Descripción de los métodos estructurales, microbiológicos y fisicoquímicos ..	58
2.2.6. Análisis estadístico	66
2.3. Resultados y discusión	68
2.3.1. Caracterización palinológica y fisicoquímica del polen	68
2.3.2. Resultados de los tratamientos térmicos	72
2.3.3. Resultados de las muestras sometidas a altas presiones hidrostáticas	110
2.4. Conclusiones.....	119
3. Tratamientos biotecnológicos en polen	123
3.1. Introducción.....	123
3.2. Materiales y Métodos.....	125
3.2.1. Polen y pan de abejas.....	125
3.2.2. Hidrólisis enzimática de polen.....	126

3.2.3. Fermentación de polen	128
3.2.4. Análisis estadístico.....	131
3.3. Resultados y discusión	132
3.3.1. Comparación entre las características bioactivas del polen, pan de abejas y polen estéril.....	132
3.3.2. Hidrólisis enzimática de polen	133
3.3.3. Fermentación de polen	146
3.4. Conclusiones	187
4. Conclusiones y recomendaciones	191
4.1. Conclusiones	191
4.2. Recomendaciones	195
A. Anexo: Socialización de resultados	197
B. Anexo: Perfil de aminoácidos y ácidos grasos del polen tratado térmicamente	203
C. Anexo: Fichas técnicas cultivos microbiológicos	207
D. Anexo: Fichas técnicas de las enzimas empleadas.....	221
Bibliografía.....	241

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. (a) Imagen por Microscopía electrónica de barrido de un grano de polen donde se hace visible la exina. (b) Estructura del polen.	10
Figura 2-1. Equipo piloto de altas presiones hidrostáticas.	57
Figura 2-2. Diagrama explicativo del análisis de esterilidad comercial por tratamiento ..	61
Figura 2-3. Curva de secado de polen a tres diferentes temperaturas	73
Figura 2-4. Gráfica de DTG para polen fresco y seco	74
Figura 2-5. Gráfica de DSC para el polen fresco y sometidos a secado.	75
Figura 2-6. Micrografías SEM de polen fresco y seco. Magnitud 5000X. (a) Polen fresco, (b) Polen seco a 40°C, (c) Polen seco a 50°C, (d) Polen seco a 60°C.	77
Figura 2-7. Gráfica de DTG para polen fresco y estéril	83
Figura 2-8. Gráfica de DSC para el polen fresco y estéril.	84
Figura 2-9. Micrografías SEM de seco. (a) 121°C, 5 min, (b) 121°C, 10 min, (c) 121°C, 15 min. Magnitud 5000X.	85
Figura 2-10. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado secado-esterilización a 40, 50 y 60°C, con 5 min.	89
Figura 2-11. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado secado-esterilización a 40, 50 y 60°C, con 10 min.	90
Figura 2-12. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado secado-esterilización a 40, 50 y 60°C, con 15 min.	91
Figura 2-13. Micrografías SEM para tratamientos combinados secado-esterilización de polen. Magnitud 2000X. (a) 40°C, 5 min (b) 40°C, 10 min y (c) 40°C, 15 min	92
Figura 2-14. Micrografías SEM para tratamientos combinados secado-esterilización de polen. Magnitud 2000X. (a) 50°C, 5 min (b) 50°C, 10 min y (c) 50°C, 15 min	93

Figura 2-15. Micrografías SEM para tratamientos combinados secado-esterilización de polen. Magnitud 2000X. (a) 60°C, 5 min (b) 60°C, 10 min y (c) 60°C, 15 min	94
Figura 2-16. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado esterilización-secado a 5, 10 y 15 min, con 40°C.	98
Figura 2-17. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado esterilización-secado a 5, 10 y 15 min, con 50°C.	99
Figura 2-18. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado esterilización-secado a 5, 10 y 15 min, con 60°C.	100
Figura 2-19. Micrografías SEM para tratamientos combinados esterilización - secado de polen. Magnitud 2000X. (a) 5 min, 40°C, (b) 10 min, 40°C y (c) 15 min, 40°C	101
Figura 2-20. Micrografías SEM para tratamientos combinados esterilización - secado de polen. Magnitud 2000X. (a) 5 min, 50°C, (b) 10 min, 50°C y (c) 15 min, 50°C	102
Figura 2-21. Micrografías SEM para tratamientos combinados esterilización - secado de polen. (a) 5 min, 60°C, (b) 10 min, 60°C y (c) 15 min, 60°C.....	103
Figura 2-22. Score plot obtenido mediante PCA de los tratamientos térmicos seleccionados.	108
Figura 2-23. Loading plot obtenido mediante PCA de los tratamientos térmicos seleccionados.	108
Figura 2-24. Diagrama de utilidad en función de conveniencia para los tratamientos térmicos seleccionados	109
Figura 2-25. Imágenes confocales (60X) de polen sin tratar (a) tratado por altas presiones (b).	111
Figura 2-26. Efecto de la concentración de polen (%(p/v)), y las condiciones de tratamiento de altas presiones (presión (MPa) y tiempo (min)) sobre el contenido total de carotenoides (a), fenoles totales (b) y actividad antioxidante (c) de las muestras analizadas.	116
Figura 2-27. Efecto del tratamiento de las condiciones de altas presiones (Presión (MPa) y tiempo (min)) sobre el contenido de carotenoides totales, fenoles totales y actividad antioxidante de las muestras analizadas.	119
Figura 3-1. DSC de polen estéril e hidrolizados	134
Figura 3-2. Micrografías SEM para polen estéril. Magnitud 1000X y 2000X.	135
Figura 3-3. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Viscoflow. Magnitud 1000X y 2000X.	135

Figura 3-4. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Suberase. Magnitud 1000X y 2000X.....	136
Figura 3-5. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Novozym. Magnitud 1000X y 2000X.....	136
Figura 3-6. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Alcalase. Magnitud 1000X y 2000X.....	137
Figura 3-7. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Neutrase. Magnitud 1000X y 2000X.....	137
Figura 3-8. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Protamex. Magnitud 1000X y 2000X.....	137
Figura 3-9. <i>Score plot</i> de los productos hidrolizados.....	144
Figura 3-10. <i>Loading plot</i> de los productos hidrolizados.....	145
Figura 3-11. DSC de polen estéril y polen fermentado con BAL.....	147
Figura 3-12. Microfotografías SEM para polen fermentado con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.	148
Figura 3-13. Microfotografías SEM para polen fermentado con Yomix®. Magnitud 1000X y 2000X.....	149
Figura 3-14. Microfotografías SEM para polen fermentado con <i>L. plantarum</i> . Magnitud 1000X y 2000X.	149
Figura 3-15. Microfotografías SEM para polen fermentado con <i>L. acidophilus</i> . Magnitud 1000X y 2000X.	149
Figura 3-16. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con Choozit®.	150
Figura 3-17. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con Yomix®	151
Figura 3-18. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con <i>L. plantarum</i>	152
Figura 3-19. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con <i>L. acidophilus</i>	152
Figura 3-20. DSC de polen estéril y polen fermentado con levaduras.....	159
Figura 3-21. Microfotografías SEM para polen fermentado con <i>S. cerevisiae</i> comercial. Magnitud 1000X y 2000X.	160

Figura 3-22. Microfotografías SEM para polen fermentado con <i>S. cerevisiae</i> ATCC. Magnitud 1000X y 2000X.	160
Figura 3-23. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con <i>S. cerevisiae</i> comercial	161
Figura 3-24. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con <i>S. cerevisiae</i> ATCC	162
Figura 3-25. Cromatograma obtenido para la determinación y cuantificación de etanol y/o ácido acético en polen fermentado con levaduras.....	163
Figura 3-26. <i>Score plot</i> obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados.	167
Figura 3-27. Loading plot obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados.	168
Figura 3-28. <i>Score plot</i> obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados, polen, pan de abejas y polen estéril.....	170
Figura 3-29. <i>Loading plot</i> obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados, polen, pan de abejas y polen estéril.....	170
Figura 3-30. Diagrama de utilidad en función de conveniencia para las fermentaciones realizadas con los cultivos comerciales y ATCC..	172
Figura 3-31. DSC de polen estéril y fermentaciones con cepas ATCC <i>L. plantarum</i> y <i>S. cerevisiae</i>	173
Figura 3-32. DSC de polen estéril y fermentaciones con cepas Choozit y <i>S. cerevisiae</i> comercial.....	174
Figura 3-33. Microfotografías SEM para polen fermentado con un cultivo mixto Choozit® y <i>S. cerevisiae</i> comercial. Magnitud 1000X y 2000X.....	175
Figura 3-34. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con <i>S. cerevisiae</i> comercial y luego de 12 h con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.	175
Figura 3-35. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con <i>S. cerevisiae</i> comercial y luego de 24 h con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.	176
Figura 3-36. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con <i>S. cerevisiae</i> comercial y luego de 48 h con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.	176
Figura 3-37. Microfotografías SEM para polen fermentado con un cultivo mixto <i>L. plantarum</i> y <i>S. cerevisiae</i> ATCC. Magnitud 1000X y 2000X.	176

Figura 3-38. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con <i>S. cerevisiae</i> ATCC y luego de 12 h con <i>L. plantarum</i> . Magnitud 1000X y 2000X.	177
Figura 3-39. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con <i>S. cerevisiae</i> ATCC y luego de 24 h con <i>L. plantarum</i> . Magnitud 1000X y 2000X.	177
Figura 3-40. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con <i>S. cerevisiae</i> ATCC y luego de 48 h con <i>L. plantarum</i> . Magnitud 1000X y 2000X.	177
Figura 3-41. <i>Score plot</i> obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total, realizadas con un sustrato polen:agua 1:1.	181
Figura 3-42. <i>Loading plot</i> obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total.	182
Figura 3-43. <i>Score plot</i> obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total, realizadas con un sustrato polen:agua 1:1.	183
Figura 3-44. <i>Loading plot</i> obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total.	184
Figura 3-45. Diagrama de utilidad en función de conveniencia para las fermentaciones seleccionadas.	185

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Reportes de composición fisicoquímica de pólenes a nivel mundial	12
Tabla 1-2. Sugerencia para la normativa estándar de valores promedio de composición de polen	13
Tabla 1-3. Sugerencia de normativa técnica para pólenes del altiplano cundiboyacense	13
Tabla 1-4. Reporte de contenido de polisacáridos en polen.	14
Tabla 1-5. Contenido promedio de ácidos grasos en polen	15
Tabla 1-6. Contenido de aminoácidos de pólenes de diversos orígenes.....	16
Tabla 1-7. Contenido promedio de minerales en polen.....	17
Tabla 1-8. Reporte de contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en polen	17
Tabla 1-9. Contenido promedio de vitaminas en polen	18
Tabla 1-10. Principales microorganismos encontrados durante el proceso de transformación de polen en pan de abejas (Gilliam, 1979a).	22
Tabla 1-11. Reportes de composición de pan de abejas.	23
Tabla 1-12. Tiempo de reducción decimal para esporas de algunas especies en medio líquido.....	29
Tabla 1-13. Ejemplos de tratamientos de HPP en matrices vegetales	33
Tabla 1-14. Algunos reportes acerca de tratamientos de altas presiones en matrices vegetales.....	34
Tabla 1-15. Algunos reportes sobre fermentación en matrices vegetales	38
Tabla 2-1. Matriz de diseño experimental para la bebida con inclusión de polen.....	54
Tabla 2-2. Matriz de diseño experimental para el polen hidratado.....	55

Tabla 2-3. Diluciones de las muestras de polen para la medición y cuantificación de minerales.....	62
Tabla 2-4. Caracterización palinológica del polen apícola	69
Tabla 2-5. Composición fisicoquímica del polen apícola del Altiplano Cundiboyacense*	69
Tabla 2-6. Composición mineral del polen (mg/kg)*	71
Tabla 2-7. Composición bioactiva del polen apícola del Altiplano Cundiboyacense*	71
Tabla 2-8. Resultados de temperatura de pico y masa perdida del polen sometido a secado.....	74
Tabla 2-9. Resultados de DSC para polen fresco y sometido a secado.....	75
Tabla 2-10. Reporte microbiológico de polen fresco y seco.....	78
Tabla 2-11. Composición fisicoquímica promedio del polen seco y comparación con el polen fresco.....	79
Tabla 2-12. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen seco y comparación con polen fresco *	80
Tabla 2-13. Resultados de temperatura de pico y masa perdida del polen sometido a esterilización	83
Tabla 2-14. Resultados de DSC para polen fresco y estéril.....	84
Tabla 2-15. Composición fisicoquímica promedio del polen tratado en autoclave y comparación con polen fresco.....	86
Tabla 2-16. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen tratado en autoclave y polen fresco*	87
Tabla 2-17. Resultados de DSC para polen fresco y sometido a un proceso combinado secado-esterilización	91
Tabla 2-18. Resultados de pruebas de esterilidad comercial a muestras de polen con tratamiento combinado secado - esterilización.....	95
Tabla 2-19. Composición fisicoquímica promedio del polen con tratamiento combinado secado-esterilización y comparación con polen fresco	96
Tabla 2-20. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen con tratamiento combinado secado-esterilización y polen fresco*	97
Tabla 2-21. Resultados de DSC para polen fresco y sometido a un tratamiento combinado esterilización-secado	100

Tabla 2-22. Reporte microbiológico del tratamiento combinado de polen esterilización-secado.....	104
Tabla 2-23. Composición fisicoquímica promedio del polen con tratamiento combinado esterilización-secado y comparación con polen fresco	105
Tabla 2-24. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen con tratamiento combinado esterilización-secado y polen fresco*	106
Tabla 2-25. Resultados de las funciones de conveniencia y utilidad para los tratamientos térmicos seleccionados	110
Tabla 2-26. Efecto del tratamiento por altas presiones e inclusión de polen apícola sobre el contenido de fenoles totales, carotenoides totales, actividad antioxidante y carga microbiana de la muestra.	113
Tabla 2-27. Efecto de las altas presiones sobre el contenido de fenoles totales, carotenoides totales y actividad antioxidante (FRAP) y la carga microbiológica de la muestra.	117
Tabla 3-1. Descripción de las enzimas utilizadas para la elaboración de hidrolizados de polen.....	126
Tabla 3-2. Caracterización fisicoquímica del polen, pan de abejas, y polen estéril*	132
Tabla 3-3. Resultados de DSC para polen fresco y estéril.....	134
Tabla 3-4. Composición bioactiva de polen fresco, estéril e hidrolizado.....	139
Tabla 3-5. Perfil de aminoácidos para el polen fresco, polen estéril y productos hidrolizados.....	143
Tabla 3-6. Valores de conveniencia y utilidad a partir de la técnica de ordenamiento total.	146
Tabla 3-7. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con BAL	148
Tabla 3-8. Resultados de fermentación con BAL	153
Tabla 3-9. Contenido bioactivo y actividad antioxidante de los productos fermentados	156
Tabla 3-10. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con levaduras	159
Tabla 3-11. Resultados de fermentación con levaduras	163
Tabla 3-12. Contenido bioactivo y actividad antioxidante de los productos fermentados	165

Tabla 3-13. Resultados de las funciones de conveniencia y utilidad para las fermentaciones realizadas con los cultivos comerciales y ATCC	171
Tabla 3-14. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con las cepas ATCC <i>L. plantarum</i> y <i>S. cerevisiae</i>	173
Tabla 3-15. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con las cepas Choozit y <i>S. cerevisiae</i> comercial	174
Tabla 3-16. Resultados de conteo de células viables y demás parámetros fisicoquímicos de la fermentación de polen con mezcla de cultivos comerciales a diferentes intervalos de tiempo.....	178
Tabla 3-17. Resultados de conteo de células viables y demás parámetros fisicoquímicos de la fermentación de polen con mezcla de cultivos ATCC a diferentes intervalos de tiempo.....	180
Tabla 3-18. Resultados de las funciones de conveniencia y utilidad para las fermentaciones seleccionadas	185
Tabla 3-19. Perfil de aminoácidos en muestras de polen fresco, estéril y fermentado. .	186

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
BP	Concentración de polen	g/100g	Ecuación 2-5
D	Conveniencia		Ecuación 2-4
FRAP	Poder antioxidante reductor de hierro	$\mu\text{mol Trolox/g}$	
P	Presión	MPa	Ecuación 2-5
t	Valor de la función de transformación		Ecuación 2-3
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente en Trolox	$\mu\text{mol Trolox/g}$	
U	Utilidad		Ecuación 2-3
w	Peso aplicado a cada variable		Ecuación 2-3
X	Variable independiente		Ecuación 2-1
Y	Respuesta predicha en el modelo de regresión		Ecuación 2-1

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Definición
β	Coefficiente de los términos de regresión	Ecuación 2-1

Subíndices

Subíndice	Término
i	i-ésimo
p	número de variables

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
BAL	Bacterias acidolácticas
BHI	Brain Heart Infusion

Abreviatura	Término
CLSM	Microscopía láser confocal de barrido
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
DTG	Curva termogravimétrica
ELA	Equivalente de ácido láctico
EMB	Eosin Methylene Blue
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
GAE	Equivalente de ácido gálico
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glucónico
Gly	Glicina
His	Histidina
HMS	Hexose Monophosphate Shunt
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
OGY	Oxytetracyclin Glucose Yeast
PCA	Análisis de Componentes Principales
PDA	Agar papa dextrosa
Phe	Fenil alanina
Pro	Prolina
QE	Equivalente de quercetina
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
Ser	Serina
SPC	Standard Plate Count
Thr	Treonina
TSA	Agar de soya tríptico
Tyr	Tirosina
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV / VIS	Ultravioleta visible
Val	Valina
XLD	Xilosa, Lisina, Deoxicolato

Introducción

Desde que la humanidad inició a construir sociedades e introdujo la agricultura y la ganadería, la producción de alimentos ha venido sufriendo transiciones que permitieran satisfacer la demanda con respecto al crecimiento de la población. Hoy en día diferentes aspectos, tanto desde el punto de vista de la producción como del consumo, deben ser tenidos en cuenta en el contexto social y agroalimentario colombiano para comprender las necesidades de alimentación de la sociedad actual. Desde el punto de vista de la producción se debe garantizar la eliminación del hambre, la inseguridad alimentaria y la malnutrición, haciendo que las actividades agrícolas sean más productivas y sostenibles, reduciendo la pobreza rural y propiciando mercados inclusivos y eficientes (ONU, 2015a). Por otra parte, desde la perspectiva de las tendencias de consumo, éstas se ajustan a sociedades más conocedoras, conscientes y responsables en lo referente a su alimentación. El mercado se inclina favorablemente hacia la comercialización de alimentos naturales, que contengan un aporte de compuestos que vayan más allá de un beneficio nutricional, libre de compuestos químicos exógenos, y de preferencia de origen vegetal; todo esto ligado a condiciones de comercio justo y sostenible (ICEX, 2013).

Dentro de este contexto, la apicultura se presenta como una actividad agrícola que debería ser destacada dentro del desarrollo rural del país, ya que presenta una serie de ventajas enmarcadas dentro del desarrollo sostenible: en el aspecto ambiental las abejas mejoran la productividad agrícola a través de los procesos de polinización de cultivos; mientras que en los aspectos sociales y económicos, la extracción de productos de la colmena, en particular miel y polen, conducen a la obtención de ingresos a los apicultores y a una mejora en su calidad de vida.

Adicionalmente, la importancia de la investigación en productos apícolas en Colombia ha contribuido al desarrollo de esta cadena productiva y a su reconocimiento como alimentos que se ajustan a las tendencias de consumo, al ser productos de origen natural, altamente valorados por el consumidor, con características nutricionales y bioactivas favorables. Desde inicios de la década del 2000, diferentes entidades como el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, CORPOICA y COLCIENCIAS, han realizado esfuerzos para aumentar la productividad y competitividad en esta área mediante la financiación de proyectos de investigación aplicada. Los resultados han logrado acciones que favorecen el crecimiento de la cadena, como la creación de la Cadena Productiva de las abejas y la apicultura (2008), el Acuerdo de Competitividad del gremio de apicultores (2008), la Agenda Prospectiva de la cadena para el decenio 2010-2019, así como el plan

estratégico de la cadena de las abejas y la apicultura 2011-2025 (Laverde *et al.*, 2010; CPAA, 2011).

Este esfuerzo es coherente con la evolución propia de las necesidades del mercado y las proyecciones en materia de desarrollo que tiene la nación en esta materia para los próximos años, como lo establece el Consejo Nacional de Política Económica y Social bajo los documentos CONPES 3527 – Política Nacional de Competitividad y Productividad (2008) y CONPES 3582 – Política Científica y Tecnológica (2009), así como el Plan Nacional de Desarrollo 2014 - 2018 (Ley 1753 de 2015), los cuales incluyen como una valiosa estrategia para elevar la competitividad nacional las actividades relacionadas con el sector agropecuario y la ciencia, tecnología e innovación. De igual manera, se estipula la necesidad de la investigación y el aprovechamiento de la biodiversidad para la mejora de la competitividad y la productividad de la agroindustria colombiana.

En lo que respecta a los productos de la colmena, si bien la miel es el más reconocido, el polen se presenta como un alimento de origen vegetal de gran importancia, basado en sus características nutricionales y bioactivas. En el aspecto nutricional, el polen es una fuente importante de proteína, carbohidratos y lípidos, mientras que en lo bioactivo se destaca su contenido en compuestos fenólicos, carotenoides, minerales y fibra dietaria.

Aunque a primera vista el polen constituye una excelente reserva de compuestos nutricionales y bioactivos, al profundizar en su naturaleza y producción actual, se revelan serios inconvenientes. Inicialmente, el polen posee una estructura altamente rígida que es difícil de digerir en el tracto digestivo humano, limitando la capacidad de absorción de nutrientes para beneficio del organismo. Además, los métodos de cosecha y beneficio del polen no son coherentes con la calidad del producto, ya que se encuentran contaminaciones microbiológicas preocupantes.

A pesar de los avances alcanzados a lo largo de las investigaciones realizadas sobre polen en los últimos años, con respecto a la mejora de las condiciones de cosecha y procesos de transformación en polen, es muy escaso el grado de aprovechamiento de esta experiencia en el desarrollo de aplicaciones dirigidas a la nutrición humana. En este orden de ideas, la transformación de polen se presenta como una alternativa atractiva para mejorar la disponibilidad de los compuestos presentes en el grano. El hecho que una persona pueda suplir sus necesidades nutricionales con una menor porción de alimento, a través de la mejora de la disponibilidad de los compuestos presentes, es una estrategia útil para que con una misma cantidad de producto más personas puedan acceder a una alimentación completa.

En lo referente a investigaciones anteriores, la información disponible es tanto escasa como desorientadora. La mayor parte de la bibliografía dedicada al polen como alimento, se enfoca a la descripción de sus características fisicoquímicas y otra más a la evaluación del efecto del secado sobre las propiedades bioactivas, considerando que este tratamiento es necesario en el producto para reducir su contenido de humedad y así

poder incrementar su vida útil. No obstante, la bibliografía recomienda frecuentemente emplear temperaturas cercanas a 40°C para deshidratar polen basado en el criterio de una mínima reducción de compuestos termolábiles como carotenoides o vitaminas, desconociendo por completo los aspectos microbiológicos involucrados en el procesamiento a tales temperaturas; sólo recientemente nuevas investigaciones sugieren una revisión de estos aspectos con base en los hallazgos de hongos productores de aflatoxinas en polen seco (Deveza *et al.*, 2015). Entre tanto, algunos pocos trabajos hacen mención del empleo de bioprocesos para transformar el polen, tales como fermentación e hidrólisis enzimática, en los que se mencionan resultados satisfactorios, pero coinciden en la necesidad de profundizar en la investigación para la emisión de resultados confiables.

En el presente trabajo se aborda por tanto, la evaluación de alternativas para la transformación de polen apícola y su efecto en las características estructurales, microbiológicas, nutricionales y bioactivas, considerando tanto su gran potencial como alimento así como los inconvenientes que se tienen en la actualidad. Esta tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto de investigación *Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales*, financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS y ejecutado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia, el cual tiene como objetivo principal asegurar la inocuidad, manejo y transformación de polen apícola, con el fin de generar valor agregado mediante la comercialización de productos innovadores.

Con base en lo anterior y con el fin de contribuir a la búsqueda de alternativas que efectivamente se ajusten a considerar el polen como un producto de gran valor nutricional, que hasta el momento no ha sido aprovechado de acuerdo al potencial productivo que posee el país y que mejoraría la competitividad de la cadena de las abejas y la apicultura, se plantea la siguiente hipótesis de trabajo.

Hipótesis: La aplicación de tratamientos físicos y biotecnológicos influye en las características estructurales, nutricionales, bioactivas y microbiológicas del polen e incide en la calidad del producto obtenido luego del proceso.

Objetivo General:

Desarrollar alternativas de valorización de polen apícola como alimento mediante la aplicación de procesos físicos o biotecnológicos.

Objetivos Específicos:

- Establecer el tipo de tratamiento térmico indispensable para emplear el polen apícola como materia prima en procesos de transformación.

- Determinar el tipo de proceso de transformación (biotecnológico o físico) que permita aumentar la disponibilidad de los nutrientes y/o sustancias bioactivas presentes en el polen tratado en comparación al recolectado.
- Establecer la variación del contenido de sustancias biológicamente activas (antioxidantes, proteína, ácidos grasos, carotenos) causada por el proceso de transformación realizado.

Inicialmente, se realizó la caracterización palinológica, microbiológica y fisicoquímica del polen recolectado en el Altiplano Cundiboyacense, en los que se presentan las principales especies florales de las cuales es originaria el polen, así como se logra evidenciar el potencial bioactivo y nutricional del producto. En lo referente a la calidad microbiológica, se hace evidente la necesidad de realizar procesos que favorezcan la reducción del nivel de microorganismos a valores seguros.

La estrategia empleada en este trabajo contempló en su primera etapa la realización de procesos físicos como esterilización, secado o altas presiones hidrostáticas para garantizar fundamentalmente la reducción de la carga microbiológica a valores seguros. Al mismo tiempo, se evaluó el efecto de estos tratamientos sobre las características estructurales, fisicoquímicas, nutricionales y bioactivas del polen. Mediante métodos matemáticos, se seleccionó el mejor tratamiento basado en los criterios evaluados.

La segunda etapa consistió en el desarrollo de un proceso de transformación biotecnológico orientado al mejoramiento de indicadores nutricionales y bioactivos, tratando de reproducir un proceso que las abejas realizan en la colmena y que la bibliografía reporta como favorable para el aumento de la disponibilidad de los compuestos presentes en el polen. Con este fin, se realizaron ensayos de hidrólisis enzimática y fermentación. En el caso de hidrólisis enzimática se emplearon enzimas comerciales con diferente función (proteasas, pectinasa, lacasa, β -glucanasa), mientras que en la fermentación se emplearon cepas comerciales y cultivos puros de bacterias acidolácticas y levaduras; en ambos casos se deseaba establecer el efecto de estas enzimas y microorganismos tanto sobre la estructura del polen como en los indicadores previamente mencionados. La realización de un método matemático permitió encontrar el mejor tratamiento tanto de hidrólisis como de fermentación.

A partir de los resultados obtenidos fue posible establecer que los tratamientos físicos y biotecnológicos se presentan como una atractiva opción para transformar el polen en un producto con características nutricionales y bioactivas mejoradas, a partir de su evaluación a nivel *in vitro*. Los hallazgos encontrados en esta investigación han permitido la socialización y publicación de los mismos en diferentes eventos científicos y revistas especializadas. En total, en calidad de autor y co-autor, se han publicado nueve artículos y 16 trabajos en memorias de eventos. Se ha participado en 17 congresos científicos nacionales e internacionales, registrando 15 ponencias orales y cuatro posters. Adicionalmente, en el momento se cuenta con el sometimiento a evaluación de cuatro manuscritos para su publicación en revistas indexadas. Toda la información detallada acerca de la socialización de resultados se presenta en el Anexo A.

1.Revisión Bibliográfica

1.1. La apicultura en el contexto colombiano e internacional

La apicultura es el arte de la crianza y mantenimiento de las abejas para el aprovechamiento de los productos que de ellas pueden ser obtenidos. Desde épocas prehistóricas se conoce que el hombre ha empleado a las abejas para obtener principalmente miel, polen y cera, los cuales le permitían el intercambio comercial, el desarrollo de técnicas de orfebrería (técnica de la cera perdida) y su aprovechamiento como alimento. Hoy en día, la apicultura es una de las cadenas de la agricultura con mayores ventajas competitivas en términos de desarrollo sostenible, definido como: "desarrollo que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de futuras generaciones de satisfacer sus propias necesidades" (ONU, 1987).

La relevancia de la apicultura en el contexto mundial puede ser entendida desde los tres pilares que forman el desarrollo sostenible. En primer lugar, se encuentra el aspecto medioambiental. Las abejas son los principales polinizadores en ecosistemas terrestres (Brown and Paxton, 2009); la importancia económica para la industria agrícola de la polinización de frutales y demás cultivos inducido por abejas para la década pasada se estimaba en alrededor de 153 billones de euros anuales, representado en el 70% de los cultivos establecidos para proveer de alimentos a la humanidad (Gallai *et al.*, 2009). Incluso, esta información no tiene en cuenta el valor natural que aportan las abejas para la conservación de ecosistemas naturales (Costanza *et al.*, 1997), que evidentemente son difíciles de cuantificar en términos económicos.

Así mismo, las abejas han sido identificadas como indicadores medioambientales; los niveles de contaminación que ha alcanzado el planeta en los últimos años debido a actividades como la minería, la industrialización, las emisiones de efecto invernadero, entre otros, han promovido la desaparición de colmenas alrededor del mundo, por tal razón se considera a las abejas como bio-indicadores (Naggar *et al.*, 2013) y su nivel de abundancia en una zona determinada refleja la calidad del ambiente circundante.

En segundo lugar se encuentra el aspecto social. Según proyecciones de las Naciones Unidas, para el año 2050 la población mundial será de alrededor de 9600 millones de habitantes, aumentando la demanda sobre los recursos naturales y reduciendo la calidad

de vida en zonas donde la pobreza es generalizada (ONU, 2015b). Este crecimiento demográfico requiere que la capacidad productiva de alimentos esté en equilibrio con la demanda, es decir, en términos de seguridad alimentaria deberá existir una mayor producción de alimentos y por ende una mayor necesidad de áreas agrícolas. La conservación de las abejas será un factor fundamental para garantizar la polinización y, por tal motivo, necesariamente la sociedad deberá retribuir y reconocer a los apicultores su trabajo de conservación y manejo de las abejas.

Finalmente, la aportación más evidente de la apicultura se aprecia desde el aspecto económico con la producción de miel, polen, cera, propóleos, jalea real, veneno, entre otros.

En el mundo existen más de 80 millones de colmenas, con India, China, Turquía y Etiopía concentrando cerca del 40% del total (FAOSTAT, 2014). En lo que respecta al mercado nacional, el desarrollo de la cadena apícola ha tenido un rezago en materia de productividad y competitividad debido a diferentes problemas en la recolección, higiene, transformación y conservación de los productos obtenidos, lo cual ha reducido la capacidad de comercialización.

En Colombia existen alrededor de 120000 colmenas y 2400 apicultores, generando alrededor de 4800 empleos directos y otros 4800 ocasionales (MADR, 2015). En especial, en el país la comercialización de productos apícolas destinados a su consumo como alimento se concentra mayoritariamente en la miel y el polen. Para la primera, hasta el año 2014 la producción nacional alcanzaba cerca de 2900 ton por año, con un costo de producción promedio de \$ 4200 / kg (MADR, 2015), mientras el precio comercial oscila los \$ 20000 / kg, para el año 2015 (Apiarios El Pinar, Bogotá D.C., comunicación personal). En comparación a la producción mundial de miel, cercana a 1'660,000 ton al año (FAOSTAT, 2014), la producción de miel en Colombia representa el 0.17%. Se estima que en la actualidad sólo se aprovecha el 10% del potencial existente en Colombia para la recolección de productos de la colmena, mientras que países más pequeños como Uruguay, Chile, El Salvador y Guatemala superan a Colombia en número de colmenas y producción (Martínez, 2006; MADR, 2015). Este indicador refleja que la dimensión en que se realiza esta actividad no concuerda con la riqueza en diversidad botánica y geográfica existente en el país (ICTA, 2010).

Además de la miel, en los últimos años se ha potencializado la cosecha y comercialización de polen, que debido a sus características nutricionales y funcionales así como su reconocimiento por parte de los consumidores como un alimento natural, ha ganado posición dentro del mercado apícola como el segundo producto de interés. Colombia, a diferencia de otros países, posee unos rendimientos de producción de polen considerablemente superiores en comparación a otras zonas productivas tales como España o Portugal que alcanzan entre 8 y 10 kg por colmena al año, mientras en el país se pueden alcanzar valores de hasta 36 kg por colmena al año (Martínez, 2006). La baja producción que se reporta en otros países ha motivado que exista un limitado nivel de investigación tanto a nivel del mercado como de consumo, ocasionado principalmente por

ser un ingreso poco representativo para el sector apícola de estos lugares y la existencia de un mayor interés asociado a la investigación en otros alimentos que tienen un amplio reconocimiento. Sin embargo, en Colombia la alta productividad hace que este alimento sea altamente apreciado por parte de los apicultores y consumidores, con una creciente demanda en los últimos años.

En adición a algunos países del continente europeo, en América se produce polen en Estados Unidos y Brasil, y en menor escala, en Argentina y Chile. En el continente asiático, China presenta una producción total anual de polen de 3000 toneladas aproximadamente, que hizo aparición en el mercado hace pocos años con escasos resultados debido a su poco apetitoso sabor y a su precario procesamiento (Laverde *et al.*, 2010).

A nivel mundial no existen cifras consolidadas de producción de polen. Se estima que la producción nacional oscila las 280 toneladas al año, concentrándose en el Altiplano Cundiboyacense y Santander (60% de la producción total), Huila y Cauca (20%) y Antioquia (10%) (MADR, 2015). Un kg de polen tiene un costo de producción cercano a los \$ 17000 (MADR, 2015), mientras que el precio de venta está alrededor de \$ 44000 (Apiario los Cerezos, Boyacá; Apiarios el Pinar, Bogotá D.C., Comunicación Personal).

En Colombia la alta productividad de polen y su reconocida reputación en términos de calidad nutricional y funcional podría aprovecharse para mejorar el ingreso a nivel rural. El fomento de la apicultura y el aprovechamiento de los productos que se extraen de la colmena es, por lo tanto, una alternativa bastante interesante y peculiar ya que, a diferencia de la mayoría de las actividades productivas humanas, promueve la responsabilidad ambiental con los ecosistemas e impulsa el desarrollo del mercado de bienes y servicios, con el consecuente impacto en la calidad integral de vida (ICTA, 2010).

1.2. Condiciones actuales de manejo y procesamiento del polen

En la actualidad, y a pesar que en Colombia se ha logrado un avance significativo en años recientes en las Buenas Prácticas de Manejo a lo largo del proceso de recolección y posterior procesamiento del polen, es aún común encontrar algunas deficiencias. Las observaciones realizadas durante visitas técnicas realizadas en marco del proyecto *Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales* a diferentes apiarios ubicados en el Altiplano Cundiboyacense, permitieron identificar las etapas con mayores deficiencias, las cuales se resumen a continuación.

En lo correspondiente a las etapas de cosecha y recolección de polen, los aspectos más deficientes estuvieron relacionados con el diseño de las colmenas y trampas para polen. En el caso de las trampas, en general estaban diseñadas en materiales inadecuados (madera o plástico), que impedían su limpieza ocasionando un incremento desmedido de

la población de microorganismos. Otro aspecto está relacionado al tamaño reducido del sitio específico de la trampa por donde debe pasar la abeja, lo que puede causar mutilación y muerte, y estos restos caen directamente al cajón de almacenamiento del polen. Finalmente, por la manera como está diseñada la colmena, no existe la suficiente elevación de ésta con respecto al suelo, con lo que es común encontrar otros insectos en el cajón de polen o la proliferación de moho, por las altas condiciones de humedad del suelo y un reducido flujo de aire al interior (Zuluaga *et al.*, 2012; Durán, 2014; Durán *et al.*, 2014).

Una vez el polen es recolectado de las colmenas, el apicultor usualmente lo somete a procesos de remoción de impurezas macroscópicas y a un secado con aire caliente. No obstante, la remoción de impurezas es ineficiente, ya que tanto las partes de insectos, material vegetal u organismos vivos con tamaño inferior a la malla del tamiz empleado quedan en el producto. Adicionalmente, el secado es un proceso que aún genera mucha controversia. Varios autores sugieren el uso de temperaturas relativamente bajas (no mayores a 50°C) y tiempos cortos (no más de 6 horas) para prevenir la degradación de los componentes nutricionales y bioactivos encontrados en el grano (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2008, 2010; Bogdanov, 2011; Mesa, 2015). Incluso, la legislación brasilera establece como máxima temperatura de secado 42°C (Brasil, 2001). A pesar de esto, un proceso de secado realizado a un producto con una carga microbiológica inicial alta y sometido a temperaturas cercanas a los 40°C, no es garantía de eliminación de esta carga, y de manera contraria, puede incluso fomentar un aumento en la población de microorganismos por encontrarse a una temperatura cercana a la de incubación. Estudios en polen brasilero establecen que más del 90% de las muestras luego del proceso contienen hongos en cantidades mayores a lo permitido por la normativa, algunos de los cuales son productores de aflatoxinas (Deveza *et al.*, 2015).

Luego del procesamiento (secado y limpieza) el polen es almacenado, hasta el momento de comercialización. Actualmente la cadena apícola comercializa sus productos sin procesos de transformación, con lo cual no hay una innovación en el mercado ni tampoco lineamientos para la generación de valor. El desarrollo de nuevos productos o la transformación de los ya existentes, generará un mayor valor a la materia prima inicial, creando nuevas oportunidades de expansión para la cadena apícola nacional.

A continuación se realizará una descripción de la estructura y composición del polen apícola.

1.3. Polen apícola

1.3.1. Generalidades

El polen es el gametofito masculino de las flores empleado como medio para lograr la reproducción de las plantas. Las abejas cuando visitan las flores cubren su cuerpo con el polvo polínico presente en el material vegetal, formando pellets con su saliva que posteriormente fijan a las corbículas de sus patas traseras para así transportarlo hasta la colmena (Campos *et al.*, 2008). La importancia del polen para las abejas radica en que es su única fuente de proteínas, grasas, vitaminas y minerales y es su principal alimento durante su fase larval (Seeley, 2006). Este producto es originalmente cosechado por las abejas obreras como parte natural de su alimentación. Los apicultores recolectan la cantidad que hay en exceso en la colmena, que posteriormente es secado y comercializado para el consumo humano (Block *et al.*, 1994).

El polen ha sido utilizado por siglos en la dieta humana y la medicina tradicional por sus propiedades nutricionales y fisiológicas (Kroyer and Hegedus, 2001). En la actualidad, además de tales atributos, la concentración de sustancias nutricionales y bioactivas encontradas en este producto apícola lo convierten en un alimento con características funcionales, en consideración a los efectos saludables que tiene su consumo sobre el organismo. Estas declaraciones ya han sido soportadas con evidencia científica en otros países, lo que ha permitido su inclusión en los rótulos alimenticios. La Comunidad Europea, bajo la Regulación 1924 de 2006, permite las siguientes declaraciones sobre el polen (Bogdanov, 2011):

1. Una ingesta de polen y preparaciones especiales de polen (polen molido, extractos de polen) a largo plazo puede mejorar el rendimiento físico y bienestar de deportistas y personas mayores.
2. El consumo de polen puede mejorar la salud intestinal, gastroenterológica y hepática.

Así mismo, en países como Alemania, el polen es reconocido como nutraceutico por la *German Federal Board of Health* (Campos *et al.*, 2003).

1.3.2. Características estructurales del polen

Las paredes celulares del polen consisten en una serie de capas concéntricas estratificadas (ver Figura 1-1). En la parte central del polen se encuentra la célula viva, protegida por la esporodermis (intina) y seguida de la exina (Del Risco *et al.*, 2012).

El polen tiene dos núcleos, uno vegetativo, que origina el tubo de fertilización y otro con una célula generativa (Fuenmayor, 2009). La intina es una capa porosa compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectinas (Kovacik *et al.*, 2009) con espesor entre 0.5-1.2 μm (Özler *et al.*, 2011) y es estructuralmente similar a la pared celular de

una planta (Blackmore *et al.*, 2007). La capa externa conocida como exina es muy flexible, elástica, fuerte y firme, está hecha de esporopolenina un compuesto que provee resistencia química al polen y preserva los compuestos que están dentro de él (Rowley *et al.*, 1999; Rowley and Skvarla, 2000).

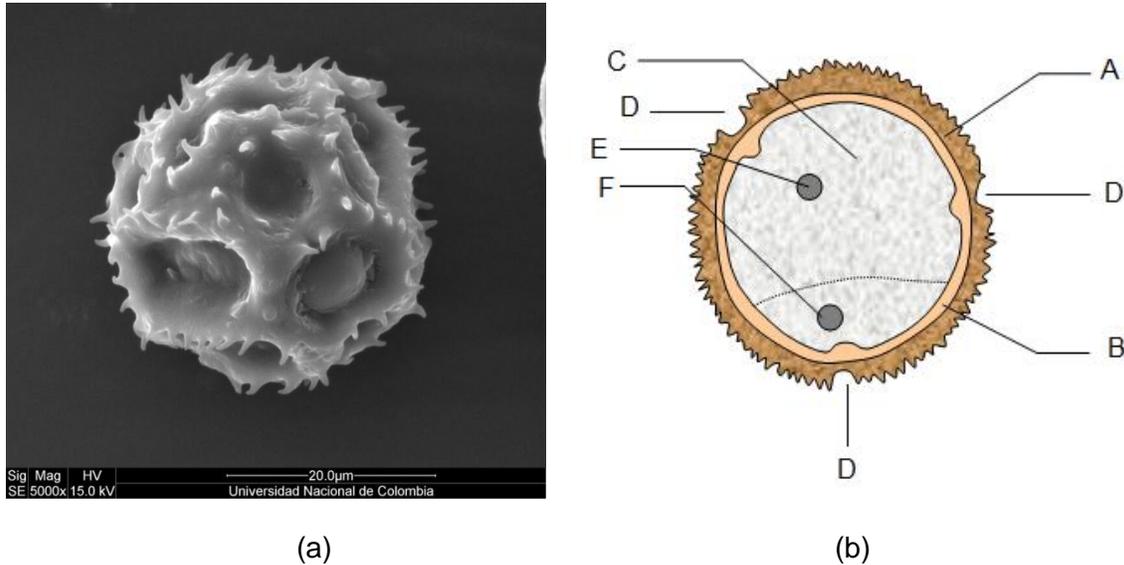


Figura 1-1. (a) Imagen por Microscopía electrónica de barrido de un grano de polen donde se hace visible la exina. (b) Estructura del polen. (A) exina; (B) intina; (C) citoplasma; (D) aperturas; (E) núcleo vegetativo; (F) núcleo de la célula vegetativa

A su vez, la exina está sub-dividida en una capa externa llamada sexina y una interna conocida como nexina, ambas compuestas principalmente por esporopolenina y otros componentes hasta ahora desconocidos (Scott and Stead, 1995; Suzuki *et al.*, 2008). Tanto la intina como la exina protegen el interior del grano de la oxidación, daños por radiación y degradación química producida por exposición a luz UV, entre otros (Atkin *et al.*, 2011; Del Risco *et al.*, 2012). Se sabe que la exina es rica en compuestos antioxidantes, mientras que en la intina están los demás compuestos nutricionales y bioactivos (Wakil *et al.*, 2010).

El análisis químico de la esporopolenina ha sido limitado debido a la dificultad de obtener grandes cantidades de exina sin que esto afecte o modifique la estructura de esta molécula (Southworth, 1988). Según Hemsley *et al.*, sólo existen diferencias mínimas en la composición de esporopolenina entre los diferentes tipos de plantas, sin importar si estas son gimnospermas o angiospermas (Hemsley *et al.*, 1993). La estructura de la esporopolenina ha sido extensivamente estudiada, está hecha primariamente de carbono, hidrógeno y oxígeno, con una fórmula empírica $C_{90}H_{144}O_{27}$ (Atkin *et al.*, 2011). Una estructura propuesta para la esporopolenina es: un copolímero lipídico de ácidos p-hidroxicinámicos (ferúlico y p-cumárico) y ácidos grasos, entrelazados con éteres y ésteres (Barrier *et al.*, 2010), así como carotenoides (Thomasson *et al.*, 2010), tocoferoles, pro-vitamina A y vitamina D (Del Risco *et al.*, 2012). Los lípidos evitan la

deseccación y muerte de la célula viva y los antioxidantes evitan la oxidación de algunos componentes del grano (Thomasson *et al.*, 2010; Del Risco *et al.*, 2012).

1.3.3. Composición fisicoquímica del polen

En términos de alimentación humana, el polen es considerado una sustancia natural que constituye una fuente potencial de proteínas, vitaminas, carbohidratos, ácidos grasos, fibra dietaria, minerales y compuestos bioactivos (Silva *et al.*, 2006). Adicionalmente se han reportado contenidos apreciables de flavonoides, los cuales actúan como agentes protectores del organismo por su capacidad antioxidante. Estudios recientes han demostrado que los flavonoides obtenidos de polen de diferentes orígenes geográficos contienen compuestos con diversa relevancia nutricional, de ahí la importancia de su caracterización y diferenciación (Saric *et al.*, 2009).

Dado que el polen proviene de tan diversas fuentes en el reino vegetal, los análisis del contenido nutricional y bioactivo siempre van a estar determinados por el origen geobotánico. El contenido de agua oscila entre 10% y 25%, proteína entre el 20 y 25% más un 10% de aminoácidos libres, lípidos entre 1% y 10%, carbohidratos en un rango del 20% al 35% y cenizas entre 2.5% y 6% (Del-Risco, 2002). Inicialmente, en la Tabla 1-1 se presentan algunos reportes acerca de la composición promedio de polen proveniente de varios lugares a nivel mundial, mientras que posteriormente, se hará una descripción de la estructura del grano.

Dado que la composición del polen es variable según su origen botánico y geográfico, países como Portugal, Suiza, Argentina, México y Brasil han establecido normativas internas e independientes que han favorecido en estos lugares el control de calidad de este producto. El crecimiento del mercado en estas zonas y la potencialidad de exportación de este alimento motivaron la creación de una normativa a nivel internacional para fijar los intervalos de las condiciones microbiológicas y nutricionales que debía cumplir el polen. Gracias a estas iniciativas en el 2008 se redactaron los métodos analíticos estándar para el análisis fisicoquímico de polen (Campos *et al.*, 2008). En la Tabla 1-2 se presenta el valor sugerido por la normativa estándar.

Por otra parte, como resultado de la ejecución del proyecto de investigación *Selección de Indicadores Fisicoquímicos Mediante la Aplicación de Nariz Electrónica para la Catalogación de Productos Apícolas*, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y Ejecutado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Nacional de Colombia, se propusieron los requisitos fisicoquímicos para la elaboración de una norma técnica de polen apícola, con base en la caracterización del polen proveniente de los departamentos Boyacá y Cundinamarca, cuyos requisitos son mostrados en la Tabla 1-3.

Tabla 1-1. Reportes de composición fisicoquímica de pólenes a nivel mundial

Origen Geográfico	Origen Botánico	Humedad (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	Fibra cruda (%)	Digestibilidad (%)	Referencia
Colombia	Multifloral	7.7 ± 5.2	23.8 ± 3.2	6.9 ± 3.5	2.5 ± 0.4	-	-	(Fuenmayor <i>et al.</i> , 2014)
Brasil	Multifloral	7.4 ± 0.7	21.0 ± 4.0	7.0 ± 2.0	2.4 ± 0.8	-	-	(Almeida-Muradian <i>et al.</i> , 2005)
Serbia	N.E.	-	24.0 ± 0.1	4.7 ± 0.3	2.8 ± 0.1	-	-	(Andelkovic <i>et al.</i> , 2012)
Bulgaria	N.E.	13.8 ± 1.1	19.8 ± 0.9	7.2 ± 0.5	1.8 ± 0.1	-	-	(Balkanska and Ignatova, 2012)
Arabia Saudi	Oliva	28.5 ± 3.2	40.0 ± 4.2	30.6 ± 2.5	6.5 ± 1.0	2.5 ± 0.1	-	(Basuny <i>et al.</i> , 2013)
Australia	<i>Eucalyptus marginata</i>	3.2 ± 0.2	20.6 ± 1.1	0.8 ± 0.2	2.2 ± 0.1	15.6 ± 5.1	52.0 ± 9.0	(Bell <i>et al.</i> , 1983)
Brasil	N.E.	4.2 ± 1.7	20.5 ± 2.6	4.9 ± 0.7	2.9 ± 0.5	3.4 ± 0.6	-	(Carpes <i>et al.</i> , 2009)
Brasil	N.E.	3.5 ± 0.3	23.4 ± 1.2	5.4 ± 0.6	3.0 ± 0.2	-	-	(de Arruda <i>et al.</i> , 2013)
Portugal	Multifloral	-	21.8 ± 2.2	5.2 ± 0.6	2.9 ± 0.7	-	-	(Feás <i>et al.</i> , 2012)
Italia	<i>Castanea</i>	10.8 ± 1.3	26.6 ± 0.3	2.1 ± 0.1	2.6 ± 0.2	-	-	(Gabriele <i>et al.</i> , 2015)
Sudáfrica	<i>Aloe greatheadii</i> var. <i>davyana</i>	18.8 ± 3.3	31.4 ± 1.0	5.5 ± 1.0	3.6 ± 0.2	-	-	(Human and Nicolson, 2006)
Brasil	Multifloral	16.6 ± 0.0	19.8 ± 0.0	3.4 ± 0.0	2.0 ± 0.1	-	-	(Sattler <i>et al.</i> , 2015)

Resultados en base seca, excepto humedad.

N.E.: No especifica.

Tabla 1-2. Sugerencia para la normativa estándar de valores promedio de composición de polen

Componente	Contenido Min-Max g/100 g peso seco	Sugerencia para la normativa estándar
Proteínas	10-40	No menos de 15 g/100 g
Lípidos	1-13	No menos de 1.5 g/100 g
Carbohidratos totales	13-55	No menos de 40 g/100 g
Fibra dietaria total	0.3-20	-
Cenizas	2-6	No más de 6 g/100 g

Referencia: (Campos *et al.*, 2008)

Tabla 1-3. Sugerencia de normativa técnica para pólenes del altiplano cundiboyacense

Componente	Sugerencia para normativa
Carbohidratos (% en base seca)	Mayor o igual a 55 y menor o igual a 78
Proteína (N x 6.25) (% en base seca)	Mayor o igual a 12
Lípidos (% en base seca)	Mayor o igual a 1.8
Humedad (%)	Menor o igual a 6
Cenizas (% en base seca)	Menor o igual a 3.5
pH	Mayor o igual a 4 y menor o igual a 6

Referencia: (ICTA, 2007)

A continuación se hará una breve descripción acerca de los componentes nutricionales y bioactivos presentes en el polen apícola.

1.3.3.1. Humedad

La humedad es un parámetro importante en la calidad del polen, ya que es útil para evitar eventuales reacciones de deterioro y proliferación de microorganismos que ocasionan la alteración de polen por fermentación espontánea (Bogdanov, 2011), por lo que generalmente es sometido a procesos de remoción de humedad, comúnmente secado. El contenido de humedad para comercialización debe ser menor al 6% (Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Bogdanov, 2004). Se han establecido límites para este parámetro en normativas de Argentina, México y El Salvador, con un valor máximo en Argentina de 4.0% (Argentina, 1990) y rangos entre 4.5-8.0%, para México y El Salvador (México, 1998; Salvador, 2005), respectivamente.

1.3.3.2. Carbohidratos

El polen apícola contiene entre 15-60% de carbohidratos, entre los que se encuentran azúcares reductores, polisacáridos y fibra dietaria (Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; González *et al.*, 2005). La normativa argentina establece un rango del contenido de carbohidratos entre 45-55% (Argentina, 1990).

Los monosacáridos mayoritarios son fructosa y glucosa, los cuales generalmente provienen del néctar o la miel (Prado, 2005). Son pocos los trabajos que calculan analíticamente el contenido de carbohidratos en el polen, la mayoría lo hacen por diferencia. No obstante, algunos reportes acerca del contenido total de azúcares reductores (glucosa y fructosa) mencionan un intervalo de concentración entre 22%-33% (Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Saavedra *et al.*, 2013).

En cuanto al contenido de polisacáridos se ha evidenciado la presencia de maltosa, isomaltosa, trehalosa, rafinosa, erlosa, almidón, celulosa y hemicelulosa (Campos *et al.*, 2008; Del Risco *et al.*, 2012). En pólenes provenientes de lugares de clima frío se reporta un contenido elevado de almidón, dado que las plantas lo almacenan en mayores cantidades (Saavedra *et al.*, 2013). En la Tabla 1-4 se presentan algunos reportes del contenido de polisacáridos en polen.

Tabla 1-4. Reporte de contenido de polisacáridos en polen.

Carbohidrato	Rango (%)	Referencia
Fibra cruda	0.43 - 20.00	(Campos <i>et al.</i> , 2008; Bogdanov, 2011)
Fibra dietaria total	0.30 - 20.00	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Campos <i>et al.</i> , 2008; Bogdanov, 2011; Domínguez-Valhondo <i>et al.</i> , 2011)
Fibra dietaria insoluble	11.30 - 13.10	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997)
Fibra dietaria soluble	1.30 - 3.03	
Almidón	2.13 - 18.00	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Szczesna, 2007a)
Glucosa	8.45 - 45.57	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Szczesna, 2007a; Domínguez-Valhondo <i>et al.</i> , 2011)
Fructosa	9.74 - 46.00	
Sacarosa	0.06 - 8.55	
Trehalosa	0.20 - 3.20	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Szczesna, 2007a)
Isomaltosa	0.22	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997)
Maltosa	1.07 - 5.61	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Szczesna, 2007a)
Rafinosa	0.15	(Serra-Bonvehi and Jordá, 1997)
Erlosa	0.15	
Melecitosa	0.01 - 2.75	
Turanosa	0.20 - 0.58	

1.3.3.3. Lípidos

Se han reportado contenidos de lípidos en polen apícola entre 0.5-20%, siendo su principal reservorio la capa externa del grano (Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; González *et al.*, 2005; Del Risco *et al.*, 2012). Dentro de los lípidos se pueden encontrar esteroides, mono, di y triglicéridos, 31 ácidos grasos esenciales, fosfolípidos, hidrocarburos y terpenos (Del Risco *et al.*, 2012). Aunque depende del origen botánico, se ha establecido que el polen es una fuente importante de ácidos grasos insaturados (Loper *et al.*, 1980; Saa-Otero *et al.*, 2000; Čeksterytė *et al.*, 2008). La descripción del contenido de ácidos

grasos de algunos pólenes de diversos orígenes es presentado en la Tabla 1-5, en el cual se destaca que el polen colombiano posee un contenido apreciable de ácido α -linolénico.

Tabla 1-5. Contenido promedio de ácidos grasos en polen

	mg/100 mg lípidos			
	Colombia	USA		China
	(Fuenmayor <i>et al.</i> , 2014)	(Loper <i>et al.</i> , 1980)	(Ching and Ching, 1962)	(Xu <i>et al.</i> , 2009)
α -linolénico [C18:3n3]	25.68	18.71	31.5	38.6
Palmítico [C16:0]	11.33	26.46	13.4	20.0
Linoleico [C18:2n6c]	8.19	26.2	4.4	13.0
Laurico [C12:0]	4.61	0.9	6.1	
Oleico [C18:1n9c]	2.38	15.78	16.5	5.72
Esteárico [C18:0]	1.88	4.09	12.2	3.02
homo- γ -linolenico [C20:3n6]	1.62			
Mirístico [C14:0]	1.33	0.22	1.8	4.97
Tricosanoico [C23:0]	1.17			
Relación Ins/Sat	1.78	1.61	1.17	1.91

1.3.3.4. Proteína y aminoácidos

La proteína presenta un amplio rango en su contenido, encontrándose entre 7.5 y 40.0% (Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Prado, 2005; González *et al.*, 2005). Además, dentro de las sustancias nitrogenadas encontradas en polen, se han reportado enzimas como la amilasa, invertasa, algunas fosfatasas y transferasas; así como cofactores enzimáticos, entre los que están la biotina, el glutatión, el NAD y algunos nucleótidos (Del Risco *et al.*, 2012).

En cuanto al contenido de aminoácidos, la prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, lisina y leucina son los predominantes, constituyendo aproximadamente el 55% del total (Szczena, 2006), los cuales son descritos para algunos pólenes en la Tabla 1-6. Los aminoácidos histidina, tirosina, metionina y cisteína tienen una evidenciada actividad antioxidante (He *et al.*, 2012). La fenil alanina es el principal componente activo que muestra actividad antioxidante, lo que puede ser atribuido al hecho que cuando es expuesta a radicales hidroxilo, es convertida a tirosina, y la tirosina ataca radicales hidroxilo (Togashi *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2010). En el caso de la cisteína, su actividad se debe al enlace -SH (Pasini *et al.*, 2001). Los aminoácidos hidrofóbicos juegan un papel importante en la inhibición de la oxidación de lípidos (Chen *et al.*, 1996). Así mismo, los péptidos de bajo peso molecular han sido reportados como aquellos que exhiben las mejores actividades anti-radicalarias comparados con los de mayor peso (Ajibola *et al.*, 2011).

Tabla 1-6. Contenido de aminoácidos de pólenes de diversos orígenes

	Contenido (mg/g proteína) (base seca) (Polonia) (Szczesna, 2006)	Contenido (mg/g proteína) (Colombia) (GAUN, 2003)	Contenido (mg/g proteína) (Suráfrica) (Human and Nicolson, 2006)
Aminoácidos esenciales			
Treonina	1.97	-	4.39
Valina	1.77	4.23	4.82
Metionina	0.83	2.12	1.53
Isoleucina	1.49	2.81	4.08
Leucina	4.29	-	6.96
Fenilalanina	1.75	4.50	4.15
Histidina	0.82	1.71	1.89
Lisina	3.09	10.5	6.06
Arginina	1.90	8.96	5.09
Triptófano	-	-	0.14
Aminoácidos no esenciales			
Ácido aspártico	4.74	5.91	8.58
Serina	2.18	7.00	5.25
Ácido glutámico	4.15	9.58	9.75
Prolina	5.84	-	6.21
Glicina	1.77	11.0	3.97
Alanina	1.72	17.0	5.02
Tirosina	0.99	1.89	2.75

1.3.3.5. Cenizas y minerales

Los elementos minerales con mayor contenido son potasio, sodio, calcio, magnesio y fósforo (Orzáez *et al.*, 2001). En polen español se ha encontrado que el mineral predominante es el potasio con aproximadamente el 60% del contenido total de cenizas y el fósforo, calcio, sodio y magnesio con el 39.9% (Serra-Bonvehi and Jordá, 1997; Campos *et al.*, 2008). Dentro de los elementos traza se encuentran el aluminio, boro, cloro, cobre, yodo, hierro, manganeso, níquel, sílice, azufre, titanio y zinc (Del Risco *et al.*, 2012). En la Tabla 1-7 se presentan algunos reportes sobre la composición mineral en polen.

1.3.3.6. Compuestos bioactivos

Dentro de las sustancias biológicamente activas, se han reportado un número considerable en polen, como compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, antocianinas, fosfolípidos y proteínas (Tomas-Lorente *et al.*, 1992; Ukiya *et al.*, 2003; Di Paola-Naranjo *et al.*, 2004; Nagata *et al.*, 2005; Napoli *et al.*, 2006). Estudios posteriores han mostrado ciertos beneficios terapéuticos por su actividad anti-radical: (Nagai *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006; Leja *et al.*, 2007), inhibición de la

peroxidación de lípidos (Almaraz-Abarca *et al.*, 2007) e inclusive supresión de la respuesta celular y humoral (Yuan and Xu, 1996; Qin and Sun, 2005).

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes en el polen, y son responsables del color del grano, (amarillo, café, rojo, púrpura, entre otros), así como del sabor amargo característico (Bogdanov, 2011). Algunos compuestos fenólicos presentes en el polen son los ácidos p-hidroxibenzóico, p-cumárico, vanílico, gálico y ferúlico, así como los flavonoides quercetina, isohamnetina, galangina, crisina y pinocembrina (LeBlanc *et al.*, 2009; Saric *et al.*, 2009). En el polen la mayoría de los flavonoides existen como glicósidos, llamados agliconas (Stanley and Linskens, 1974). Aunque aún no existe una recomendación de ingesta diaria de flavonoides, se sugiere un consumo entre 200 y 1000 mg diarios (Bogdanov, 2011). En la Tabla 1-8 se presentan algunos reportes de contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales en polen.

Tabla 1-7. Contenido promedio de minerales en polen

Minerales	Contenido Min-Max mg/kg	Referencias
Potasio	4000 – 20000	(Stanley and Linskens, 1974; Herbert and Shimanuki, 1978; Serra-Bonvehi <i>et al.</i> , 1986)
Magnesio	200 – 3000	
Calcio	200 – 3000	
Fósforo	800 – 6000	
Hierro	11-170	
Zinc	30 – 250	
Cobre	2 – 16	
Manganeso	20 – 110	

Tabla 1-8. Reporte de contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en polen

Origen geográfico	Fenoles Totales mg EAG/100g	Flavonoides Totales mg EQ/100g	Referencias
Colombia	973 - 1695	420 - 612	(Zuluaga <i>et al.</i> , 2015)
Portugal	1290 - 1980	4500 - 7100	(Feás <i>et al.</i> , 2012)
Polonia	1515 - 8025	-	(Leja <i>et al.</i> , 2007)
Estados Unidos	1591 - 3485	266 - 548	(LeBlanc <i>et al.</i> , 2009)
Brasil	360 - 1090	-	(Carpes <i>et al.</i> , 2007)
España	850 - 1460	380 - 760	(Serra-Bonvehi <i>et al.</i> , 2001)
Argelia	2190 - 2668	-	(Rebiai and Lanez, 2012)
Rumania	376 - 2880	255 - 2044	(Prelipcean, 2012; Margaoan <i>et al.</i> , 2013)

EAG: Equivalentes de ácido gálico. EQ: Equivalentes de quercetina

De otro lado, los carotenoides son importantes por el aporte de los colores amarillos característicos al grano y por proveer actividad antioxidante (Fernández-García *et al.*, 2012). En particular, los siguientes carotenoides han sido identificados en el polen: β -caroteno, criptoxantina, β -caroteno-5,6,5,6-diepóxido, zeaxantina, anteraxantina,

violaxantina, neoxantina, flavoxantina, luteína, 9/9-(Z)-luteína, y luteoxantina (Schulte *et al.*, 2009)

La bibliografía también reporta otros componentes de interés para el polen como son las vitaminas (ver Tabla 1-9). Las vitaminas son una contribución nutricional importante del polen, especialmente de provitamina A, vitamina E, niacina, tiamina, ácido fólico y biotina (Almeida-Muradian *et al.*, 2005).

Tabla 1-9. Contenido promedio de vitaminas en polen

Vitaminas	Contenido Min-Max mg/kg	Referencia
β-caroteno	10 -200	(Talpay, 1984; Oliveira, 2006)
C; Ácido ascórbico	70 – 560	
B1; Tiamina	6 -13	(Stanley and Linskens, 1974; Szczesna and Rybak-Chmielewska, 1998)
B2; Riboflavina	6 – 20	
B3; Niacina	40 – 110	
B5; Ácido pantoténico	5 – 20	
B6; Piridoxina	2 -7	
H; Biotina	0.5 – 0.7	
Ácido fólico	3 – 10	(Oliveira, 2006)
E; Tocoferol	40 – 320	

Con base en lo presentado anteriormente, es clara la importancia del polen apícola como una fuente alimenticia de origen vegetal con potencial nutricional y bioactivo. A pesar de esto, serías dudas han surgido en diferentes investigaciones acerca de la biodisponibilidad de los compuestos de interés presentes en el polen (desde un punto de vista metabólico) para especies monogástricas como los seres humanos, la cual se encuentra en niveles significativamente inferiores si es comparado a los reportes para otros tipos de alimentos, como lo pueden ser los productos lácteos. Por ende, es importante hacer una descripción de la disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos del polen.

1.3.4. Disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos del polen

La calidad nutricional del polen depende principalmente de su contenido de proteínas (Pernal and Currie, 2000), además de algunas vitaminas y minerales (Winston, 1991). Conjuntamente, su valor nutricional depende de la proporción de aminoácidos esenciales y de su digestibilidad (parámetro usado para medir el valor nutricional de un alimento) y biodisponibilidad (parte del nutriente que el cuerpo digiere, absorbe y usa en funciones fisiológicas), las cuales parecen estar estrechamente relacionadas con algunas

características morfológicas en los granos, tales como su porosidad y el grosor de su pared externa (Roulston and Cane, 2000; Cook *et al.*, 2003).

Investigaciones previas señalan que la disponibilidad de los componentes del polen apícola aprovechables por los seres humanos, entre compuestos nutricionales y bioactivos, es limitada y por tanto también lo es su uso como alimento (Pernal and Currie, 2000; Cook *et al.*, 2003). Desde hace algunos años han surgido dudas sobre la capacidad del sistema digestivo humano para romper la capa externa que recubre el polen y absorber los nutrientes y sustancias bioactivas que se encuentran dentro. Diferentes simulaciones *in vitro* de la digestión humana sugieren que el polen es parcialmente digerido – entre 48% y 59% - (Franchi *et al.*, 1997), incluso estudios antropológicos mencionan el hallazgo de coprolitos con pólenes intactos de periodos entre 1400 - 200 A.C. Estos aspectos evidencian la rigidez de la estructura externa del polen y reflejan la necesidad de encontrar alternativas de transformación del polen para un aprovechamiento integral de este producto.

A pesar que se han logrado importantes avances en la caracterización de polen apícola en el contexto nacional e internacional, quedando demostrada la potencialidad del polen como fuente nutricional y bioactiva para ser empleada como alimento, sería interesante desarrollar algún proceso que rompa su fuerte estructura y que aumente la biodisponibilidad de estas sustancias. No obstante, la bibliografía no reporta mayor información de procesos de transformación para desarrollar alimentos que empleen el polen como materia prima en búsqueda de alternativas nutricionales para humanos, particularmente aquellas de origen vegetal. A pesar de la ausencia de información concluyente, el punto de vista común de los investigadores es que el polen es insuficientemente digerido y que una modificación de la pared externa del polen mejoraría la disponibilidad y digestibilidad (Rimpler, 2003; Campos *et al.*, 2010). Por consiguiente, se requiere profundizar en el estudio de los fenómenos que ocurren durante las operaciones aplicadas en su transformación y en las relaciones existentes entre éstas y los distintos factores que determinan su inocuidad y valor nutricional y bioactivo. En este orden de ideas podría plantearse la hipótesis que la realización de procesos de transformación influirá favorablemente en las características estructurales, nutricionales, bioactivas y microbiológicas del polen y, por lo tanto, incidirá en la mejora de la calidad del producto obtenido.

1.4. Alternativas para la transformación de polen

Como se menciona anteriormente, existe la necesidad de definir un tratamiento que pueda manejar la contaminación microbiológica del polen y generar valor agregado al producto, a través del establecimiento de procesos de conservación o de transformación, los cuales han demostrado que provocan cambios favorables en las características nutricionales y bioactivas de la materia prima (Bylund, 1995).

En resumen, en este trabajo se seleccionó el polen apícola debido a su potencial como una valiosa fuente de compuestos nutricionales y bioactivos, como un producto promisorio para su inclusión en la dieta de forma directa o como materia prima en diversos productos alimenticios. Sin embargo, se plantean dos principales inconvenientes que limitan la calidad del producto como fuente nutricional; el primero de ellos está basado en su compleja estructura que dificulta la disponibilidad de los componentes antes mencionados para ser absorbidos por el organismo humano, y en segundo lugar, el bajo nivel de conocimiento sobre los efectos que podría tener sobre las características estructurales, nutricionales y bioactivas del polen apícola la realización de procesos de transformación.

Es así que este trabajo se presenta como un aporte hacía el establecimiento de un proceso de transformación que dé una solución a las problemáticas previamente mencionadas, favoreciendo la disponibilidad de compuestos nutricionales y bioactivos y al mismo tiempo, creando una herramienta de generación de valor e innovación en un área de potencial explotación a nivel comercial.

A continuación, se realiza una descripción acerca de antecedentes referentes al proceso de transformación de polen con el fin de mejorar sus indicadores microbiológicos y nutricionales, así como se presentan algunas alternativas de procesamiento que se plantean útiles para la modificación estructural del polen, basado tanto en procesos llevados a cabo en la naturaleza como los reportados por diversos investigadores.

Existen diversos antecedentes en los cuales se reporta una modificación de la estructura del polen, con una consecuente mejora en ciertos indicadores nutricionales y bioactivos, que pueden ser divididos en dos categorías. La primera corresponde a la transformación natural que ocurre en el polen dentro de las colmenas, mientras que la segunda hace referencia a los desarrollos hechos por los humanos para transformar el grano, principalmente a través de procesos físicos y biotecnológicos.

Inicialmente, se realizará una breve descripción del proceso ocurrido en la colmena para posteriormente mencionar los procesos de transformación de polen realizados por el hombre.

1.4.1. Transformación natural del polen en la colmena

Se sabe que en las colmenas, las abejas rara vez consumen el polen directamente sino después que ha sido almacenado en celdas (Standifer *et al.*, 1980), con el fin de someterlo a un proceso de transformación bioquímico y convertirlo en un producto conocido como “pan de abejas” el cual se considera que aumenta la disponibilidad de los nutrientes y componentes bioactivos. El pan de abejas hace referencia al polen procesado por las abejas, que mediante la inclusión de bacterias y levaduras, más la adición de secreciones salivares y miel, es sometido a una fermentación dentro de las

celdas de la colmena y que será la fuente de proteína y lípidos para la población de abejas (Bogdanov, 2011).

Del Risco (2002), con base en sus investigaciones estableció que el proceso de obtención de pan de abejas ocurre en un proceso de colonización secuencial de microorganismos de acuerdo a las condiciones tanto de la celda de la colmena como del sustrato. Este proceso de fermentación ocurriría en tres etapas diferenciadas; inicialmente la abeja deposita el grano de polen en una de las celdas destinadas para tal fin dentro de la colmena, donde además agrega secreciones salivares y un poco de miel. Esta última cumple la función de ser una fuente de carbohidratos para el crecimiento inicial de los microorganismos así como de servir como un sello para la generación de condiciones anaerobias dentro de la celda (Del Risco, 2002).

En este momento, es claro que la microbiota presente es abundante y heterogénea, no sólo por los microorganismos presentes naturalmente en el polen, sino por aquellos que habitan en el tracto digestivo de la abeja; sin embargo los estudios demuestran que diferentes especies de la bacteria *Pseudomona* sp. y la levadura *Torulopsis* sp. son los colonizadores en la primera etapa (Gilliam, 1979a; Del Risco *et al.*, 2012). Estos microorganismos inducen una fermentación en condiciones aerobias, en la cual se estima que los principales resultados son el descenso del pH del medio con un consecuente incremento en la acidez, la producción de vitaminas del complejo B por parte de la levadura, y el agotamiento del oxígeno remanente en la celda (Del Risco, 2011). De igual manera, diferentes investigaciones le atribuyen a las bacterias del género *Pseudomona* sp. una alta actividad enzimática, y particularmente una producción de la enzima cutinasa que degrada cutina, uno de los componentes estructurales de la exina (Dutta *et al.*, 2009).

El agotamiento del oxígeno y el descenso en el pH ocasionan un decrecimiento en la población de *Pseudomona* sp., situación que es aprovechada por diferentes especies de *Bacillus* y *Streptococcus*, siendo los colonizadores del sustrato en la segunda etapa de fermentación; en este instante el proceso se lleva a cabo en condiciones anaerobias (Del Risco, 2011). Estos microorganismos aparentemente tienen la capacidad de predigerir el polen, así como inhibir la aparición de otros microorganismos que puedan afectar la salud de la colmena (Gilliam, 1979a). Algunos autores además consideran que las enzimas producidas por el metabolismo de estos: pectinasas, celulasas, amilasas, proteasas, β -glucanasas e isomerasas tienen algún efecto sobre el rompimiento de la exina bajo fermentación anaerobia (Katz and Demain, 1977; Baptist *et al.*, 1978), pero en realidad se desconoce si estas enzimas son un factor influyente en la obtención de pan de abejas en la colmena.

La tercera etapa inicia con un decrecimiento en la población de *Bacillus* y *Streptococcus* y la colonización del sustrato por diferentes tipos de bacterias ácido lácticas (BAL). Estas bacterias producen rápidamente ácido láctico, hasta un punto en el cual es lo suficientemente tóxico para los otros microorganismos (aproximadamente un 3% de ácido láctico), ocurriendo una desaparición de estos y de las levaduras que aún

quedaban en el pan de abejas (Del Risco, 2011). Stirling y Whittenburg mencionan que las BAL no hacen parte de la microflora de las plantas con lo cual su presencia se debe al aporte que hacen las abejas para favorecer este bioproceso (Stirling and Whittenburg, 1963).

Vázquez y Olofsson concluyen que la relación entre las BAL y las abejas es de dependencia, las BAL obtienen un nicho donde los nutrientes están disponibles, y las abejas son protegidas por las BAL de microorganismos dañinos (Vásquez and Olofsson, 2009). Aún no está muy bien dilucidado el origen de las BAL presentes en las colonias de abejas, es posible que algunas especies sean adquiridas ambientalmente (McFrederick *et al.*, 2012). Martinson *et al.* sugieren la hipótesis que los microorganismos asociados a las abejas son transferidos verticalmente entre generaciones vía trofalaxis (traspaso de comida entre animales vía oral) (Martinson *et al.*, 2011). En la Tabla 1-10 se presentan algunos de los microorganismos aislados del pan de abejas.

Tabla 1-10. Principales microorganismos encontrados durante el proceso de transformación de polen en pan de abejas (Gilliam, 1979a).

Bacilos	Levaduras
<i>B. subtilis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>B. megaterium</i>	<i>Candida reukaufii</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>B. circulans</i>	<i>Torulopsis candida</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>Torulopsis etchellsii</i>
Lactobacilos	<i>Torulopsis famata</i>
<i>L. kunkeii</i>	<i>Torulopsis globosa</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>Torulopsis incospicua</i>
<i>L. fructosus</i>	<i>Torulopsis magnoliae</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>Torulopsis sake</i>
	<i>Torulopsis stellata</i>

Son escasos los reportes bibliográficos en los que se haga mención de las características fisicoquímicas del pan de abejas. Se conoce que el pan de abejas está compuesto mayormente por proteínas, algunos compuestos bioactivos, aminoácidos libres, ácidos grasos y azúcares (Del Risco *et al.*, 2012). Entre las proteínas se encuentran enzimas como amilasa, fosfatasa-ácida y alcalina y la enzima glucosa oxidasa (Gilliam, 1979b; Del Risco *et al.*, 2012) y algunos aminoácidos como alanina, valina, leucina, prolina, fenilalanina, entre otros (Isidorov *et al.*, 2009). Entre los ácidos grasos encontrados se tiene el linolénico, linoleico, octadecanoico y otros, mientras que los azúcares reportados son la sacarosa, maltosa, maltulosa, isomaltosa y turanosa (Isidorov *et al.*, 2009). Es importante notar que el contenido de azúcares reductores es mayor en el pan de abejas que en el polen (Gilliam, 1979b).

Entre los compuestos bioactivos encontrados están carotenoides (provitamina A) y vitaminas C, B, E y K (Gilliam, 1979b; Del Risco *et al.*, 2012). Se han encontrado

compuestos fenólicos 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 (Baltrusaityte *et al.*, 2007; Isidorov *et al.*, 2009). En la Tabla 1-11 se presentan algunos reportes de composición fisicoquímica de pan de abejas.

Tabla 1-11. Reportes de composición de pan de abejas.

Origen Geográfico	Humedad (%)	Proteína (%)	Lípidos (%)	Cenizas (%)	Referencia
Serbia	-	29.93 ± 8.58	4.92 ± 0.70	3.05 ± 0.23	(Andelkovic <i>et al.</i> , 2012)
Colombia	18.44	21.00	6.69	2.22	(Fuenmayor, 2009)

Otros reportes hacen mención del contenido mineral y perfil de ácidos grasos del pan de abejas. Cuatro minerales fueron cuantificados: Ca (920 mg/kg), Zn (93 mg/kg), K (5,850 mg/kg) y Mg (675 mg/kg) en pan de abejas de Estados Unidos (Loper *et al.*, 1980). En el perfil de ácidos grasos, aquellos con mayor presencia fueron palmítico (13.08 ± 0.74 %), oléico (12.06 ± 0.28 %), araquidónico (10.94 ± 0.87 %) y araquídico (10.41 ± 0.27 %), en pan de abejas lituano (Čeksterytė *et al.*, 2008).

1.4.2. Tratamientos artificiales para la transformación de polen

En general, la mayoría de los procesos de transformación de polen se pueden dividir en físicos y biotecnológicos. En cuanto a los tratamientos físicos, el secado es la operación más común, sin embargo se plantean otros procesos que podrían ser útiles para modificar el polen, como la esterilización o las altas presiones hidrostáticas, de las cuales hasta donde se tiene conocimiento no han sido empleados hasta el momento para el tratamiento de este alimento. Por otra parte, en lo que respecta a procesos biotecnológicos, la fermentación y la hidrólisis enzimática han sido estudiados por algunos investigadores, no obstante, los reportes de estos tratamientos aún siguen siendo escasos.

A continuación se realizará una descripción de los antecedentes acerca de tratamientos físicos y posteriormente se hará mención acerca de trabajos previos que involucran los tratamientos biotecnológicos a los que puede ser sometido el polen apícola.

1.4.2.1. Tratamientos físicos

1.4.2.1.1. Secado

Generalidades

El secado es definido como "el decrecimiento del contenido de humedad (CH) para preservar el producto por un mayor tiempo de vida útil" (Müller and Heindl, 2006). El contenido de humedad está directamente relacionado con las reacciones de degradación química y microbiológica. Es un parámetro de influencia significativa en el crecimiento microbiano, la actividad enzimática e inclusive la estabilidad física de los alimentos (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2007).

El secado de cualquier sólido involucra dos procesos fundamentales: la transmisión de calor para evaporar el líquido y la transmisión de masa en forma de vapor o líquido dentro del sólido debido al gradiente de concentración y como vapor desde la superficie. Estas operaciones pueden utilizar transferencia de calor por convección, conducción y/o radiación. (Green and Perry, 2008). En general, la operación de secado involucra la reducción del contenido de humedad del material durante el procesamiento, como también un incremento en la temperatura del material (Chen and Mujumdar, 2008). Para la remoción de agua de una geometría dada, la humedad contenida en el material debe migrar del interior a la superficie. Muchos mecanismos han sido propuestos para describir el transporte interno de agua, que es generalmente el paso limitante, sin embargo no existe una teoría generalizada que explique la transferencia de humedad, debido a la complejidad del proceso y a la naturaleza del producto.

A diferencia de otros materiales (p. ej. polímeros), explicar los fenómenos de difusión en un alimento es extremadamente complejo a causa de las complejas estructuras físicas y la composición química del sistema (Chen and Patel, 2006). Diversos estudios en matrices alimentarias sugieren estudiar las condiciones del secado como temperatura, humedad relativa y velocidad del aire de secado para conseguir no solamente la máxima eficacia y un suficiente control de proceso, sino también conservar las características del producto final como el valor nutritivo, la textura o el color (Müller and Heindl, 2006; Pulido *et al.*, 2012).

Secado de polen

Como en muchos otros productos de origen vegetal con una actividad de agua elevada, el polen suele ser secado antes de ser almacenado con el fin de garantizar un tiempo de vida útil mayor. El secado de polen involucra la búsqueda de un equilibrio entre la conservación y la mínima destrucción de los compuestos nutricionales y bioactivos como consecuencia de su sensibilidad a la temperatura, y al mismo tiempo, la reducción en el contenido de microorganismos a niveles seguros. Estas condiciones hacen que el secado

de polen sea una operación más compleja de lo que se podría pensar. El grano de polen, una vez cosechado por el apicultor, tiene un contenido de humedad que oscila entre 20 y 30% y una actividad de agua entre 0.66 y 0.82 (Campos *et al.*, 2010), y en consecuencia, debe ser sometido inmediatamente a procesos de reducción de humedad hasta que el contenido de agua libre se reduzca a valores entre 5% y 8% para prevenir una contaminación microbiológica y el desencadenamiento de reacciones enzimáticas (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2008).

Además de las consideraciones propias del producto, también es importante tener en cuenta el gasto energético del secado, así como las condiciones propias de temperatura y humedad relativa de la zona geográfica donde se colecta y seca el polen. En un trabajo previo sobre secado de polen del Altiplano Cundiboyacense, Durán establece que el contenido de humedad adecuado del producto, basado en consideraciones cinéticas e isothermas de adsorción es 5% (Durán, 2014). La región del Altiplano Cundiboyacense posee unas condiciones de baja presión atmosférica (aprox. 750 mm Hg al estar localizado entre los 2500 y 3500 m.s.n.m), que inducen condiciones de humedad relativa de equilibrio y actividad de agua más altas, ya que la presión parcial del vapor del agua (P_v) en estas condiciones es mayor. Adicionalmente, la región Cundiboyacense se caracteriza por tener temperaturas promedio relativamente altas (17°C - 23°C) durante el día (7:00 a.m. – 3:00 p.m.), y temperaturas bajas (4 °C - 12°C) durante las horas de la tarde y noche (3:00 p.m. – 7:00 a.m.). La mayor temperatura durante las horas del día implica una humedad de equilibrio más baja, lo cual facilita el proceso de secado. Sin embargo, durante la caída del sol y el amanecer se presenta un descenso de temperatura importante, que genera una humedad relativa más alta; estos factores desplazan el contenido de humedad de equilibrio hacia valores más altos en los productos sometidos a secado, lo que implica una menor tasa de deshidratación o incluso una rehidratación de la matriz.

Estas consideraciones son importantes en la recolección y almacenamiento del polen, a temperatura ambiente o bajo refrigeración, ya que implica una ganancia de humedad del polen después de los procesos de cosecha o secado, que deriva en un desperdicio innecesario de energía (Durán, 2014). Usualmente, esta es la única etapa que realizan los productores, por lo que posteriormente el polen es comercializado para consumo humano.

Efecto del secado sobre la calidad microbiológica del polen

En términos generales, la inactivación de microorganismos es un proceso causado por los efectos complementarios de la alta temperatura y la reducción de humedad. Aunque la contribución de cada aspecto no está muy bien comprendida, se sabe que la reducción del contenido de agua afecta en mayor extensión que la elevación de la temperatura (Chen and Mujumdar, 2008). Microorganismos como hongos, levaduras y bacterias tienen un crecimiento acelerado a valores de humedad relativa superiores a 70%

(Hendrickx and Knorr, 2001) y cuando un alimento es preservado a baja actividad de agua, no necesariamente todos los microorganismos son destruidos. Algunas bacterias pueden haber perdido actividad, sin embargo esta es recuperable con una re-hidratación.

En el caso de polen, Callejas realizó un secado a 40°C encontrando que después del proceso todas las muestras cumplieron con el límite para aerobios mesófilos pero exceden el recuento de coliformes totales, mohos y levaduras (Callejas, 2006). De Melo *et al.* realizaron un secado de polen brasilero a 42°C durante 52 h, encontrando que el análisis de calidad microbiológica fue insatisfactorio, los conteos de mohos y levaduras, mesófilos aerobios y coliformes totales fueron elevados (De-Melo *et al.*, 2016).

Estos resultados son esperables considerando que fueron procesos llevados a cabo a temperaturas cercanas a las de incubación de muchos microorganismos, por un tiempo prolongado, en un alimento con una elevada actividad de agua.

En ese sentido, diferentes estudios han indicado que el polen recolectado de las trampas en la colmena suele estar altamente contaminado, particularmente por bacterias del género *Enterococcus* (Belhadj *et al.*, 2010, 2014), las cuales son muy resistentes a condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico, entre otros) siendo muy difíciles de eliminar del alimento (Ryan and Ryan, 2004). Esta contaminación puede ser atribuida principalmente a diversos factores y fuentes: abejas, vegetación, insectos, animales, humanos, entre otros (Hani *et al.*, 2012), o incluso a un mal manejo en las etapas de recolección, almacenamiento y empaque (Kosalec *et al.*, 2009). Por ello, González *et al.* concluyen que la etapa crítica de contaminación ocurre en la trampa de la colmena: "a mayor tiempo de recolección, más contaminado será el polen" (González *et al.*, 2005), factor que puede ser minimizado si se aplican Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Aunque, Hani *et al.* sugieren que el elemento más contaminante del polen son las abejas (Hani *et al.*, 2012), lo cual hace más difícil obtener un polen con cargas microbiológicas reducidas.

De hecho, investigaciones realizadas por Hani *et al.* establecen que si el polen fresco tiene una carga elevada de hongos o bacterias, el secado ya no es una opción viable para garantizar la inocuidad del alimento, debido a la producción de micotoxinas o endotoxinas resistentes a la temperatura (Hani *et al.*, 2012). Además, las esporas de algunas bacterias son extremadamente resistentes a la temperatura, gracias al alto grado de compartimentalización (Chen and Mujumdar, 2008), y por ende, el secado no afecta su viabilidad.

Efecto del secado sobre la calidad nutricional y bioactiva

Asociado con cada tratamiento realizado mediante el incremento de la temperatura siempre hay algún grado de degradación de sustancias sensibles al calor como vitaminas, así como la generación de compuestos algunas veces indeseables (Teixeira,

2007). Algunos de los componentes responsables de la actividad antioxidante son degradados debido al aumento excesivo de la temperatura en su procesamiento. Sin embargo, se ha observado en algunos casos que la actividad antioxidante de algunos alimentos se ve favorecida o no se ve impactada negativamente por este tipo de procesos debido a la degradación de estructuras en los que los componentes antioxidantes están atrapados o a la formación de subproductos con capacidad antioxidante (Choi *et al.*, 2006; Pulido *et al.*, 2012).

Por otra parte, entre las reacciones de degradación de mayor impacto en la calidad del alimento se encuentran la oxidación lipídica y las reacciones de pardeamiento (Hui, 2006). La oxidación lipídica es responsable de la rancidez, el desarrollo de sabores desagradables, y la pérdida de grasa soluble, vitaminas y pigmentos en muchos alimentos, especialmente en los alimentos deshidratados. Debido al importante contenido de grasas en el polen este fenómeno es importante en la consideración de las condiciones de secado. Los factores que afectan a la velocidad de oxidación pueden incluir: contenido de humedad, tipo de sustrato (ácido graso), la extensión de la reacción, contenido de oxígeno, temperatura, presencia de metales, la presencia de antioxidantes naturales, la actividad enzimática, la luz ultravioleta, el contenido de proteínas, el contenido de aminoácidos libres, y otras reacciones químicas. De ellos, la humedad desempeña un papel importante ya que para valores de actividad de agua alrededor de 0.3, la resistencia de los lípidos a la oxidación es mayor (Hui, 2006).

Las reacciones de pardeamiento producen pérdida o degradación de color y son uno de los obstáculos más comunes en la deshidratación y almacenamiento a largo plazo. Estas pueden ser de dos tipos: enzimáticas y no enzimáticas. En el primer caso, la enzima polifenil-oxidasa cataliza la oxidación de mono- y orto-difenoles para formar quinonas, posteriormente estas se oxidan y condensan formando pigmentos marrones (melaninas). En el caso del pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard), la acción de la alta temperatura sobre los compuestos presentes en el alimento produce una glucosilación de las proteínas; los compuestos generados en esta reacción se polimerizan después para generar compuestos coloreados denominados melanoidinas. El contenido elevado de azúcares en el polen determina el desarrollo principalmente de reacciones de pardeamiento no enzimático cuando la temperatura se eleva demasiado durante el proceso de deshidratación. Para evitar esto debe controlarse la temperatura y el flujo de aire en la cámara durante el secado (Hui, 2006).

Particularmente, durante el proceso de deshidratación de polen se presentan varios cambios en las propiedades del producto que implican un impacto sobre la calidad del mismo. Estos cambios pueden ser deseados, mejorando la calidad del alimento o estabilizando sus características, o indeseados impactando de manera negativa sus propiedades físicas, químicas o sensoriales. Muchos de los compuestos con características funcionales presentes en el polen, como vitaminas y antioxidantes, son termolábiles, por lo que el aumento de la temperatura durante la deshidratación implica una degradación de las mismas. Dada la presencia apreciable de estos componentes

este es un parámetro de calidad importante a seguir durante el secado (Arruda *et al.*, 2013).

(Barajas *et al.*, 2012) estudiaron los procesos de secado de polen del Altiplano Cundiboyacense entre 35°C y 45°C. El tratamiento no afectó el contenido de proteína, fibra y cenizas, mientras que los lípidos se incrementaron ligeramente. Por otra parte, el contenido de vitamina C disminuyó así como el contenido de carotenoides, particularmente a 45°C. De otro lado, De Melo *et al.* realizaron un secado de polen brasileiro a 42°C durante 52 h, encontrando una reducción significativa en el contenido de proteína, polifenoles y vitamina E (De-Melo *et al.*, 2016). En el caso de los polifenoles, los autores atribuyen su descenso a la liberación de polifenol oxidasa, la cual tiene un intervalo de temperatura óptima entre 25 y 45°C (Valero, 1993).

En lo que respecta al aroma y sabor del polen apícola, el proceso de deshidratación puede afectarlos de manera significativa, dado que los compuestos orgánicos volátiles responsables de estos tienen temperaturas de ebullición más bajas que el agua, y como resultado, generalmente se pierden o degradan durante el mismo (Heldman and Lund, 2007).

1.4.2.1.2. Esterilización

La esterilización por autoclave es otro tipo de tratamiento térmico usado en la industria alimentaria, en el cual la temperatura de tratamiento se encuentra por encima de 100°C. En el proceso de tratamiento en autoclave con vapor, los microorganismos son eliminados por el calor, y esto es acelerado por el alto nivel de humedad. El vapor por sí mismo no es suficiente para la esterilización, razón por la cual se requiere emplear una presión superior a la atmosférica para incrementar la temperatura del vapor para lograr la destrucción térmica de toda vida microbiana (Wang *et al.*, 2009a).

Un producto estéril es aquél en el cual no hay organismos viables, entendida viabilidad como la capacidad de un microorganismo de reproducirse cuando es expuesto a condiciones de crecimiento óptimas. Las condiciones de operación de una esterilización garantizan la eliminación de células bacterianas, mohos y levaduras, no obstante, el principal objetivo de emplear la esterilización es la eliminación de esporas bacterianas (Al-Baali and Farid, 2006). Adicionalmente, otro criterio usual para emplear la esterilización es la presencia potencial de *Clostridium botulinum* (Holdsworth and Simpson, 2007). Este microorganismo patógeno no ha sido reportado en polen, sin embargo su presencia sí ha sido documentada en miel (Nevas *et al.*, 2005, 2006; Kacaniova *et al.*, 2009).

Los parámetros más importantes para determinar las condiciones más adecuadas de esterilización, que garanticen la eliminación de la carga microbiana son el tiempo de reducción decimal (D), que es el tiempo que se requiere para garantizar la eliminación de

un microorganismo a una temperatura dada y el valor z , que representa el cambio de temperatura que ocasiona que D se incremente por un factor de 10 (Jay, 2000). Algunos ejemplos son mostrados en la Tabla 1-12 para microorganismos formadores de esporas.

Estos valores deben tomarse sólo como indicador, ya que varían considerablemente según las características del alimento. Por ejemplo, para un alimento con un alto contenido de agua libre, el valor de D_{95} para *B. cereus* con $a_w = 1$ es de 2.39 minutos, mientras que con $a_w = 0.86$ el tiempo se incrementa a 13.84 minutos (Jay, 2000).

Tabla 1-12. Tiempo de reducción decimal para esporas de algunas especies en medio líquido.

Espora microorganismo	Valor $D_{121^\circ\text{C}}$ (min)	Referencia
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	4.0 - 5.0	(Feeherry <i>et al.</i> , 1987)
<i>Clostridium botulinum</i>	0.1 - 0.2	(Blackburn and McClure, 2000)
<i>Clostridium perfringens</i>	0.2 - 0.6	
<i>Bacillus cereus</i>	0.1 - 0.8	
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	3.0 - 4.0	(Jay, 2000)
<i>Clostridium nigrificans</i>	2.0 - 3.0	
<i>Clostridium sporogenes</i>	0.1 - 1.5	
<i>Bacillus coagulans</i>	0.01 - 0.07	

Antecedentes del empleo de esterilización en matrices vegetales

Múltiples antecedentes se encuentran en la bibliografía acerca del uso de la esterilización en matrices vegetales, esta es empleada como etapa de eliminación de microorganismos previo a la realización de otros procesos de transformación, como por ejemplo fermentación o hidrólisis. Dentro de la revisión bibliográfica realizada enfocada en la búsqueda de antecedentes de esterilización en polen, Fuenmayor hace mención de la efectividad de procesos realizados a 121°C durante 15 minutos para garantizar la eliminación de microorganismos para el empleo del polen tratado en procesos de fermentación (Fuenmayor, 2009), sin embargo, no se encontraron reportes sobre el efecto de la esterilización en la estructura del polen o su efecto en las características nutricionales o bioactivas.

El análisis de lo ocurrido en otro tipo de matrices vegetales cuando son sometidas a esterilización podría servir como un punto de comparación de lo que podría suceder en el polen. De forma similar al polen, los cereales suelen estar naturalmente contaminados con mohos, levaduras y bacterias (Russo *et al.*, 2010). Por ello, Dordevic & Durovic-Pejcev resaltan la importancia de esterilizar el trigo molido antes de realizar procesos fermentativos con *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de evitar la contaminación del sustrato con cepas alterantes del proceso (Đorđević and Đurović-Pejčev, 2015). Wang *et al.* realizaron procesos de esterilización en salvado de trigo para poder obtener un

producto libre de microorganismos para un tratamiento de hidrólisis enzimática con xilanasas (Wang *et al.*, 2009a).

Bennett y Yang hacen mención que en diferentes productos de origen vegetal, como los cereales y las leguminosas, los tratamientos térmicos tipo esterilización no sólo son efectivos para eliminar la carga microbiológica presente, sino además para mejorar el rendimiento en posteriores bioprocesos, principalmente fermentación. Los autores demostraron que la combinación de calor, presión y humedad de la esterilización, promueve la fractura de la capa externa de los granos creando fisuras, a través de las cuales los microorganismos pueden acceder más fácilmente a los nutrientes que se encuentran dentro (Bennett and Yang, 2012).

Andersen y Kiel realizaron ensayos de tratamientos en autoclave de diversos cereales para adecuarlos como sustrato en posteriores procesos de fermentación con *Lactobacillus salivarius*, encontrando que el contenido de aminoácidos no se vio afectado, además mencionan como hecho fundamental en el éxito de la fermentación la realización del tratamiento térmico (Anderssen and Kiel, 1997).

Por otra parte, diversos estudios reportan el efecto de la esterilización en las características fisicoquímicas de diferentes productos vegetales. Zaroni *et al.* trataron térmicamente puré de tomate, encontrando una disminución en el contenido de ácido ascórbico y la actividad antioxidante, sin embargo, el contenido de licopeno se mantuvo inalterado (Zaroni *et al.*, 2003).

Arrieta-Báez *et al.* investigaron el efecto que tiene la esterilización sobre las moléculas de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, cuando fueron tratados en frutas y cereales. Los resultados mostraron que los ácidos ferúlico y p-cumárico sufrieron una decarboxilación, dando productos diméricos (4-vinilguayacol y 4-vinildifenol), mientras que el ácido cinámico fue recuperado sin alteraciones. Estos resultados permitieron encontrar a los investigadores que la actividad antioxidante global de estos alimentos se incrementó por efecto del tratamiento térmico (Arrieta-Baez *et al.*, 2012).

Ya que la esterilización es un proceso intensivo, se han reportado pérdidas de color, sabor y aroma en productos vegetales (Sun, 2006). Hoy en día, la investigación se centra en técnicas alternativas como el procesamiento no térmico, como por ejemplo, el tratamiento a altas presiones hidrostáticas.

1.4.2.1.3. Altas Presiones Hidrostáticas

Generalidades

La industria alimentaria está buscando nuevas maneras de producir alimentos saludables, estables e inocuos. El proceso a altas presiones hidrostáticas (HPP, por sus siglas en inglés) es uno de los tratamientos no térmicos más promisorios en la actualidad,

referido en la literatura como pasterización fría (Matser *et al.*, 2004; Knoerzer *et al.*, 2007; Rastogi *et al.*, 2007; Mujica-Paz *et al.*, 2011).

Los principios que gobiernan el HPP están basados en la suposición que los alimentos siguen el principio isostático sin considerar la forma o tamaño. El principio isostático menciona que la presión es instantánea y uniformemente transmitida a toda la muestra a lo largo del tiempo (Sevenich *et al.*, 2015). A diferencia del procesamiento térmico, el HPP es independiente del tamaño de la muestra (Rastogi *et al.*, 2007).

Las altas presiones estimulan algunos fenómenos (p. ej. transición de fases, reactividad química, cambios en la configuración molecular, reacción química) que son acompañados con la reducción en volumen (Norton and Sun, 2008). A nivel molecular, un incremento de presión modifica el equilibrio hacia la formación de enlaces. Los puentes de hidrógeno son estabilizados por la alta presión, ya que su formación involucra un descenso en el volumen, por lo que la presión no afecta enlaces covalentes, y por ende, son relativamente poco afectadas las vitaminas, componentes del *flavor* y demás moléculas de bajo peso molecular (Linton and Patterson, 2000).

A pesar de ser considerado un proceso "isotérmico", las operaciones de compresión y descompresión ocasionan un cambio de temperatura debido al calentamiento o enfriamiento adiabático. La efectividad de las altas presiones sobre la calidad e inocuidad de los alimentos no está influenciada únicamente por factores extrínsecos como el tiempo de tratamiento, la tasa de compresión/descompresión, los niveles de presión/temperatura, sino también por factores intrínsecos como la composición del alimento y los estados fisiológicos de los microorganismos (Knorr, 2001; Smelt *et al.*, 2002).

Los efectos de la presión y temperatura sobre los constituyentes del alimento están gobernados por el volumen de activación y la energía de activación, los cuales llevan a la posibilidad de retener o destruir algunos atributos de calidad deseados como vitaminas (Van den Broeck *et al.*, 1998), pigmentos (Van Loey *et al.*, 1998) y la estructura del alimento, y al mismo tiempo optimizar la inocuidad del producto o minimizar la acción enzimática (Hernández-Carrión *et al.*, 2011). La aplicación de altas presiones incrementa la temperatura del componente líquido del alimento aproximadamente 3°C por cada 100 MPa. Si el alimento contiene una cantidad significativa de lípidos, como la mantequilla o la crema, la elevación de temperatura podría llegar a 9°C/100 MPa (Rasanayagam *et al.*, 2003).

A pesar de la ventaja que tiene esta tecnología, en lo referente a la conservación de compuestos que son fácilmente degradables por la temperatura, algunos puntos débiles del tratamiento a altas presiones son:

1. No existe un microorganismo indicador que demuestre una suficiente inactivación de esporas patógenas. Numerosas investigaciones mencionan la resistencia de las esporas del género *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. sporogenes* y *C. perfringens*) y *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *Geobacillus stearothermophilus*) a la presión ejercida (Margosch *et al.*,

2006; Ahn and Balasubramaniam, 2007; Wimalaratne and Farid, 2008; Juliano *et al.*, 2009; Mathys *et al.*, 2009; Reineke *et al.*, 2011, 2013; Georget *et al.*, 2015)

2. Ciertos compuestos (azúcares, lípidos, sales, entre otros) y la actividad de agua pueden causar un efecto bio-protector, lo que lleva a una inactivación retardada o incompleta de esporas y microorganismos (Van Opstal *et al.*, 2003; Molina-Höppner *et al.*, 2004; Sevenich *et al.*, 2013).

El costo de un equipo de alta presión estándar a escala planta piloto puede estar alrededor los € 50,000 (Hiperbaric, España, Comunicación Personal) y los costos calculados por cada lote de producción oscilan entre € 0.16 y € 0.50 dependiendo del tamaño de la vasija (300 L y 50 L, respectivamente) (Mujica-Paz *et al.*, 2011)

Efecto de HPP sobre la calidad microbiológica

Algunos reportes bibliográficos de inactivación de microorganismos en alimentos de origen vegetal por HPP son presentados en la Tabla 1-13. Allí se presenta la efectividad de la reducción de la carga microbiológica, la cual es medida en ciclos logarítmicos; los más destacados son el caso de los jugos de manzana y naranja, así como para repollo chino, que luego del tratamiento tuvieron una reducción superior a siete ciclos logarítmicos en el contenido de *Staphylococcus aureus* (Bayındırlı *et al.*, 2006) y bacterias acidolácticas (Li *et al.*, 2010), respectivamente.

Diversas investigaciones presentan el efecto de emplear alta presión sobre la inactivación de microorganismos. Es imposible hacer una generalización de las condiciones a emplear para un alimento, ya que dependerá de las condiciones fisicoquímicas del mismo, así como de su carga inicial. Sin embargo, es posible establecer que el proceso trae un número de cambios en la morfología del microorganismo, en su membrana celular y en las reacciones bioquímicas que ocurren dentro de la célula. En particular, la desnaturalización de enzimas se considera una de las razones principales de muerte celular (Simpson and Gilmour, 1997a), en particular la ATPasa (Wouters *et al.*, 1998). Otros aspectos que favorecen la eliminación de los microorganismos por HPP son un bajo pH y a_w (Yaldagard *et al.*, 2008). Las HPP tienen un efecto más destructivo en células con un alto grado de organización y complejidad estructural, por lo que es comprensible que las procariotas sean más resistentes que las eucariotas (Yuste *et al.*, 2001).

Tabla 1-13. Ejemplos de tratamientos de HPP en matrices vegetales

Producto	Microorganismo objetivo	Condiciones	R (log UFC/g)	Referencia
Leche de soya	Enterobacterias	200 - 300 MPa	>3	(Cruz <i>et al.</i> , 2007)
Jugo de manzana y naranja	<i>Staphylococcus aureus</i>	450 MPa, 40°C, 5 min	>7	(Bayındırlı <i>et al.</i> , 2006)
Jugo de zanahoria y tomate	Toda la carga microbiológica	250 MPa, 35°C, 15 min	>5	(Dede <i>et al.</i> , 2007)
Jugo de naranja	<i>Escherichia coli</i>	248.25 MPa, 59.9°C	>4	(Muñoz <i>et al.</i> , 2007)
Sopa de vegetales		269.8 MPa, 59.9°C	>4	
Jugo de zanahoria	Microorganismos Gram (-)	500-600 MPa, 20°C, 1 min	>4	(Patterson <i>et al.</i> , 2012)
Semillas de alfalfa	<i>Escherichia coli</i>	500-600 MPa, 20°C, 2 min	>5	(Neetoo <i>et al.</i> , 2008)
Repollo chino	Bacterias aeróbicas, bacterias acidolácticas y levaduras	600 MPa, 20°C, 15 min	>5, >7 y >4	(Li <i>et al.</i> , 2010)
Cebolla	<i>Salmonella</i> y <i>E. coli</i> O157:H7	400-500 MPa, 20-40°C, 2 min	>4	(Neetoo <i>et al.</i> , 2011)

R: Reducción de la carga microbiológica

Efecto de HPP sobre la calidad nutricional y bioactiva

Diferentes estudios mencionan los efectos de las altas presiones sobre las propiedades de los alimentos: 1. Rompimiento de la membrana celular (Michel and Autio, 2001; Van Buggenhout *et al.*, 2005); 2. Inactivación de enzimas (Ludikhuyze *et al.*, 2000; Verlent *et al.*, 2004, 2005); 3. Preservación de compuestos termolábiles (Indrawati *et al.*, 2004a; b, 2005; Nguyen *et al.*, 2006; Oey *et al.*, 2006) y 4. Modificación de bio-polímeros incluyendo desnaturalización de proteínas y formación de geles (Balny *et al.*, 2002; Indrawati *et al.*, 2002; Kunugi and Tanaka, 2002; Ludikhuyze *et al.*, 2003; der Plancken *et al.*, 2005). Incluso todos estos cambios pueden ocurrir al tiempo (Oey *et al.*, 2008).

Las altas presiones pueden desnaturalizar proteínas dependiendo de su tipo, condiciones de proceso y presión aplicada. Durante el proceso de desnaturalización, las proteínas pueden disolverse o precipitar. Estos cambios son reversibles a presiones entre 100-300 MPa e irreversibles a más de 300 MPa. La desnaturalización se debe a la destrucción de enlaces hidrofóbicos y el desdoblamiento de moléculas (Rastogi *et al.*, 2007). Diferentes tipos de interacciones contribuyen a la formación de las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de las proteínas. Se pueden observar cambios significativos en la estructura terciaria de las proteínas a presiones superiores a 200 MPa, mientras que

los cambios en la estructura secundaria se observan por encima de 700 MPa, conduciendo a una desnaturalización irreversible (Rastogi *et al.*, 2007).

Los efectos del HPP sobre los compuestos nutricionales y bioactivos y sobre la microestructura de los alimentos ha sido ampliamente estudiados (Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2012, 2013; Hernández-Carrión *et al.*, 2014), encontrando que este tratamiento causa cambios estructurales que favorecen la extractabilidad de compuestos bioactivos. Algunos reportes del empleo de HPP en productos de origen vegetal son presentados en la Tabla 1-14.

Tabla 1-14. Algunos reportes acerca de tratamientos de altas presiones en matrices vegetales

Producto	Condiciones	Resultado	Referencia
Durazno y mango	200 MPa - 20°C	Modificación en la textura de los frutos	(Otero <i>et al.</i> , 2000)
Berenjena	-	Reducción en los daños por frío en almacenamiento	(Otero <i>et al.</i> , 1998)
Brócoli	180-210 MPa, -16 °C - -20°C	Disminución en el contenido de proteína. Inactivación fallida de enzimas.	(Prestamo <i>et al.</i> , 2004)
Zanahoria	100 - 700 MPa	Modificación en la textura. Liberación de pectina.	(Fuchigami <i>et al.</i> , 1997)
Jugo de Naranja	600 MPa, 4 min	Menor degradación de ácido ascórbico. Mantenimiento actividad antioxidante	(Polydera <i>et al.</i> , 2004, 2005)
Puré de frambuesa	200-800 MPa, 15 min	Conservación contenido de antocianinas	(Winai <i>et al.</i> , 2005)
Lichi	200 - 600 MPa, 10-20 min	Estabilización del color del fruto. Inactivación de enzimas	(Phunchaisri and Apichartsrangkoon, 2005)
Kiwi, durazno, pera y melón	400 MPa, 30 min	Pardeamiento de durazno y pera. Color amarillo en kiwi. Mejora en textura. Inactivación fallida de enzimas.	(Prestamo and Arroyo, 2000)
Repollo	400 - 500 MPa	Incremento en el contenido de fibra soluble	(Wennberg and Nyman, 2004)
Zanahoria, tomate y brócoli	500 - 800 MPa	No hubo alteración en el contenido de clorofila en el brócoli, ni en licopeno o β -caroteno en el tomate. La actividad antioxidante en la zanahoria no se vio afectada.	(Butz <i>et al.</i> , 2002a)
Puré de tomate	100 - 600 MPa, 12 min	Se reporta pérdida de licopeno.	(Qiu <i>et al.</i> , 2006)

Por ejemplo, en el caso de zumo de naranja, un incremento de la presión de hasta 800 MPa significó un descenso en la actividad antioxidante, debido a la degradación de ácido ascórbico (Fernandez-Garcia *et al.*, 2001), mientras que Sanchez-Moreno *et al.* reportan que el contenido de flavononas se incrementó un 40% luego de un tratamiento a 400

MPa a 40°C durante 1 min para este mismo producto (Sanchez-Moreno *et al.*, 2005). En contraste, para jugo de zanahoria el mismo tratamiento incrementó la capacidad antioxidante (Indrawati *et al.*, 2004b). Para puré de tomate, la actividad antioxidante medida por la técnica DPPH no mostró cambios significativos luego de un tratamiento a 400 MPa durante 15 minutos (Sanchez-Moreno *et al.*, 2006). En semillas de leguminosas, el tratamiento a alta presión a temperatura ambiente afecta ligeramente la actividad antioxidante. Un descenso entre 10-15% en el valor de la capacidad antioxidante medida mediante la técnica TEAC fue encontrado cuando se trató frijol (*Vigna sinensis* var. *carrilla*) con alta presión entre 300-500 MPa por 15 minutos (Doblado *et al.*, 2007).

El tratamiento de altas presiones afecta únicamente los enlaces covalentes de los componentes presentes de los alimentos (Balny *et al.*, 1997). Muchos estudios muestran que no hay disminuciones significativas de la estabilidad de las vitaminas bajo altas presiones (Fernandez-Garcia *et al.*, 2001; Butz *et al.*, 2004), excepto a temperaturas y presiones extremas (Van den Broeck *et al.*, 1998).

1.4.2.2. Tratamientos biotecnológicos

En esta sección se comentarán brevemente los tratamientos biotecnológicos de fermentación e hidrólisis enzimática. Inicialmente se tratarán algunos aspectos relacionados a la fermentación, mencionando algunas generalidades así como varios reportes de este bioproceso en matrices de origen vegetal y, en especial, polen apícola. Además se describirá su efecto sobre las características nutricionales y bioactivas de los productos obtenidos.

En segundo lugar, se presentan las generalidades acerca del proceso de hidrólisis enzimática, como también algunos reportes sobre de la realización de esta transformación en productos de origen vegetal y su efecto en sus características nutricionales y bioactivas. Adicionalmente, se muestran los reportes bibliográficos existentes de este bioproceso en polen apícola.

1.4.2.2.1. Fermentación

Generalidades

Bourdichon *et al.* describen la fermentación como "un proceso de obtención de energía a partir de compuestos orgánicos sin la participación de un agente oxidante exógeno" (Bourdichon *et al.*, 2012). La fermentación tiene diferentes papeles en el procesamiento de alimentos, en particular en la búsqueda de cambios bioquímicos deseables (Caplice and Fitzgerald, 1999).

Como fue mencionado previamente, en la colmena se induce un proceso natural de fermentación en el que tanto levaduras como bacterias acidolácticas juegan un papel preponderante en la transformación de polen en pan de abejas. Se sabe que las levaduras presentes en el polen fermentan glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa y melobiosa (Gilliam, 1979b), ocurriendo así una fermentación etanólica. Entre tanto, las bacterias acidolácticas emplean sustratos similares a las levaduras para promover una fermentación láctica.

Entre muchas de las tecnologías relacionadas a los bioprocesos, la fermentación láctica es descrita como una de las estrategias más adecuadas para mantener o mejorar la inocuidad y las propiedades nutricionales, sensoriales y de vida útil de productos de origen vegetal (Buckenhüskes, 1997; Bartkiene *et al.*, 2011). En particular, la bibliografía hace extensa referencia al empleo de bacterias acidolácticas (BAL) para la fermentación de productos alimenticios.

Las BAL comprenden un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen en común la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002). Las BAL son Gram (+), no esporulados, catalasa negativos, tolerantes al ácido y anaerobios facultativos. Con excepción de algunas especies, las BAL son no patógenas. Pueden dividirse en homofermentativos, produciendo principalmente ácido láctico y heterofermentativos, quienes además de ácido láctico, generan una variedad de productos como ácido acético, etanol, dióxido de carbono y ácido fórmico (Kleerebezem and Hugenholtz, 2003). Son encontrados en una amplia variedad de nutrientes, incluyendo leche y productos lácteos, vegetales y plantas, cereales, así como carne y productos cárnicos. La explotación comercial de las BAL como cultivos probióticos es económicamente significativo, razón por la cual es posible encontrar diversos reportes bibliográficos acerca de su genética, fisiología y usos (Wood and Warner, 2003; Gasson and de Vos, 2004).

Los azúcares son la fuente primaria de carbono y energía de las BAL. Las BAL homofermentativas (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y algunos *Lactobacillus*) fermentan los azúcares por la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas a piruvato, el cual es convertido a ácido láctico por el lactato dehidrogenasa. Bajo ciertas condiciones (limitación de carbono, exceso de carbono de polisacáridos) el metabolismo homoláctico puede ser modificado a un metabolismo mixto, caracterizado por la producción de formiato, acetato, etanol y CO₂. En productos lácteos las BAL se adaptan fácilmente gracias a su capacidad de metabolizar la galactosa, a través de la ruta de Leloir. Así mismo, se sabe que *L. plantarum* bajo condiciones aeróbicas y bajas fuentes de glucosa, maximiza la producción de acetato (Mozzi *et al.*, 2010). Entre tanto, las BAL heterofermentativas (*Leuconostoc*, *Oenococcus* y ciertos *Lactobacillus*) fermentan azúcares generalmente por la ruta fosfocetolasa o Warburg-Dickens (WD), en la cual la fermentación de pentosas lleva a la formación de piruvato y acetil -P y su consecuente conversión a lactato y acetato, respectivamente. Las hexosas pueden ser convertidas a lactato, CO₂ y etanol (Mozzi *et al.*, 2010).

Por otra parte, diversos reportes también hacen mención de fermentaciones realizadas con levaduras en matrices vegetales, que más allá de ser empleadas por su reconocida capacidad de producción de etanol, son aprovechadas por su producción de enzimas debido a su metabolismo, entre las cuales se nombran principalmente amilasas y celulasas (Oliveira *et al.*, 2015). Además el empleo de levaduras posee otro tipo de ventajas tales como el uso de temperaturas moderadas para su crecimiento, una alta diversidad metabólica y rápida reproducción y una fácil adaptación a diferentes tipos de cultivos (Kato *et al.*, 2007).

Las levaduras son organismos eucariotas, clasificados como hongos microscópicos unicelulares, que son importantes por su capacidad para realizar la descomposición mediante fermentación de diversos compuestos orgánicos, principalmente carbohidratos, dentro de las cuales la especie más conocida y empleada en la industria alimentaria es *Saccharomyces cerevisiae* (Kurtzman *et al.*, 2011). Algunas especies de levaduras son patogénicas, en particular de los géneros *Cryptococcus* y *Candida*, que actúan como organismos oportunistas en personas inmunodeprimidas (O'Meara and Alspaugh, 2012), sin embargo, la mayoría de especies de levaduras son inocuas o beneficiosas para los seres humanos. Existen levaduras aeróbicas, anaeróbicas y anaeróbicas facultativas, lo cual conlleva a que sigan diferentes rutas metabólicas, entre las que se encuentran el ciclo del ácido cítrico, la fosforilación oxidativa y la fermentación alcohólica. Las levaduras son usadas ampliamente en la industria alimentaria para la elaboración de pan, cerveza, vino, entre otros. Son organismos casi ubicuos, encontrándose comúnmente en el ambiente (Martini, 1992).

Fermentación de matrices alimentarias empleando Bacterias Acidolácticas (BAL) y levaduras

Buckenhuskés *et al.* consideraba hace algunas décadas que los alimentos fermentados de origen vegetal eran los "alimentos del futuro" (Buckenhüskes, 1993), debido a que estos productos pueden ser rotulados como "naturales" o biológicos". Los alimentos de origen vegetal fermentados con BAL y levaduras hoy en día son percibidos como productos idóneos y con potencial benéfico para la dieta humana (Jazwiak *et al.*, 2013).

Muchos tipos de productos vegetales fermentados existen en el mundo: chucrut, pepinos ácidos, y olivas en el mundo occidental; kim-chi Coreano, pak-sian-don Tailandés. hum-choy Chino o el tempoyak Malayo, son algunos ejemplos en el mundo oriental. Entre los cereales y tubérculos fermentados se encuentran el pozol Mexicano, kenkey Ghanés, gari Nigeriano, entre otros (Peres *et al.*, 2012). En la Tabla 1-15 se presentan algunos casos de fermentación de matrices vegetales empleando BAL o levaduras.

Es bien conocido que la presencia de BAL y levaduras en el organismo humano es importante para el mantenimiento del ecosistema microbiano intestinal (Maragkoudakis *et al.*, 2010). Se sabe que varios tipos de bacterias acidolácticas inhiben diferentes microorganismos patógenos Gram (+) (*Listeria* spp., *Bacillus* spp. *Micrococcus* spp.) y

Gram (-) (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Helicobacter pylori* y *Pseudomonas aeruginosa*), debido a la producción de compuestos antibacterianos como ácidos orgánicos y bacteriocinas (Belhadj *et al.*, 2014). Así mismo, diferentes estudios han mostrado que las levaduras del género *Saccharomyces* poseen una acción preventiva y terapéutica ante la aparición de desórdenes gastrointestinales (Czerucka *et al.*, 2007).

Tabla 1-15. Algunos reportes sobre fermentación en matrices vegetales

Matriz vegetal	Fermentación	Actividad enzimática	Efecto en actividad antioxidante	Referencia
Harinas de cereales	Fermentación con lactobacilos	Hidrólisis de proteína	Liberación de péptidos	(Coda <i>et al.</i> , 2012)
Soya	Fermentación con BAL	Hidrólisis de isoflavonas	Incremento en isoflavonas	(Hubert <i>et al.</i> , 2008)
Oliva	Fermentación con <i>L. plantarum</i>	Hidrólisis de glucósidos	Pérdida de compuestos fenólicos	(Othman <i>et al.</i> , 2009)
Lentejas	Fermentación con <i>L. plantarum</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólisis de péptidos	Liberación de aminoácidos	(Torino <i>et al.</i> , 2013)
Soya negra	Fermentación con <i>Bacillus subtilis</i>	-	Incremento en fenoles totales, flavonoides y vitamina K	(Juan and Chou, 2010)
Maní	Fermentación con <i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólisis de proteína	Liberación de péptidos	(Zhang <i>et al.</i> , 2014)
Mora	Fermentación con <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hidrólisis de fenoles	Incremento en antocianinas	(Pérez-Gregorio <i>et al.</i> , 2011)
Arándano	Fermentación con <i>Saccharomyces bayanus</i>	Hidrólisis por α -amilasa y α -glucosidasa	Incremento en antocianinas y fenoles	(Johnson <i>et al.</i> , 2011)

El empleo de BAL y levaduras contribuye benéficamente tanto a la tecnología de procesamiento como a la calidad del producto final en términos de flavor, inocuidad e imagen global del producto (Mäki, 2004). En la actualidad, las BAL están siendo utilizadas con mayor fuerza en la prevención y control de diferentes enfermedades, debido a la producción de ácidos orgánicos, metabolitos inhibidores, derivados del glicerol o del metabolismo del oxígeno, enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas, etc. (Salazar, 2014). Además se ha observado que favorecen el aumento de la flora intestinal (Vamanu *et al.*, 2006). En lo referente a las levaduras, estudios recientes han encontrado que su presencia en el tracto gastrointestinal promueve la liberación de metabolitos que inhiben la secreción de toxinas por parte de las bacterias, como también presentan una alta resistencia a los antibióticos antimicrobianos, particularmente por la estructura de su pared celular (Czerucka *et al.*, 2007).

Efecto de la fermentación sobre la calidad nutricional y bioactiva

Los alimentos de origen vegetal contienen diversos compuestos bioactivos, incluyendo compuestos fenólicos, carotenoides, antocianinas y tocoferoles (Naczk and Shahidi, 2006). Se ha reportado que la fermentación favorece la aparición de diversos cambios bioquímicos afectando las propiedades de los productos, en particular la bioactividad y la digestibilidad (Zhang *et al.*, 2012). Por ejemplo, la fermentación ha sido aplicada para incrementar el contenido de compuestos fenólicos en leguminosas y así elevando la actividad antioxidante (Lee *et al.*, 2008; Torino *et al.*, 2013). En este aspecto, Torino *et al.* reportan que la bioconversión de las formas conjugadas de los compuestos fenólicos en sus formas libres durante la fermentación mejora sus propiedades ligadas a la salud (Torino *et al.*, 2013).

Ya que la fermentación mejora la actividad antioxidante debido a la liberación de flavonoides, es una técnica útil para incrementar la disponibilidad de antioxidantes naturales. La fermentación induce el rompimiento estructural de las paredes celulares y también libera o induce la síntesis de diferentes compuestos bioactivos (Katina *et al.*, 2007; Dordevic *et al.*, 2010). La actividad antioxidante global de los alimentos fermentados de origen vegetal no puede ser predicha sobre la base de su contenido de fenoles totales, hay que considerar el sinergismo entre los compuestos polifenólicos y los demás compuestos presentes en la matriz que también pueden contribuir en la actividad antioxidante global (Naczk and Shahidi, 2006).

En lo que respecta a los reportes en los que se menciona el empleo de *L. plantarum* para la fermentación de alimentos vegetales, se concluye que la concentración de compuestos fenólicos mejora en el producto fermentado, al hidrolizar compuestos fenólicos complejos y hacerlos biologicamente activos (Dueñas *et al.*, 2005). Los ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico y m-cumárico también son metabolizados por este microorganismo (Rodríguez *et al.*, 2009). En el caso de la soya, la fermentación induce la conversión de isoflavonas en agliconas, incrementando la actividad antioxidante (Tsangalis *et al.*, 2002).

Otros estudios muestran que *Lactobacillus bulgaricus* inhibe la peroxidación de lípidos por su alta capacidad anti-radicalaria y poder reductor (Kim *et al.*, 2005). Entre tanto, *L. fermentum* y *Streptococcus thermophilus* en diversos ensayos han mostrado una alta actividad antioxidante (Chang and Hassan, 1997; Kullisar *et al.*, 2002). Otra explicación a que los productos fermentados con BAL tengan mayor actividad antioxidante, puede ser porque las bacterias propiamente poseen actividad antioxidante, debido a mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que minimizan la generación de especies reactivas de oxígeno a niveles que no son dañinos para las células (Lee *et al.*, 2006b).

Cuando las BAL son expuestas a especies reactivas de oxígeno, desarrollan mecanismos para protegerse del daño oxidativo, incluyendo la formación de antioxidantes enzimáticos que pueden directamente degradar los radicales libres (Kim *et al.*, 2005). Además, las bacterias probióticas promueven la producción de ciertos

antioxidantes, como los exopolisacáridos, así como exhiben actividad para quelar metales (Spyropoulos *et al.*, 2011).

Adicionalmente, la fermentación con levaduras ha mostrado también efectos positivos en el incremento del contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. La actividad metabólica de las levaduras induce cambios físicos en textura y color, o químicos particularmente en el contenido de metabolitos secundarios. Pérez-Gregorio *et al.* encontraron un incremento en el contenido de compuestos fenólicos luego de un proceso de fermentación alcohólica de mora con *S. cerevisiae*, mientras que la actividad antioxidante se mantuvo con valores similares al producto fresco (Pérez-Gregorio *et al.*, 2011). Entre tanto, Su y Chien determinaron que la fermentación de arándano con *S. cerevisiae* promovió un incremento en el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos, con lo cual se obtuvo un producto fermentado con mayor actividad antioxidante (Su and Chien, 2007).

De manera similar a lo comentado para las BAL, aparentemente las levaduras por sí mismas poseen mecanismos protectores ante la presencia de especies reactivas de oxígeno. Algunos estudios hacen mención de la capacidad de la pared celular de las levaduras para inhibir la peroxidación de lípidos y para proteger el ADN de daños oxidativos, debido principalmente a la presencia de (1→3, 1→6)-β-D-glucanos en su estructura, que han demostrado poseer una elevada actividad antioxidante así como una alta capacidad para aumentar la respuesta inmune en seres humanos (Slamenova *et al.*, 2003; Kogan *et al.*, 2005)

Fermentación de polen

Se han realizado intentos para simular lo ocurrido en la colmena, entre los que se destacan las investigaciones realizadas por Del Risco y Fuenmayor, quienes simularon el proceso de fermentación anaerobia de polen llevado a cabo por microorganismos acidolácticos para producir pan de abejas (Fuenmayor, 2009; Del Risco, 2011). Del Risco asegura que en tales circunstancias en presencia de calor y humedad, el polen se desprende de la capa de exina e inicia una fermentación ácido-láctica (Del Risco, 2011).

Fuenmayor (2009) evaluó diferentes bioprocesos orientados al mejoramiento de los indicadores nutricionales del polen apícola como un aporte al desarrollo de un suplemento nutricional proteico. Dentro de sus hallazgos se destacan que es posible inducir una fermentación láctica en fase sólida en una matriz conformada principalmente por polen apícola, utilizando un inóculo del microorganismo *Lactobacillus acidophilus*, pero también comenta que son necesarios estudios más profundos para describir el fenómeno de ruptura de la capa externa de polen, que permitan una mejor comprensión del fenómeno (Fuenmayor, 2009). Del Risco *et al.* mencionan que el polen ensilado con bacterias ácidolácticas autóctonas del pan de abejas (*L. plantarum*, *L. coryniformis* y *L.*

delbrueckii) permite obtener un producto ácido con calidad microbiológica aceptable (Del Risco *et al.*, 2012).

En lo que respecta a la fermentación de polen empleando levaduras, son pocos los reportes existentes que mencionen este proceso. Salazar realizó ensayos de fermentación con *S. cerevisiae* encontrando que en el producto obtenido se mantenían los niveles de vitamina E, carotenoides y fenoles totales en comparación al polen fresco, no obstante, reportó el incremento en la actividad antioxidante (Salazar, 2014). En otro trabajo, Feng *et al.* menciona que es posible lograr una modificación de la estructura de polen con la adición de levaduras, así como un incremento en el perfil de aminoácidos libres (Feng *et al.*, 2011).

En síntesis, se observa que la fermentación en productos de origen vegetal ha mostrado una serie de beneficios en lo referente a la mejora de indicadores nutricionales y bioactivos que lo presentan como una opción atractiva para la transformación de alimentos. No obstante, en lo referente a la fermentación de polen, los trabajos aún son escasos y se hace evidente la necesidad de profundizar aún más en este aspecto, con el fin de conocer con certeza el efecto que tiene la inclusión de microorganismos sobre la modificación estructural del polen así como en las características relacionadas a la composición.

1.4.2.2.2. Hidrólisis enzimática

Generalidades

Las enzimas son catalizadores biológicos conformados por macromoléculas, capaces de catalizar reacciones químicas. Las moléculas al comienzo del proceso son llamadas sustratos y la enzima ayuda en su conversión a diferentes productos. Las enzimas incrementan la velocidad de reacción disminuyendo su energía de activación. Químicamente, como cualquier catalizador, las enzimas no son consumidas en la reacción ni alteran el equilibrio de la misma (Berg *et al.*, 2002). Las enzimas son proteínas compuestas por largas cadenas de aminoácidos que se doblan para producir una estructura tridimensional. La secuencia de aminoácidos define la estructura que a su vez determina la actividad catalítica de la enzima, haciéndola específica para un sustrato en particular. La especificidad es lograda por la generación de enlaces químicos y por características hidrofílicas o hidrofóbicas de los sustratos (Suzuki, 2015). A nivel industrial, las enzimas son ampliamente empleadas, particularmente en procesos que involucran la hidrólisis de sustratos de alto peso molecular.

En particular para este trabajo, las investigaciones realizadas sobre el proceso de obtención de pan de abejas en la colmena sugieren que durante la transformación del polen, la actividad enzimática ejerce un efecto notable sobre la modificación estructural del grano por las enzimas segregadas por las abejas a través de secreciones salivares así como por aquellas secretadas por los microorganismos, entre las cuales se

encuentran amilasas, proteasas, lipasas, entre otras. En este orden de ideas, sería interesante analizar el efecto que tiene la aplicación de enzimas, no solamente sobre la estructura del polen, sino también sobre sus características nutricionales y bioactivas. En otros alimentos de origen vegetal, se han empleado diferentes enzimas para la obtención de alimentos hidrolizados, entre las cuales se pueden mencionar las proteasas, pectinasas, carbohidrasas y lacasas, de las cuales se presentan algunos reportes a continuación.

Las proteasas son hidrolasas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas (Adler-Nissen, 1986). Como las proteínas son un grupo heterogéneo de moléculas, debido a que están conformadas por 20 diferentes aminoácidos, la cantidad de enzimas capaz de hidrolizar proteínas es también muy diverso (Aehle, 2004). Las proteasas han sido empleadas en la elaboración de productos basados en harina de trigo (galletas, pan, pizza, entre otros), para mejorar las propiedades viscoelásticas y de textura de la masa (Oliver *et al.*, 1996). Se ha reportado que los aminoácidos producidos en la hidrólisis favorecen la producción de aroma y sabor, así como actuar como potenciales sustancias antioxidantes (Martinez-Anaya, 1996).

La proteólisis ha sido usada para modificar las propiedades funcionales y fisicoquímicas de la proteína de soya (Surowka *et al.*, 2004a; b; Jung *et al.*, 2005), proteína de girasol (Martinez *et al.*, 2005), aislado proteico de colza (Vioque *et al.*, 2002), concentrado protéico de salvado de avena (Guan *et al.*, 2007) y frijol (*Vicia faba*) (Dudek *et al.*, 1996). Las proteasas pueden ser usadas para preparar péptidos con características que son función de la proteína hidrolizada. Estos péptidos pueden ser muy diferentes de la proteína original y pueden poseer nuevas propiedades nutricionales, funcionales y biológicas (Kong *et al.*, 2007).

De otro lado, las pectinasas son enzimas cuya clasificación depende de su acción hacia la pectina. Por ejemplo, la pectin liasas (EC 4.2.2.10) es una pectin depolimerasa que tiene afinidad por las cadenas altamente metiladas y actúa por eliminación de α -1,4 homogalaturonano con la formación de oligo-uronidos C4-C5 insaturados. La pectin metil esterasa (EC 3.1.1.11) remueve los grupos metóxilo de la pectina. Entre tanto, la poligalacturonasa (PG) (EC 3.2.1.15) existe en dos formas endo-PG y exo-PG. Ambas actúan sobre pectina con un grado de esterificación menor al 60%. La endo-PG actúa aleatoriamente sobre el enlace α -1,4-galacturónico, mientras que la exo-PG hidroliza la parte no reductora de la cadena (Aehle, 2004). Las pectinasas han sido usadas principalmente para degradar el material vegetal de plantas, tratamientos de clarificación de jugos y tratamiento industrial de residuos de frutas (Pinelo *et al.*, 2010).

Entre tanto, las carbohidrasas han sido empleadas para hidrolizar diferentes tipos de polisacáridos. Dentro de las carbohidrasas más empleadas se encuentran celulasa, xylanasa, glucanasa, entre otras (Meng *et al.*, 2005). Las celulasas, son una mezcla de varias enzimas capaces de degradar la celulosa a glucosa, el cual usualmente está

constituida por endo-1,4- β -glucanohidrolasa, exo-1,4-glucanohidrolasa, exo-1,4- β -glucosidasa y β -glucosidasa (Romero, 2003).

Finalmente, la lacasa es un conjunto de enzimas con capacidad de degradar la lignina, compuesta enteramente por compuestos fenólicos, conocidos como monolignoles (Higuchi, 1985; Lewis and Yamamoto, 1990). La lacasa posee la capacidad de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas con la reducción de oxígeno a agua (Sariaslani, 1989). Las lacasas catalizan la detoximetilación de unidades fenólicas terminales. Pueden degradar β -dímeros y β -O-4-dímeros y romper anillos aromáticos (Kawai *et al.*, 1988). A pesar de esto, es poco lo que se conoce sobre las funciones fisiológicas de la lacasa (Liu *et al.*, 1994).

Efecto de la hidrólisis enzimática sobre las características nutricionales y bioactivas

Entre los efectos positivos de la hidrólisis enzimática sobre las características de los alimentos se mencionan una digestibilidad mejorada, modificaciones de las características sensoriales y una mejora en la actividad antioxidante, e incluso, una reducción en los niveles de alergenicidad (Panyam and Kilara, 1996; van Boekel *et al.*, 2010). Varias actividades fisiológicas han sido reportadas en los hidrolizados proteicos, como antimicrobiano y antioxidante (Jian *et al.*, 2011). Zhu *et al.* reportan que la hidrólisis enzimática de germen de trigo empleando Alcalasa® permitió la obtención de un producto con mayor actividad antioxidante (Zhu *et al.*, 2006).

Hrckova *et al.* mostraron que el tratamiento enzimático de harina de soya empleando tres diferentes proteasas (Flavourzyme®, Novozym® y Alcalasa®) mejoró la capacidad gelificante (Hrcková *et al.*, 2002). Yust *et al.* reportaron el uso de alcalasa inmovilizada para mejorar algunas propiedades funcionales de garbanzo, en particular la solubilidad de la proteína (Yust *et al.*, 2010). Oszmianski *et al.* encontraron que la actividad antioxidante de jugos de manzana hidrolizados con pectinasas mostraron un contenido de polifenoles superior al producto sin tratar (Oszmiański *et al.*, 2011). Por otra parte, el empleo de Viscozyme® y Celluclast®, una mezcla de carbohidrasas en muestras de salvado de avena, dieron como resultado un producto con una actividad antioxidante mejorada (Jodayree *et al.*, 2012).

En el caso particular de la obtención de hidrolizados enzimáticos de polen apícola, son escasos los reportes que se encuentran disponibles en bibliografía, no obstante los trabajos describen el empleo de diferentes enzimas tales como papaína, Protamex®, proteasas neutras, bromelaína y aminopeptidasas, celulasa, hemicelulasa o pectinasa (Ren *et al.*, 2009a; b; Gao *et al.*, 2011). En estos trabajos, además de analizar el potencial del tratamiento enzimático para romper la pared del polen, se evaluó el efecto de la hidrólisis sobre el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante. En el caso de Protamex, se reporta un rompimiento del grano de polen, e inclusive, una desintegración de la intina (Dong *et al.*, 2015). Marinova *et al.* desarrollaron un

hidrolizado enzimático con un contenido de fenoles totales y una actividad antioxidante mayor que el polen fresco (Marinova and Tchorbanov, 2010).

En resumen, la revisión bibliográfica muestra cómo el polen apícola a pesar de su potencial como fuente nutricional y bioactivo es comercializado sin mayor procesamiento a pesar de las dificultades de asimilación a nivel gastrointestinal humano, lo que significa un proceso ineficiente a nivel de absorción de nutrientes. Los escasos estudios que se han hecho acerca de la transformación de polen, tanto a nivel natural en la colmena como aquellos realizados por el hombre, sugieren que una modificación estructural del polen puede lograrse, con una consecuente liberación de compuestos. Sin embargo, la limitada información reportada no permite la emisión de resultados confiables ni tampoco la descripción de un proceso de transformación desde el polen fresco hasta obtener un producto modificado con una mejor disponibilidad de nutrientes y sustancias bioactivas.

1.5. Conclusiones

El polen representa uno de los alimentos de origen vegetal más completos en términos de composición fisicoquímica y bioactiva. Contiene un aporte valioso de proteína, carbohidratos y lípidos, así como de fibra dietaria, minerales, vitaminas, compuestos fenólicos y carotenoides, los cuales diferentes reportes bibliográficos destacan como compuestos con características funcionales.

La estructura del polen está compuesta en sus capas más externas por dos componentes conocidos como exina e intina, los cuales proveen de una alta resistencia a ataques físicos y químicos al grano. No obstante, esa misma resistencia hace que exista una baja disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos una vez el polen es consumido. El sistema gastrointestinal humano solamente logra asimilar algo más del 50% de los nutrientes disponibles; este aspecto refleja la necesidad de desarrollar procesos de transformación que incrementen la extracción y disponibilidad de los compuestos de interés en el polen, entre los cuales se destacan los bioprocesos como fermentación o hidrólisis enzimática para la obtención de forma controlada de productos análogos al pan de abejas.

Existe una falencia crítica desde el punto de vista de la calidad e inocuidad del polen, consistente en la falta de normativa técnica que regule los aspectos de composición, calidad microbiológica y estándares de almacenamiento del polen, por lo que es común observar la comercialización de este producto sin el desarrollo de métodos de sanitización diseñados para su consumo por parte de los seres humanos. Este aspecto impide la realización de cualquier tipo de bioproceso sin antes desarrollar una técnica de eliminación de cualquier organismo alterador o, incluso, patógeno.

La bibliografía existente hace numerables consideraciones acerca del secado de polen con respecto a los efectos que tiene este proceso sobre la calidad fisicoquímica del

grano, pero deja de lado la inocuidad, a pesar de hacer mención de la inefectividad de las temperaturas empleadas en los procesos de secado en la reducción de la carga microbiana. Este aspecto es particularmente marcado en pólenes de origen tropical, donde las cargas microbiológicas del ambiente circundante a los apiarios son frecuentemente altos, aún si se aplican Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). En cualquier caso, debe encontrarse un balance entre una reducción de compuestos nutricionales y bioactivos, y a su vez, una eliminación exitosa en la carga microbiológica cuando se emplean tratamientos térmicos en polen.

Otras tecnologías han sido propuestas para la eliminación de cargas microbiológicas en alimentos, una de ellas, las altas presiones hidrostáticas ha mostrado ser una herramienta eficaz para reducir los contenidos de microorganismos a niveles seguros, con un daño reducido en las características fisicoquímicas del alimento y, en adición, diferentes reportes hacen mención de cómo esta técnica mejora la extractabilidad de compuestos de interés.

La revisión bibliográfica ha mostrado que los bioprocesos son técnicas útiles para la modificación de las características estructurales, nutricionales y bioactivas de los alimentos de origen vegetal. Diferentes investigaciones se han realizado en fermentación e hidrólisis enzimática de frutas y vegetales, con resultados que demuestran una mejoría en la disponibilidad de nutrientes, una liberación de compuestos bioactivos y una mayor actividad antioxidante que en el alimento crudo. En el caso del polen, son pocas las investigaciones que se han realizado al respecto, pero los reportes bibliográficos hacen mención de una mejora en la disponibilidad de nutrientes y bioactivos. Aún así, los autores coinciden en que se requiere de mayor experimentación que permita emitir conclusiones confiables y lograr así un método de transformación reproducible.

2. Tratamientos físicos en polen

2.1. Introducción

Los alimentos de origen vegetal pierden calidad desde el momento que son cosechados como consecuencia de la manipulación, almacenamiento y transporte, en las que suelen ocurrir reacciones físicas, químicas o microbiológicas. Los microorganismos y las enzimas son los principales agentes responsables del deterioro de los alimentos, y se convierten en los objetivos preferidos de las técnicas de conservación. Diferentes reportes de alimentos de origen vegetal, en particular de cereales o leguminosas, evidencian la necesidad de llevar a cabo procesos físicos como una herramienta útil para la modificación de la estructura del alimento, la eliminación de factores antinutricionales o el incremento de la disponibilidad de sustancias nutricionales y bioactivas (Dewanto *et al.*, 2002; Lebovka *et al.*, 2004; Udensi *et al.*, 2007).

De las funciones asociadas a los tratamientos físicos mencionadas anteriormente, la principal es reducir las cargas microbiológicas presentes en los alimentos, que usualmente contienen poblaciones de microorganismos alteradores con lo cual no se puede garantizar la inocuidad del producto. Dentro de estos procesos físicos, los tratamientos térmicos son los más empleados, en particular el secado. No obstante, en la actualidad se han introducido técnicas relativamente nuevas tales como los pulsos de luz, pulsos eléctricos o las altas presiones hidrostáticas, como alternativas para tratar alimentos sin el empleo de calor.

Particularmente en el polen, las condiciones de cosecha, manejo y procesamiento actuales promueven que este producto contenga una carga microbiológica inicial tan abundante como diversa, haciéndolo altamente susceptible a sufrir alteraciones que modifican sus características sensoriales, nutricionales y de inocuidad. Los apicultores, en su mayoría, sólo realizan procesos de secado que son poco eficientes en términos de reducir la calidad microbiológica a niveles aceptables. La falta de legislación que establezca parámetros de calidad del polen, el arraigo de creencias populares por parte de los apicultores y una investigación a nivel nacional e internacional incompleta, que se ha centrado más en estudiar el efecto de los tratamientos térmicos sobre la calidad nutricional dejando de lado la evaluación de la efectividad del proceso en la reducción de la carga microbiana, ha propiciado en definitiva la comercialización de polen que en algunos casos ha tenido un manejo inadecuado e incluso puede ser no apto para el consumo humano.

Es común encontrar en la legislación y bibliografía internacional (Argentina, 1990; Brasil, 2001; Campos *et al.*, 2008) límites de temperatura para el secado de polen no superiores a 42°C. Sin embargo, este aspecto desconoce que esta es una temperatura que no favorece la remoción de humedad de manera eficiente, sin contar con que no garantiza la eliminación de microorganismos, y por el contrario, podría incluso fomentar un crecimiento en la población. Es evidente que el empleo de temperaturas más altas tendría como consecuencia la aparición de diversos fenómenos indeseables: una reducción en compuestos termolábiles, reacciones colaterales o la formación de subproductos, no obstante, la simple comparación con otros alimentos demuestra que la inocuidad siempre prima sobre la calidad nutricional. En consecuencia, un equilibrio debe ser encontrado entre un tratamiento que minimice los fenómenos indeseables y a su vez garantice una eliminación de la carga microbiológica hasta niveles seguros.

En respuesta a la necesidad de encontrar este equilibrio, la investigación se dirige a combinar las técnicas de preservación tradicionales con nuevas tecnologías no térmicas que se adapten mejor a los tipos de alimentos que los consumidores demandan; alimentos de alta calidad, nutritivos, naturales, seguros pero poco procesados, libres de conservantes, de larga vida útil y fáciles de preparar, es decir, alimentos lo más parecidos posible a los frescos, que se perciben como más saludables.

Dentro de los métodos de procesamiento no térmicos, las altas presiones hidrostáticas han surgido como tecnología desde los años 90, teniendo una fuerte presencia hoy en día en Estados Unidos, Europa y Asia. En lo que respecta a Latinoamérica países como México y Brasil son los pioneros en el empleo de esta técnica (Hyperbaric, España, Comunicación Personal). Diferentes investigaciones han mostrado que las altas presiones producen cambios en la permeabilidad iónica de las membranas y facilitan la salida de agua y otros metabolitos hacia el exterior de las células vegetales (Shouqin *et al.*, 2005). Por otro lado, también se ha comprobado que este proceso induce cambios en la estructura de los tejidos vegetales, lo que produce una alteración de las propiedades físicoquímicas, así como una mayor retención de agua y extractabilidad (Butz *et al.*, 2003). Además, algunos autores han afirmado que la aplicación de altas presiones a alimentos ricos en micronutrientes y fitoquímicos, tales como minerales, carotenoides y otros compuestos antioxidantes, podría resultar útil para el desarrollo de productos más saludables por un posible aumento en su biodisponibilidad (McInerney *et al.*, 2007a; Sánchez-Moreno *et al.*, 2009; Briones-Labarca *et al.*, 2011).

A pesar de las bondades de los procesos no térmicos, los costos asociados siguen siendo una desventaja en comparación a los tratamientos térmicos convencionales que son de más fácil acceso para los apicultores, particularmente en el caso de esta investigación. No obstante, en este trabajo se estudiaron los efectos sobre la calidad microbiológica, la modificación a nivel estructural del grano y la eventual extracción o liberación de componentes nutricionales y bioactivos, cuando el polen es sometido a tratamientos térmicos y no térmicos, con el fin de ofrecer soluciones a la problemática relacionada con este producto, que tenga aplicabilidad en un corto y mediano plazo.

En lo referente a los tratamientos térmicos, se evaluó un proceso de secado empleando aire caliente a tres diferentes temperaturas (40°C, 50°C y 60°C). Además, se llevaron a cabo pruebas de esterilización a 121°C a tres tiempos diferentes (5, 10 y 15 minutos). Finalmente, se realizaron tratamientos combinados secado-esterilización y esterilización-secado, con el fin de evaluar el efecto de un tratamiento conjunto en las características anteriormente mencionadas. Además de la evaluación de la carga microbiológica a través de conteo de microorganismos alteradores y esterilidad comercial, se analizaron los parámetros fisicoquímicos de humedad, pH, acidez, digestibilidad, contenido de ácidos grasos, aminoácidos, fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides totales y actividad antioxidante. De igual forma, para evaluar la eventual modificación de la estructura del polen se empleó Microscopía Electrónica de Barrido, Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido.

Por otra parte, se estudió el efecto que ejercen las altas presiones hidrostáticas como un tratamiento no térmico alternativo para procesar polen apícola sobre sus características nutricionales, bioactivas, microbiológicas y estructurales. Para ello, se realizaron ensayos empleando una matriz semi-sólida de polen apícola mezclada con agua peptona y un néctar de piña con inclusión de polen. Además de la evaluación de la efectividad del tratamiento para la eliminación de la carga microbiológica, mediante la inoculación de organismos alteradores, se analizaron los parámetros fisicoquímicos de fenoles totales, carotenoides totales y actividad antioxidante. Así mismo, para evaluar la eventual modificación de la estructura del polen se empleó Microscopía Confocal Láser de Barrido. El trabajo experimental de altas presiones hidrostáticas fue realizado a manera de pasantía bajo la coordinación del Dr. Antonio Martínez López, del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos - IATA y la Dra. Amparo Quiles Chuliá, del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia (España).

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Polen

Para todos los ensayos se empleó polen corbicular fresco proveniente del Municipio de Viracachá, Boyacá, Colombia. El polen fue recolectado en bolsas de polietileno y almacenado en refrigeración (4°C) en ausencia de luz hasta su caracterización y uso en los experimentos.

2.2.2. Caracterización palinológica, estructural, microbiológica y fisicoquímica del polen

2.2.2.1. Análisis palinológico del polen

Aunque no era uno de los objetivos en este trabajo, el polen recolectado fue caracterizado palinológicamente gracias al apoyo del Laboratorio en Investigación en Abejas - LABUN, del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia. La técnica empleada para identificar los morfotipos de polen presentes en la muestra recolectada es conocida como acetólisis. Para ello, 2 mL de ácido acético glacial fueron puestos en un tubo de ensayo con polen y se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos, descartando el sobrenadante. Luego se adicionaron 4 mL de una mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico (9:1) a 80°C; una vez enfriada se centrifugó nuevamente, y posteriormente se agregaron 2 mL de etanol para centrifugar por última vez, descartando siempre el sobrenadante. Por último, se pasó el polen tratado a un vial, se agregaron 2 gotas de glicerina y se introdujo en un horno por 12 h a 40°C. Para la identificación de los morfotipos, se puso la muestra de polen en una lámina y se observaron, identificaron y contaron en un microscopio los pólenes presentes.

2.2.2.2. Análisis relacionados con la evaluación de la estructura del polen

La caracterización estructural del polen fue realizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido, Termogravimetría y Calorimetría Diferencial de Barrido, las cuales son descritas en detalle en el numeral 2.2.5.1.

2.2.2.3. Análisis microbiológicos

El polen fresco fue caracterizado microbiológicamente mediante el conteo de mesófilos aerobios y mohos y levaduras, así como se determinó la presencia de *Salmonella*. Las técnicas de análisis son descritas en el numeral 2.2.5.2.

2.2.2.4. Análisis fisicoquímicos

Las características fisicoquímicas medidas sobre el polen fueron pH, acidez, humedad, cenizas, lípidos, proteína, azúcares, fibra dietaria, minerales, fenoles totales, carotenoides totales, flavonoides totales y actividad antioxidante (FRAP y TEAC). La descripción de cada metodología se presenta en el numeral 2.2.5.3.

2.2.3. Descripción de los tratamientos térmicos y diseño experimental

En total, se realizaron cuatro diferentes ensayos de tratamientos térmicos, los cuales son descritos en detalle en los numerales 2.2.3.1 a 2.2.3.4. Inicialmente, se realizaron ensayos de secado en un horno eléctrico empleando aire forzado caliente a diferentes temperaturas. Otro ensayo involucró el uso de un autoclave a 121°C y diferentes tiempos de tratamiento con el fin de establecer aquellas que condiciones que garantizaran la esterilización del producto. Por otra parte, se realizaron ensayos combinados tanto de secado y posterior esterilización, así como de esterilización y posterior secado. Estos tratamientos tienen como finalidad disminuir la carga microbiológica presente en el grano, así como una eventual modificación en la estructura mediante la degradación de la exina por efecto de la temperatura, evaluando a su vez si esto afecta las características nutricionales y bioactivas.

2.2.3.1. Ensayos de secado

El secado de los granos de polen fue llevado a cabo en un horno eléctrico convencional (Sin marca comercial) de aire forzado caliente, disponible en la Planta Piloto de Vegetales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Nacional de Colombia. Se realizó un diseño completamente al azar, empleando para ello tres diferentes temperaturas: 40°C, 50°C y 60°C. Cada tratamiento fue realizado por triplicado, por lo que en total se llevaron a cabo 9 experimentos. Dadas las condiciones del equipo disponible, la cantidad de polen empleado en cada lote osciló entre 750 g y 1000 g, así como se mantuvo fija la velocidad del aire de secado en 4 m/s. Por otra parte, con el fin de elaborar las curvas de secado, se tomaron muestras de polen cada hora de tratamiento, a las cuales se les midieron humedad y actividad de agua, con base en los métodos establecidos en el numeral 2.2.5.3. El tiempo de secado fue calculado a partir de los datos experimentales obtenidos a través de las curvas de secado.

2.2.3.2. Ensayos de esterilización

De manera alterna, otras muestras de polen fueron tratadas en una autoclave automática eléctrica (Nasco, USA) a 121 °C. Se realizó un diseño completamente al azar, empleando para ello tres diferentes tiempos de exposición: 5 min, 10 min y 15 min. Cada tratamiento fue realizado por triplicado, por lo que en total se llevaron a cabo 9 experimentos. Aproximadamente 250 g de polen fresco fueron puestos en un frasco de vidrio y tratados en el autoclave a las condiciones anteriormente mencionadas. La temperatura fue fijada en 121°C, ya que estudios previos con polen del Altiplano Cundiboyacense mostraron que valores inferiores no lograron una eliminación satisfactoria de toda la carga microbiológica (Salazar, 2014).

2.2.3.3. Ensayos combinados secado-esterilización

Un ensayo combinado secado - esterilización fue realizado con el fin de establecer si el orden de la secuencia de tratamientos presentaba efectos sobre la estructura de la exina, además de comprobar si el contenido natural de humedad en el polen por sí solo facilitaba la apertura de la capa externa cuando es expuesto a alta presión y temperatura. Para estos ensayos se emplearon las mismas temperaturas de secado y los tiempos de esterilización ya mencionados, empleándose un diseño factorial 3 x 3. Cada tratamiento fue realizado por triplicado, por lo que en total se llevaron a cabo 27 experimentos. Inicialmente, las muestras de polen fueron sometidas a un secado a las temperaturas descritas anteriormente, y una vez finalizado el proceso, el polen fue colocado en frascos de vidrio y puesto en el autoclave en los tiempos utilizados en el diseño experimental.

2.2.3.4. Ensayos combinados esterilización-secado

Adicionalmente a lo comentado en el numeral 2.2.3.3., se realizaron ensayos combinados esterilización - secado, con base en los efectos que el orden de los tratamientos pudiese tener sobre la estructura, composición y calidad microbiológica del polen descritos previamente. El diseño experimental utilizado fue el mismo que para el tratamiento combinado anterior, con un total de 27 experimentos. Inicialmente las muestras de polen fueron sometidas a esterilización en los diferentes tiempos comentados, para una vez finalizado este proceso pasar el producto a las bandejas del secador para ser tratadas a cada uno de los niveles de temperaturas utilizadas en el rango experimental.

2.2.3.5. Análisis estructural, microbiológico y fisicoquímico realizado sobre los pólenes tratados térmicamente

Cada uno de los pólenes tratados en este trabajo fue sometido a tres grupos de análisis diferentes, que son descritos con mayor detalle en los numerales 2.2.5.1 a 2.2.5.3. El primero de ellos corresponde al análisis de la estructura del polen, con este fin se emplearon Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) para tener una evidencia visual, en el primer caso, del efecto que podía tener el tratamiento térmico sobre la estructura del grano de polen. Mediante TGA se analizó la variación en la pérdida de peso del polen por efecto de la temperatura, mientras que en el caso de DSC se pretendía analizar un eventual cambio en la estructura del grano mediante el análisis de la variación del flujo de calor en función de la temperatura, cuando las muestras de polen fresco y sin tratar fueran comparadas entre sí.

Un segundo conjunto correspondió a la evaluación de la calidad microbiológica, para garantizar que este proceso en realidad disminuyera la carga de organismos a valores seguros; las pruebas realizadas fueron detección de *Salmonella*, conteo de mesófilos aerobios y de mohos y levaduras para los tratamientos de secado y esterilización-secado. Para los tratamientos de esterilización y secado-esterilización se llevó a cabo una prueba de esterilidad comercial. Por otra parte, el tercer grupo corresponde a los análisis fisicoquímicos, que incluyeron mediciones de características nutricionales y bioactivas como humedad, pH, acidez, digestibilidad, fenoles totales, carotenoides totales, flavonoides totales, así como la valoración de la actividad antioxidante (TEAC y FRAP).

2.2.4. Pasteurización fría y diseño experimental

Se realizaron ensayos de procesamiento de polen por altas presiones hidrostáticas como tratamiento no térmico. Los objetivos principales de tratar el polen por altas presiones fueron evaluar el efecto del procesamiento sobre la microestructura del tejido vegetal, la extractabilidad de sus componentes bioactivos y su efectividad en la eliminación de la carga microbiológica. Adicionalmente, se desea valorar si este tratamiento no térmico mantiene los niveles de β -caroteno presentes en el polen, ya que como se observó previamente, su contenido se reduce bajo la acción de secado o esterilización.

Se realizaron dos ensayos independientes para tratar el polen por altas presiones; el primero fue el tratamiento de un néctar de piña con inclusión de polen, y un segundo experimento consistió en el procesamiento de un producto semi-sólido de polen apícola mezclado con agua peptona. La razón por la cual se emplearon tanto agua peptona como néctar, fue debido a que ensayos preliminares mostraron que el polen sometido a altas presiones por sí solo no presentó modificaciones en sus características fisicoquímicas y bioactivas ni redujo la carga microbiológica presente, lo que pudo deberse en parte a que a pesar que el contenido de humedad libre del polen es cercano al 30%, éste es un valor relativamente bajo para un alimento sometido a altas presiones, lo cual limitó la eficiencia del proceso. Otro aspecto pudo tener origen en un efecto protector del polen, debido a su contenido de proteína, lípidos y carbohidratos que impedirían la completa eliminación de la carga microbiológica. En diferentes reportes se ha mencionado la habilidad de los microorganismos, especialmente bacterias, de sobrevivir a tratamientos a altas presiones cuando se encuentran en medios nutricionalmente ricos, tales como proteínas o carbohidratos (Hoover *et al.*, 1989; Simpson and Gilmour, 1997b); incluso se ha reportado que minerales como calcio o magnesio también ejercen un efecto protector (Black *et al.*, 2007).

El mecanismo que explica las razones por las que un tratamiento por altas presiones hidrostáticas no es efectivo cuando se tiene un producto rico en nutrientes o con un contenido de humedad bajo no es conocido, sin embargo se considera que involucra la estabilización de proteínas (Moussa *et al.*, 2006).

2.2.4.1. Tratamiento de altas presiones en un néctar de piña con inclusión de polen

Para el néctar de piña con inclusión de polen, un diseño compuesto central centrado en las caras fue usado con tres niveles de cada variable independiente, presión (200 a 400 MPa), tiempo (5 a 15 min) y concentración de polen (0 a 10% (p/v)), llevando a 16 combinaciones (ver Tabla 2-1). Como en el diseño anterior, los niveles de las variables independientes fueron seleccionados considerando la muestra y la condición de operación del equipo. El diseño experimental fue realizado dos veces, resultando en dos bloques de experimentos.

Tabla 2-1. Matriz de diseño experimental para la bebida con inclusión de polen.

Ensayo	Presión (MPa) (X_1)	Tiempo (min) (X_2)	Concentración polen (%(p/v)) (X_3)
1	400	10	5
2	200	15	0
3	300	10	0
4	300	15	5
5	400	15	0
6	400	5	0
7	300	5	5
8	200	15	10
9 ^a	300	10	5
10	400	5	10
11	400	15	10
12 ^a	300	10	5
13	200	5	0
14	200	5	10
15	300	10	10
16	200	10	5

^a Punto central

El modelo cuadrático para cada respuesta es el descrito en la Ecuación 2- 1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Ecuación 2- 1

2.2.4.2. Tratamiento de altas presiones en un producto semi-sólido de polen apícola

Para el ensayo del producto semi-sólido de polen apícola, un diseño central compuesto centrado en las caras fue empleado con tres niveles de cada variable independiente: presión (200 a 400 MPa) y tiempo (5 a 15 min), llevando a 10 combinaciones (ver Tabla 2-2). Las variables independientes fueron escogidas considerando la muestra y la

condición de operación del equipo de altas presiones. Las combinaciones incluyeron un nivel intermedio (punto central) de las tres variables replicadas dos veces, lo que fue usado para revisar la reproducibilidad y estabilidad de los resultados. El diseño experimental fue realizado dos veces, resultando en dos bloques de experimentos.

Tabla 2-2. Matriz de diseño experimental para el polen hidratado.

Ensayo	Presión (MPa) (X_1)	Tiempo (min) (X_2)
1	400	10
2	200	15
3	300	15
4	400	15
5	400	5
6	300	5
7 ^a	300	10
8 ^a	300	10
9	200	5
10	200	10

^a Punto central

El modelo cuadrático de cada respuesta es el descrito en la Ecuación 2- 2:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2$$

Ecuación 2- 2

donde Y representa la respuesta predicha; X_i son las variables independientes; β_0 es una constante que fija la respuesta en el punto central del experimento, y β_{ii} los coeficientes para los términos de los efectos lineales y cuadráticos.

2.2.4.3. Microorganismos

Dos microorganismos fueron seleccionados para valorar los efectos de la alta presión sobre su concentración y crecimiento en polen: *Salmonella typhimurium* (CECT 443) y *Zygosaccharomices rouxii* (CECT 1229). Estos fueron obtenidos a partir de cultivos puros liofilizados provistos por la colección española de cultivos tipo. *S. typhimurium* representa un patógeno alterador de los alimentos ampliamente reconocido y *Z. rouxii* es una levadura degradante principalmente de alimentos y bebidas dulces y resistente a muchos de los métodos de preservación de alimentos comunes (Leandro *et al.*, 2011).

Los viales stock que contenían *S. typhimurium* y *Z. rouxii* fueron generados siguiendo los métodos descritos por (Saucedo-Reyes *et al.*, 2009). Las concentraciones promedio de células fueron aproximadamente 5.0×10^6 ufc/mL para *S. typhimurium* y 5.1×10^6 ufc/mL para *Z. rouxii*. Los valores fueron establecidos por conteo de células viables en placa usando agar de soya tríptico (TSA; Scharlau Chemie S. A., España) y agar papa dextrosa

acidificado con ácido tartárico (1 mL/L) (PDA; Scharlau Chemie S. A., España), respectivamente.

2.2.4.4. Preparación de la muestra

En el caso de la bebida con inclusión de polen, diferentes concentraciones del producto (2.5 y 5 g) fueron adicionados al néctar de piña (50 mL) para obtener concentraciones finales de polen de 5% y 10% p/v, respectivamente. La mayor concentración de polen (10% p/v) fue seleccionada tomando en consideración aquella cantidad que satisfaga la ingesta diaria media recomendada de β -caroteno para una persona promedio que es de 8.1 mg, según reportes bibliográficos (Broekmans *et al.*, 2000; Souverein *et al.*, 2015). La caracterización fisicoquímica del polen mostró un contenido total de carotenoides del polen (568.05 ± 4.10 mg β -caroteno/ kg (base húmeda)). Una muestra control fue formulada con 50 mL de néctar de piña. Para el producto semi-sólido, se mezclaron polen y agua peptona (1.5 g/mL) en una bolsa de polietileno que luego fue termosellada (MULTIVAC Thermosealer, Switzerland).

En ambos casos, las muestras inoculadas y el control fueron puestas en bolsas de polietileno y selladas térmicamente (MULTIVAC Thermosealer, Suiza) antes de ser sometidas al tratamiento por altas presiones.

2.2.4.5. Tratamientos por altas presiones hidrostáticas

Los ensayos fueron realizados en una unidad escala piloto (volumen recipiente: 2.35 L) (ver Figura 2-1), con una presión máxima de operación de 600 MPa (High-Pressure Food Processor, EPSI NV, Bélgica). Las muestras fueron presurizadas a 200, 300 y 400 MPa a temperatura ambiente (18-22°C), durante 5, 10 y 15 min. El nivel de presión, tiempo de presurización y temperatura fueron controlados automáticamente. La tasa de compresión fue de 300 MPa/min y el tiempo de descompresión fue menor a un minuto. El tiempo de tratamiento descrito en este estudio no incluye los tiempos de subida y bajada de presión. Todos los tratamientos fueron aplicados por triplicado. Después de completar el tratamiento, las muestras fueron removidas de la cámara e inmediatamente inmersas en un baño de agua-hielo y almacenadas en refrigeración (3 ± 1 °C) hasta su uso. Todo el procedimiento fue realizado en la planta piloto del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) - Valencia (España).



Figura 2-1. Equipo piloto de altas presiones hidrostáticas.

2.2.4.6. Análisis estructural, microbiológico y fisicoquímico realizado sobre los pólenes tratados por altas presiones hidrostáticas.

El análisis de la estructura del polen tratado por altas presiones hidrostáticas fue realizado empleando la técnica de microscopía láser confocal de barrido (CLSM). Para tal fin, las observaciones se hicieron mediante el empleo de un microscopio láser confocal Nikon C1 acoplado a un microscopio óptico Nikon Eclipse E800 V-PS100E (Nikon, Tokio, Japón) en modo de fotón simple equipado con un láser Ar-Kr. La longitud de onda de excitación fue de 488 nm y la emisión autofluorescente de la muestra se observó a través de un filtro de paso de banda de 515/530 nm. Este procedimiento fue realizado en el Departamento de Tecnología de Alimentos, de la Universidad Politécnica de Valencia (España).

Por otra parte, en lo referente al análisis microbiológico se evaluó la inactivación microbiológica de los organismo inoculados *Salmonella* y *Z. rouxii*. La densidad celular de las muestras tratadas, con y sin polen, fue determinada en términos de \log_{10} (ufc/mL), antes y después de los tratamientos de altas presiones, por conteo en placa, usando agar TSA (Scharlau Chemie S. A., España) con un periodo de incubación de 48 h a 37°C en el caso de *Salmonella*, y PDA con ácido tartárico (1 mL/L) (Scharlau Chemie S. A.,

España) durante 5 días a 25°C en el caso de *Z. rouxii*. La inactivación asociada con cada uno de los tratamientos fue establecida de acuerdo a la diferencia existente entre los conteos obtenidos pre y post-tratamiento. Para cada muestra, dos alícuotas fueron diluidas y sembradas separadamente. Las diluciones fueron hechas empleando agua peptona (Scharlau Chemie S. A., España). Para cada alícuota, dos placas fueron sembradas. Así, cada conteo fue obtenido de cuatro placas. Estas determinaciones fueron realizadas en el laboratorio de microbiología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) - Valencia (España).

Finalmente, en lo referente a los análisis de caracterización fisicoquímica, se realizó la medición de carotenoides totales, fenoles totales y actividad antioxidante (FRAP) de los pólenes tratados, con base en los procedimientos descritos en el numeral 2.2.5.3. Estos análisis fueron realizados en el Departamento de Tecnología de Alimentos, de la Universidad Politécnica de Valencia (España).

2.2.5. Descripción de los métodos estructurales, microbiológicos y fisicoquímicos

2.2.5.1. Análisis estructural

Análisis termogravimétrico

Esta medición fue llevada a cabo en un analizador termogravimétrico 2050 (TA Instruments, USA), con un *Software Thermal Solutions*, disponible en los Laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia. Todos los análisis fueron realizados con aproximadamente 10 mg de muestra. Las mediciones fueron hechas bajo atmósfera de nitrógeno (100 cm³/min) y una rampa de calentamiento de 10°C/min.

Calorimetría Diferencial de Barrido

El procedimiento fue llevado a cabo como lo reportan Buitink *et al.* (2006). Aproximadamente 10 mg de muestra son colocados en un contenedor de muestra para este tipo de ensayos, el cual fue sellado y puesto en el equipo, bajo un ambiente hermético y adiabático. Los termogramas fueron registrados entre 25 y 200°C en un sistema modulado a una tasa de 10°C/min empleando nitrógeno como purga. Se empleó un DSC 2910 Modulado (TA Instruments, USA), con un *Software Thermal Solutions*, disponible en los Laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia.

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Éste método fue realizado con base en la metodología reportada por Human y Nicolson (2006). Una pequeña cantidad de polen (menos de 10 mg) fue montada en un soporte para SEM y metalizada mediante un recubrimiento con una capa de oro. Los especímenes fueron examinados con un Microscopio Electrónico de Barrido FEI Quanta 200 (Hillsboro, USA), los cuales fueron bombardeados con un haz de electrones a un voltaje de aceleración entre 25 kV y 35 kV en la cámara a vacío donde se colocaban las muestras. Diferentes imágenes fueron tomadas a magnitudes de 500X, 1000X, 2000X y 5000X. Este fue servicio prestado por los Laboratorios Interfacultades de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

2.2.5.2. Análisis microbiológicos

La caracterización de la calidad microbiológica del polen fue realizada de acuerdo a los procedimientos establecidos por la Asociación Americana para la Salud Pública (Doores *et al.*, 2013). Se hizo una dilución de muestra, pesando 11 g de polen y suspendiéndolos en 99 mL de agua-peptona estéril al 0.1%. Posteriormente, se hicieron diluciones sucesivas tomando 1 mL de la solución preparada y disolviéndolas en 9 mL de agua-peptona tantas veces como fuera necesario.

Microorganismos aeróbicos totales

Se tomó 1 mL de las primeras tres diluciones y se colocaron en cajas de Petri estériles agregando medio de crecimiento SPC (*Standard Plate Count*) (Oxoid, Reino Unido) hasta solidificación. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 48 h. El conteo fue realizado y reportado como UFC (Unidades Formadoras de Colonias) / g polen.

Mohos y levaduras

1 mL de la solución agua peptona que contiene la dilución de la muestra preparada inicialmente fue colocado en cajas de Petri estériles y luego se adicionaron 20 mL de agar OGY (Oxytetracyclin Glucose Yeast) (Oxoid, Reino Unido). Las cajas fueron incubadas a 25 °C por siete días. El conteo fue reportado como UFC / g polen.

Salmonella

Inicialmente se realizó un pre-enriquecimiento pesando 25 g de polen y mezclándolo con 225 mL de caldo lactosado (Composición por litro: extracto de carne 3 g, peptona 5 g y lactosa 5 g, (Scharlau, España)), en un erlenmeyer. Esta mezcla fue incubada por 24 h a

37°C. Posteriormente, a este cultivo selectivo enriquecido se agregó 1 mL de un caldo de selenita y tetracionato (Oxoid, Reino Unido) y se puso de nuevo en incubación a 43°C por 24 h. Finalmente, de la selección enriquecida, se hizo una siembra en agar XLD (Xilosa, Lisina, Deoxicolato) (Scharlau, España) y otra en agar Hektoen (Scharlau, España). Las cajas fueron incubadas a 35°C por 48 h. Un crecimiento en cualquier de los agares XLD o Hektoen indica la presencia de *Samonella*.

Coliformes totales y fecales

Se tomó 1 mL 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) (Oxoid, Reino Unido) y en caldo Brilla (Scharlau, España). Se incubaron a 35°C durante 48 horas. El resultado se reportó como NMP (Número Más Probable).

Esterilidad comercial

Esta prueba fue hecha solamente al polen tratado en autoclave con el fin de observar si el proceso eliminó cualquier forma de vida que afecte la salud de seres humanos o que puedan alterar el producto en condiciones de almacenamiento. Inicialmente, tres muestras de un mismo tratamiento térmico fueron incubadas a 35°C por 10 días para el desarrollo de microorganismos mesófilos. Al mismo tiempo, otras tres muestras fueron incubadas a 55°C por 5 días para el desarrollo de microorganismos termófilos. Al finalizar cada periodo, se tomaron 2 g de polen de cada muestra para ser inoculados e incubados en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Para las condiciones aeróbicas los 2 g de polen fueron agregados a un tubo con 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Scharlau, España), el cual fue incubado a 35°C por 5 días. Por otra parte, para las condiciones anaeróbicas, los 2 g de polen fueron agregados a un tubo con 10 mL de caldo hígado (Scharlau, España), el cual fue incubado a 55°C por 3 días. En la Figura 2-2 se presenta un esquema del análisis de esterilidad comercial. Se considera que la muestra no cumple con los requisitos de esterilidad comercial cuando se observa desarrollo en alguno de los tubos inoculados. Al finalizar los periodos de incubación, se emplearon láminas microscópicas para evidenciar la ausencia de células microbianas (Holguín *et al.*, 1998).

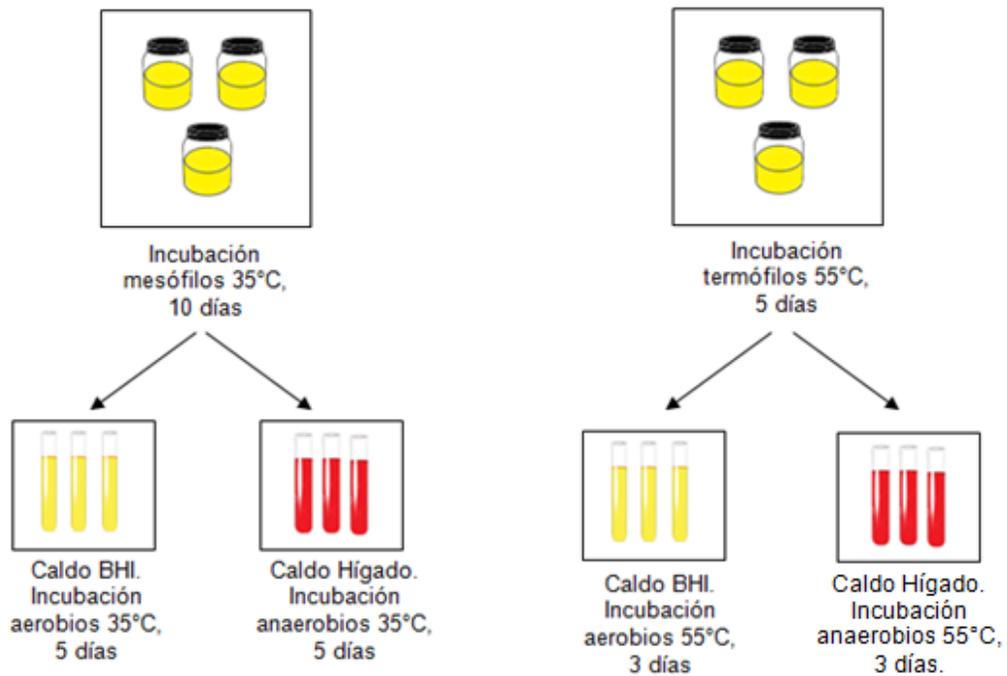


Figura 2-2. Diagrama explicativo del análisis de esterilidad comercial por tratamiento

2.2.5.3. Análisis fisicoquímicos

Humedad

3 g de muestra fueron pesados y calentados a 65°C por 24 h. El contenido de humedad fue obtenido por diferencia (Fuenmayor *et al.*, 2014).

Actividad de agua

Esta propiedad fue medida mediante un medidor de la actividad de agua (GBX, FAsT-Lab®, Francia), y expresada de manera adimensional; este instrumento fue calibrado previamente con soluciones salinas de actividad acuosa conocida. Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente ($18 \pm 5^\circ\text{C}$) (GBX, 2012).

pH y acidez

2.5 g de muestra fueron mezclados con agua libre de CO_2 y se titularon con NaOH 0.05 N hasta pH 8.5. El pH fue calculado usando un potenciómetro previo a la titulación (Fuenmayor *et al.*, 2014).

Cenizas y minerales

La ceniza fue determinada a través de gravimetría después de incineración en un horno a 600°C hasta un peso constante. Los minerales fueron determinados mediante el uso de la ceniza obtenida. Las cenizas se sometieron a un proceso de digestión con 15 mL de una solución de ácido clorhídrico concentrado-agua de calidad HPLC en relación 1:1, 3 mL de ácido nítrico concentrado (HNO₃ 67% - Chemi, Italia) y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl 37%, Chemi- Italia). Esta solución fue dejada en ebullición durante 10 min. Posteriormente, la solución fue filtrada y transferida a un balón de 50 mL cuyo volumen fue completado con agua de calidad HPLC. Una vez obtenida esta solución se prepararon diluciones para cada una de los minerales analizados, de acuerdo a la Tabla 2-3.

Tabla 2-3. Diluciones de las muestras de polen para la medición y cuantificación de minerales

Mineral	Volumen alícuota	Volumen Solución 2	Volumen alícuota 2	Volumen final
Na, Zn	4	-	-	25
Ca	1	-	-	50
Cu, Fe	8	-	-	10
Mg	5	25	2	25
K	5	25	1	50

Posteriormente, se utilizó un espectrómetro de absorción atómica AA 240 (Varian Inc., EE.UU.) para tomar mediciones de minerales de acuerdo a las siguientes longitudes de onda: Na: 599 nm, Mg: 285 nm, K: 766.5 nm, Ca: 422.7 nm, Zn: 213.9 nm y Fe: 248.3 nm, a través del automuestreador que trae incorporado el equipo. Este procedimiento se realizó de acuerdo al protocolo AOAC 968.08 (AOAC, 2005).

Lípidos

Los lípidos se determinaron por el método Soxhlet donde fueron extraídos de la matriz alimentaria mediante arrastre con éter de petróleo (J.T: Baker, USA); este último se separó de los lípidos por calentamiento, según el protocolo AOAC 920.39 (AOAC, 2005).

Proteínas

Se determinaron mediante el método de Kjeldahl con la variación de Winkler, método AOAC 984.13. Ácido bórico (Chemi, Italia) se utilizó para cuantificar el contenido de nitrógeno en la muestra, aplicando un factor de conversión de N x 6.25 (AOAC, 2005).

Carbohidratos

Se utilizó HPLC para la evaluación de carbohidratos simples. Inicialmente, se preparó agua grado HPLC, tomando 1 L de agua destilada y pasándola a través de un sistema de purificación de agua Thermo Scientific 1305 Easypure II (USA). Posteriormente el agua ultrapura obtenida anteriormente se colocó en una placa de calentamiento (Schott, USA), dejándola en ebullición durante 15 minutos. Una vez enfriada, el agua se filtró en un sistema de desgasificación y filtración de poliamida (Sortolon) de 0.45 μm . Finalmente, el agua fue puesta en un ultrasonido (Ultrasonic LC 30H, USA) durante al menos 15 min.

La muestra se preparó pesando 5 g en un tubo Falcon® de 50 ml, al cual se adicionaron 40 mL de agua ultrapura grado HPLC (anteriormente mencionada), para luego llevar este tubo al vortex por cerca de 5 minutos a 1500 rpm y luego a centrifuga a 5000 rpm por 20 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante para completar a volumen con agua HPLC en balón aforado de 25 mL. De esta solución se tomaron alrededor de 5 mL para pasar por un cartucho de limpieza Sep-pack C18 y por una membrana de nylon de 0.2 μm . 20 μL de esta solución fueron inyectados en el cromatógrafo (sistema de bomba Jasco PU-980), mediante el uso de una columna MetaCarb Ca Plus A5205 de 30x0.78 cm (Varian, USA). Como fase móvil se utilizó agua grado HPLC con un flujo de 0.5 mL/min y la temperatura se fijó en 80°C (horno Jasco, CO-2065 Plus). Se usó un detector de índice de refracción (Jasco, RI-203 Plus) para la detección del contenido de fructosa, glucosa y sacarosa. Este procedimiento fue adaptado de la metodología propuesta por el método AOAC 979.23 (AOAC, 2005).

Fibra dietaria

La fibra dietaria se determinó utilizando polen seco y desengrasado, obtenido luego de los procesos de cuantificación de humedad y lípidos comentados previamente. Inicialmente, para la determinación de la fibra dietaria insoluble se tomaron 0.5 g de muestra las cuales fueron puestas en un vaso de cuello alto de 600 mL, al cual fueron adicionados 40 mL de solución *Buffer* de MES/TRIS pH 8.2 y 50 μL de solución de α -amilasa termoestable (Megazyme, USA). La solución se incubó por 35 minutos dentro de un baño termostático (VELP Scientifica, Italia) a 92°C con agitación magnética. Luego, la temperatura se redujo a 60°C y se adicionaron 100 μL de una solución de proteasa (Megazyme, USA) y se continuó con la agitación por 30 minutos. Una vez finalizado, se adicionaron 200 μL de amiloglucosidasa (Megazyme, USA), continuando con la agitación y temperatura por otros 30 minutos. Una vez terminado esto, se realizó una filtración a vacío de la solución en un crisol de vidrio sinterizado, el cual posteriormente fue puesto a secado a 103°C durante al menos 12 h. El contenido de fibra dietaria insoluble se obtiene por diferencia del peso del crisol.

Para la determinación del contenido de fibra dietaria soluble, todo el residuo líquido obtenido en el proceso anterior es puesto en un vaso de cuello alto de 600 mL, al cual se le adicionan 250 mL de etanol 95% precalentado a 60°C. Luego de 4 h en reposo la

solución fue filtrada en un sistema de filtración enzimático VELP CSF6 (Italia) y el precipitado colectado en un crisol de vidrio sinterizado, el cual es puesto en secado a 103°C durante al menos 12 h. El contenido de fibra dietaria soluble se obtiene por diferencia del peso del crisol. Finalmente a los residuos les fueron cuantificados los contenidos de cenizas y proteínas de acuerdo a los procedimientos comentados previamente, y estos valores fueron corregidos de los contenidos de fibra dietaria insoluble y soluble. El procedimiento fue llevado a cabo con base en el método AOAC 985.29 (AOAC, 2005; Diaz *et al.*, 2012).

Digestibilidad in-vitro

1.5 g de muestra seca y desengrasada fue mezclada en una solución de 150 mL de pepsina 0.002% en HCl 0.075 N y mantenida en agitación durante 16 h a 45°C. Luego, el contenido fue filtrado y el contenido de proteína fue determinado tanto en la parte digerida como en la no digerida por el método Kjeldahl. La digestibilidad es la relación entre el contenido de proteína de la parte digerible y el contenido de proteína original de la muestra. El resultado es expresado como g de proteína digerida / 100 g de proteína total de polen (ICONTEC, 1994).

Carotenoides totales

El contenido total de carotenoides fue estimado de acuerdo con Rodríguez-Amaya *et. al.* (2004) y Schulte *et.al.* (2009). 200 mg de polen fueron pesados en un tubo Falcon, luego 2 mL de acetona fueron agregados, se agitó por 1 min y centrifugó a 9000 rpm por 5 min. Este proceso fue repetido tres veces más. La solución fue filtrada, transferida cuantitativamente y llevada a volumen con acetona a 25 mL. La absorbancia fue medida a 450 nm con un espectrofotómetro JASCO Model V-530 UV/VIS, empleando el *software* Spectra Manager (Jasco, Italia), y acetona como blanco. La curva de calibración fue realizada con β -caroteno (Sigma Aldrich, USA) en un rango de concentración entre 0.2 y 4.5 μ g β -caroteno / mL y los resultados fueron expresados como mg β -caroteno / kg polen.

Preparación de los extractos etanólicos para la medición de flavonoides totales, fenoles totales y actividad antioxidante.

Cerca de 1 g de muestra fue pesado en un *beaker* al que posteriormente fueron adicionados 30 mL de etanol (96% v/v). El *beaker* fue cubierto con papel aluminio y agitado a baja velocidad por 24 h en oscuridad. La solución fue filtrada usando papel filtro 3 hw y llevada a volumen hasta 100 mL con etanol.

Flavonoides totales

Se mezclaron 4 mL de agua destilada, 0.3 mL de una solución al 5% de NaNO_2 y 1 mL del extracto etanólico preparado. Luego de 5 min, se agregó 0.3 mL de una solución al 10% de AlCl_3 , y 1 min después 2 mL de NaOH 1 M y 2.4 mL de agua destilada. La absorbancia de la solución final fue leída a 510 nm con un espectrofotómetro JASCO Model V-530 UV / VIS, con el *software* Spectra Manager (Jasco, Italia). Quercetina fue empleada para la curva de calibración (Sigma Aldrich, USA) en un rango de concentración entre 4 y 250 μg quercetina / mL y los resultados fueron expresados como equivalentes de quercetina: mg eq-quercetina/ g polen (Almaraz-Abarca *et al.*, 2004).

Fenoles totales (Folin-Ciocalteu).

El contenido total de fenoles fue estimado de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu con algunas modificaciones (Singleton *et al.*, 1999). La absorbancia de la solución final fue leída a 765 nm usando agua como blanco, con un espectrofotómetro JASCO Model V-530 UV / VIS, con el *software* Spectra Manager (Jasco, Italia). La curva de calibración fue realizada con ácido gálico (Sigma Aldrich, USA) en un rango de 0.2 a 1.0 mg/mL. Los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico: mg eq-ácido gálico/ g polen (base seca).

Actividad antioxidante equivalente en Trolox (TEAC)

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante a través de la reacción del radical ABTS (Erel, 2004). La solución del radical catiónico ABTS fue preparada haciendo reaccionar una solución de la sal de diamonio de ABTS y una solución de persulfato de potasio. Luego se mezclaron 1 mL de ésta solución y 10 μL del extracto etanólico, midiéndose la absorbancia a 734 nm luego de 6 min con un espectrofotómetro JASCO Model V-530 UV / VIS, con el *software* Spectra Manager (Jasco, Italia). Se calculó el grado de decoloración como la reducción del porcentaje en absorbancia, el cual fue calculado en relación a la concentración equivalente en Trolox (0.2-2.0 mM). Los resultados son expresados como μmol trolox / g polen (base seca).

Capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP)

Se realizó la determinación de la actividad antioxidante a través de la reacción del complejo radical 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Benzie and Strain, 1996). Se mezclaron 20 μL de extracto, 450 μL de la solución FRAP (una mezcla de buffer acetato y ácido acético, TPTZ y FeCl_3) y 735 μL de agua destilada. Esta solución fue mantenida en oscuridad durante 30 min a 40°C. La absorbancia fue medida a 593 nm con un

espectrofotómetro JASCO Model V-530 UV / VIS, con el *software* Spectra Manager (Jasco, Italia). Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol trolox / g polen}$ (base seca).

2.2.6. Análisis estadístico

2.2.6.1. Tratamientos térmicos

Todos los tratamientos térmicos y mediciones fisicoquímicas fueron llevados a cabo por triplicado. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias fueron establecidas a través de una prueba de Rango Múltiple de Duncan.

Por otra parte, el análisis global de los datos fue realizado mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA), el cual es una técnica que busca reducir la dimensionalidad de los datos, manteniendo mediante esta técnica la mayor cantidad de información posible, la cual es determinada por la varianza obtenida. Al final, toda la información obtenida podrá ser estudiada mediante el análisis de dos gráficos, en los cuales puede establecerse la relación que hay entre muestras, entre variables, y las muestras con respecto a las variables (Bereton, 2007). Para este trabajo, las variables empleadas para la realización del PCA fueron digestibilidad, contenido de fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides totales y actividad antioxidante (FRAP y TEAC).

Para la selección del mejor tratamiento térmico entre todos los realizados se empleó un método de ordenación total, a través de la obtención de funciones de conveniencia y utilidad. Los métodos de ordenación total son técnicas de toma de decisiones multicriterio empleadas para clasificar varias alternativas sobre la base de más de un criterio (variable), las cuales son explicadas con mayor detalle en bibliografía especializada (Pavan and Worth, 2008). La aproximación a este ordenamiento puede ser obtenida a través de la definición de funciones de conveniencia y utilidad. Estas funciones están basadas en la definición de una función de valor parcial, es decir, una función de transformación para cada criterio para estandarizar los valores en una misma escala. La utilidad global de cada alternativa es definida como una media aritmética (ver Ecuación 2-3).

$$U_i = \sum_{j=1}^p w_j \cdot t_{ij} \quad \text{Ecuación 2-3}$$

Donde U representa el valor de utilidad de la i-ésima alternativa (tratamiento), p el número de criterios (variables), w el peso asignado por el analista a cada criterio y t representa el valor obtenido en la función de transformación. Los valores de utilidad oscilan entre 0 y 1, en el cual 1 representa la alternativa más útil. Por otra parte, la conveniencia (D) es definida como la media geométrica (ver Ecuación 2-4):

$$D_i = \sqrt[p]{t_{i1} \cdot t_{i2} \cdot \dots \cdot t_{ip}}$$

Ecuación 2- 4

Los valores de conveniencia oscilan entre 0 y 1, siendo 1 la alternativa más conveniente. Es claro, que el mejor tratamiento será el que conjuntamente tenga la mayor utilidad y la mayor conveniencia.

Previo al desarrollo de las funciones de conveniencia y utilidad, se seleccionaron los tratamientos aptos desde el punto de vista microbiológico, es decir, aquellos cuyos conteos estuvieran por debajo de los valores de referencia reportados por bibliografía o que tuvieran un resultado favorable en las pruebas de esterilidad comercial. Los tratamientos que no cumplieron los requisitos microbiológicos no fueron tenidos en cuenta para el modelo. El método de ordenación se desarrolló con la inclusión de las variables fisicoquímicas de acidez, digestibilidad, contenido de fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides totales y actividad antioxidante (FRAP y TEAC), y las variables microbiológicas de UFC/g de mesófilos aerobios y UFC/g de mohos y levaduras.

Se seleccionó una función de transformación tipo sigmoidea, excepto para acidez, mesófilos aerobios y mohos y levaduras, la cuales se transformaron con una función sigmoidea inversa. La función de transformación directa da valores altos a aquellos tratamientos que maximizan el resultado de la variable y castigan severamente aquellos que minimizan el resultado. En el caso de la función inversa, ésta asigna valores bajos a aquellos tratamientos que maximizan el resultado y asigna valores bajos a los tratamientos que minimizan el resultado. Así mismo, los pesos asignados para esta variable fueron seleccionados con base en los objetivos de este trabajo, en los cuales se busca un incremento en las características nutricionales y bioactivas sin dejar de lado la calidad microbiológica. Con base en este criterio, a todas las variables anteriormente mencionadas se les asignó un peso relativo por igual de 0.125, excepto a cada técnica de actividad antioxidante a las que se les asignó un peso individual de 0.0625. En total, la suma de los pesos de todas las variables es 1.

Los análisis estadísticos fueron realizados empleando el paquete estadístico de MATLAB (The Mathworks, ver. 7.14, 2012) (Ballabio, 2015) y el programa DART (Decision Analysis and Ranking Techniques) (Talete srl, Italia).

2.2.6.2. Tratamiento no térmico

Con base en los diseños, las muestras fueron tratadas por duplicado y analizadas por triplicado en todos los casos. Los experimentos fueron aleatorizados para minimizar el sesgo sistemático en las respuestas observadas debido a factores extraños y para incrementar la precisión.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) fue usada para investigar los efectos simultáneos de las variables de presión y tiempo para el producto semi-sólido y presión,

tiempo y concentración de polen para el néctar de piña con inclusión de polen, sobre el contenido de fenoles totales, carotenoides, actividad antioxidante e inactivación microbiológica de las muestras preparadas. El programa generó los coeficientes de regresión para cada una de las combinaciones de términos de las variables independientes, y su significancia fue determinada mediante una prueba t-student. Los términos no significativos ($p > 0.05$) fueron borrados del modelo polinomial después de una prueba ANOVA, y un nuevo ANOVA fue realizado para obtener los coeficientes de la ecuación final para mejor exactitud. Para este propósito, el programa siempre conduce una búsqueda comenzando en el centro de la región experimental. Dado que el punto de partida puede afectar si se localiza un punto global o local, la optimización también fue hecha empleando búsquedas adicionales comenzando en el mejor punto del diseño (punto del diseño con la mayor deseabilidad predicha), todos los puntos, el mejor vértice (combinación de nivel alto o bajo de cada factor con la mayor deseabilidad predicha), o todos los vértices, para obtener el mejor resultado entre el conjunto de búsquedas que el programa realiza.

El diseño experimental y el análisis de datos fueron realizados usando el software Statgraphics® Centurion XV (Statpoint Technologies, Inc., USA).

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Caracterización palinológica y fisicoquímica del polen

2.3.1.1. Caracterización palinológica del polen

El polen empleado para este estudio fue recolectado en el Altiplano Cundiboyacense, que se encuentra localizado a una altitud superior a los 2.500 msnm, en la parte central de los Andes orientales colombianos. Se compone de tierras llanas y altas entre los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, con una temperatura media de 15°C que puede variar desde 0 hasta 24°C. En esta región pueden encontrarse simultáneamente un gran número de especies de plantas que proveen polen para las abejas, haciendo que las muestras exhiban una multiplicidad de colores y la imposibilidad práctica de tener un polen de abeja monofloral (Montoya, 2011). En la Tabla 2-4 se presenta la caracterización palinológica del polen empleado.

A partir de la caracterización palinológica se puede observar que dos morfotipos son los predominantes en el polen muestreado: *Hypochoeris radicata* y *Brassica sp.* El primero tiene como nombres comunes hierba del chancho, achicoria de monte, radicheta o roseta (Conabio, 2015). Entre tanto, el segundo abarca muchas plantas empleadas en agricultura, horticultura, así como algunas malezas. Aunque la especie en esta identificación botánica no fue definida, es común encontrar en el Altiplano Cundiboyacense el nabo, que es común de zonas frías (Montoya, 2011).

Tabla 2-4. Caracterización palinológica del polen apícola

Familia	Tipo polínico	Porcentaje
Asteraceae	<i>Hypochaeris radicata</i>	42,89
Brassicaceae	<i>Brassica</i> sp.	34,31
Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i> sp.	5,33
Fabaceae	<i>Trifolium repens</i>	4,33
Poligonaceae	<i>Muehlenbeckia tamnifolia</i>	3,79
Fabaceae	<i>Trifolium pratense</i>	3,48
Fagaceae	<i>Quercus humboldtii</i>	1,85
Balsaminaceae	Balsaminaceae Tipo	1,55
Asteraceae	<i>Taraxacum officinale</i>	0,85
Indeterminado	Indeterminado	0,77
Euphorbiaceae	<i>Croton</i> sp.	0,46
Fabaceae	<i>Acacia decurrens</i>	0,39
TOTAL		100

2.3.1.2. Caracterización fisicoquímica del polen

En la Tabla 2-5 se presenta la composición promedio del polen. El polen recolectado presentó un valor promedio de pH de 4.16 y acidez de 245.6 meq/kg. Valores de acidez en polen fresco por encima de 300 meq/kg o por debajo de 4 pueden ser el resultado de actividad microbiana indeseable (Campos *et al.*, 2008). A excepción de algunos estudios que generalmente se ocupan de los cambios bioquímicos que el polen sufre dentro de una colmena cuando se convierte en pan de abeja (Čeksteryté *et al.*, 2008), rara vez se ha evaluado la acidez del polen.

Tabla 2-5. Composición fisicoquímica del polen apícola del Altiplano Cundiboyacense*

Parámetro	Valor promedio \pm desviación estándar
pH	4.16 \pm 0.07
Acidez (meq/kg)	245.6 \pm 31.8
Humedad (%)	20.4 \pm 1.4
Cenizas (%)	2.5 \pm 0.4
Lípidos (%)	6.9 \pm 3.5
Proteína (%)	23.8 \pm 3.2
Fructosa (%)	19.5 \pm 0.9
Glucosa (%)	13.6 \pm 2.4
Sacarosa (%)	6.7 \pm 2.0
Fibra dietaria soluble (%)	2.7 \pm 1.8
Fibra dietaria insoluble (%)	11.7 \pm 3.3
Fibra dietaria total (%)	14.5 \pm 3.5

* Base seca, excepto humedad.

En lo que respecta al contenido de humedad, el polen empleado para este estudio fue recolectado en estado fresco sin tratamiento previo. En realidad, la bibliografía reporta el contenido de humedad del polen una vez ha sido sometido a procesos de secado. Se sugiere que el polen sea secado hasta alcanzar un contenido de humedad de alrededor de 6 g/100 g, teniendo en cuenta que un contenido de humedad inferior al 4% puede también inducir reacciones de rancidez (Campos *et al.*, 2008).

Entre tanto, el polen del Altiplano Cundiboyacense tiene un contenido promedio de lípidos cercano al 7%. El contenido de lípidos es altamente variable y depende de la cantidad de ácidos grasos, carotenos y vitaminas presentes en el polen (Manning, 2006).

El contenido de proteína tuvo un valor promedio cercano al 24%, siendo similar a los obtenido por Szczesna, Estevinho *et al.* y por Almeida-Muradian *et al.* para polen polaco, portugués y brasilero, respectivamente (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Szczesna, 2007b; Estevinho *et al.*, 2012a), mientras que tuvo un valor menor al reportado por González-Martín *et al.* en polen español (Gonzalez-Martin *et al.*, 2007). Las diferencias en el contenido proteico son debidas al origen botánico (Almaraz-Abarca *et al.*, 2004).

El polen del Altiplano Cundiboyacense tiene una composición de carbohidratos totales en promedio de 54%, siendo fructosa, glucosa y sacarosa cerca del 40% de este contenido. Qian *et al.* reportan el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en pólenes de Israel, China, Rumania y España, en los que el contenido de fructosa varía entre 15.9% y 19.9%, glucosa 8.2% y 13.1% y sacarosa entre 14.8% y 18.4% (Qian *et al.*, 2008).

La fibra dietaria total mostró un contenido promedio de 14.5%. Este valor está dentro del intervalo definido por Campos *et al.* como sugerencia para la normativa estándar de polen entre 0.3% y 20% (Campos *et al.*, 2008) y es bastante cercano a los reportes de Serra-Bonvehí *et al.* para polen español de 13.7% (Serra-Bonvehí and Jordá, 1997), y por Domínguez-Valhondo también en polen español con un promedio de 14.5%.

El contenido de cenizas tuvo un valor promedio de 2.5%, siendo un poco inferior a lo reportado para otros pólenes (Brasil: 2.4%, Polonia: 2.7%, Corea del Sur y China: 2.8%) (Orzáez *et al.*, 2001; Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Szczesna, 2007b). Además, de los seis minerales cuantificados (ver Tabla 2-6), el potasio es el más concentrado, seguido en orden decreciente por calcio, magnesio, sodio, hierro y zinc. En comparación a pólenes de otros países, el polen colombiano contiene una reducida cantidad de sodio, hierro y magnesio, con respecto a los valores reportados para Corea del Sur (678 mg/kg, 177 mg/kg y 1274 mg/kg, respectivamente) o China (1549 mg/kg, 108.2 mg/kg y 1434 mg/kg, respectivamente). En contraste, el polen del Altiplano contiene niveles mayores en potasio, calcio y zinc, en comparación al de España (3852 mg/kg, 583 mg/kg y 36.6 mg/kg, respectivamente), Polonia (3903 mg/kg, 762 mg/kg y 36.8 mg/kg, respectivamente), Corea del Sur (4350 mg/kg, 430 mg/kg y 47.4 mg/kg, respectivamente) o China (5434 mg/kg, 441 mg/kg y 28.9 mg/kg, respectivamente) (Orzáez *et al.*, 2001; Szczesna, 2007b).

Tabla 2-6. Composición mineral del polen (mg/kg)*

Parámetro	Valor promedio \pm desviación estándar
Sodio	99.3 \pm 79.5
Potasio	5,625 \pm 1,176
Calcio	1,717 \pm 310
Hierro	70.7 \pm 27.8
Magnesio	1,029 \pm 396
Zinc	47.4 \pm 21.6

* Base seca

Los resultados de composición bioactiva son presentados en la Tabla 2-7. El contenido de polifenoles en polen fresco tuvo un valor promedio de 15.0 mg GAE / g, siendo comparable al polen recolectado en el desierto de Sonora (USA) (15.91 - 34.85 mg GAE/g), India (18.29 mg GAE/g) o Portugal (10.50 - 16.80 mg GAE /g) (LeBlanc *et al.*, 2009; Morais *et al.*, 2011; Ketkar *et al.*, 2014), y mayor al reportado para Rumania (3.76 - 8.87 mg GAE /g), España (8.50 -14.60 mg GAE/g) y Brasil (3.60 - 8.10 mg GAE /g) (Serra-Bonvehí *et al.*, 2001; Carpes *et al.*, 2007; Margaoan *et al.*, 2013). Este contenido también es mayor que el reportado para muchas frutas o vegetales; por ejemplo, las ciruelas contienen 3.69 mg/g (GAE), fresas 2.25 mg/g (GAE), manzanas 1.18 mg/g (GAE), espárragos 0.64 mg/g (GAE), ajo 0.48 mg/g (GAE), tomate 0.24 mg/g (GAE), o champiñones 0.11 mg/g (GAE) (Chun *et al.*, 2005) y es comparable a la mora 21.67 mg/g (GAE), cereza 14.94 mg/g (GAE), o maracuyá 10.10 mg/g (GAE) (Vasco *et al.*, 2008; Kaškonienė *et al.*, 2014).

Tabla 2-7. Composición bioactiva del polen apícola del Altiplano Cundiboyacense*

Parámetro	Valor promedio \pm desviación estándar
Compuestos fenólicos totales (mg-eq ac. gálico/g)	15.0 \pm 2.1
Flavonoides totales (mg-eq Quercetina/g)	4.99 \pm 1.79
Carotenoides totales (mg β -caroteno/kg)	684.5 \pm 82.8
Actividad antioxidante FRAP (μ mol TROLOX/g)	58.5 \pm 15.6
Actividad antioxidante TEAC (μ mol TROLOX/g)	60.8 \pm 9.9

* Base seca.

En lo que respecta al contenido de flavonoides, el contenido en polen fresco (4.99 \pm 1.29 mg QE/g) es coherente con lo reportado por otros autores: 2.66 a 5.48 mg QE/g (Desierto de Sonora - USA, (LeBlanc *et al.*, 2009)), 3.80 a 7.60 mg QE/g (España, (Serra-Bonvehí *et al.*, 2001)), 5.71 a 14.57 mg QE/g (Argelia, (Rebiai and Lanez, 2012)), 2.55 a 6.29 mg QE/g (Rumania, (Margaoan *et al.*, 2013)).

Por otra parte, el contenido de carotenoides del polen del Altiplano fue en promedio de 684.5 mg β -caroteno/kg. Valores cercanos fueron encontrados por Barajas *et al.* (2012) y Almeida-Muradian *et al.* (2005) quienes reportaron contenidos de hasta 770 y 451 mg β -caroteno/kg para polen Colombiano y Brasileiro, respectivamente.

Finalmente, la actividad antioxidante del polen fue reportada mediante dos técnicas como recomienda la bibliografía especializada para establecer cierta validez de la medición al ser una estimación de lo que ocurre en el cuerpo (Alvarez-Suarez *et al.*, 2009). La capacidad anti-radicalaría mostró valores similares por ambas técnicas, mientras en FRAP dio un promedio de 58.5 μ mol Trolox / g, en TEAC se obtuvo un promedio de 60.8 μ mol Trolox / g. Es importante mencionar que debido a la falta de un método validado para medir la actividad antioxidante es difícil la comparación con otras investigaciones, incluso empleando la misma técnica, ya que pueden ser introducidas diferentes modificaciones a la misma, como por ejemplo el radical empleado en la curva de calibración (Bertoncelj *et al.*, 2007; Wilczyńska, 2010). No obstante, la actividad antioxidante por FRAP del polen del Altiplano se encuentra dentro del intervalo mencionado por Ulusoy y Koliayli (2013) para polen turco: entre 11.7 y 105.6 μ mol Trolox / g.

2.3.2. Resultados de los tratamientos térmicos

2.3.2.1. Secado

Se presentan inicialmente las curvas de secado realizadas a cada temperatura con el fin de establecer la variación del contenido de humedad con respecto al tiempo. Posteriormente, se describe el efecto del secado sobre la estructura del polen, así como sobre las características microbiológicas y fisicoquímicas del producto seco.

2.3.2.1.1. Curvas de secado

En la Figura 2-3 se presentan las curvas de secado en muestras de polen tratadas a 40°C, 50°C y 60°C, durante pruebas experimentales llevadas a cabo en un secador de cabina con aire caliente.

Se pudo observar que mediante el proceso de secado a 40°C y 50°C, temperaturas comúnmente empleadas en el secado por los apicultores, se obtuvieron contenidos de humedad que no son estables al cabo de seis horas (8.98% y 5.22%, respectivamente). Entre tanto, con la temperatura de secado de 60°C se alcanza un valor de humedad estable sobre la quinta hora (3.31%), con lo cual puede inferirse que un tiempo de secado de cinco horas es suficiente para lograr un contenido de humedad final inferior al

5% (Durán, 2014), como es sugerido en las normativas existentes en diferentes países (Suiza, Brasil, Argentina) (Argentina, 1990; Brasil, 2001; Campos *et al.*, 2008). Estudios previos con polen del Altiplano Cundiboyacense mostraron que a 60°C un tiempo de secado inferior a cuatro horas es suficiente para lograr un contenido de humedad final inferior al 5% (Durán, 2014).

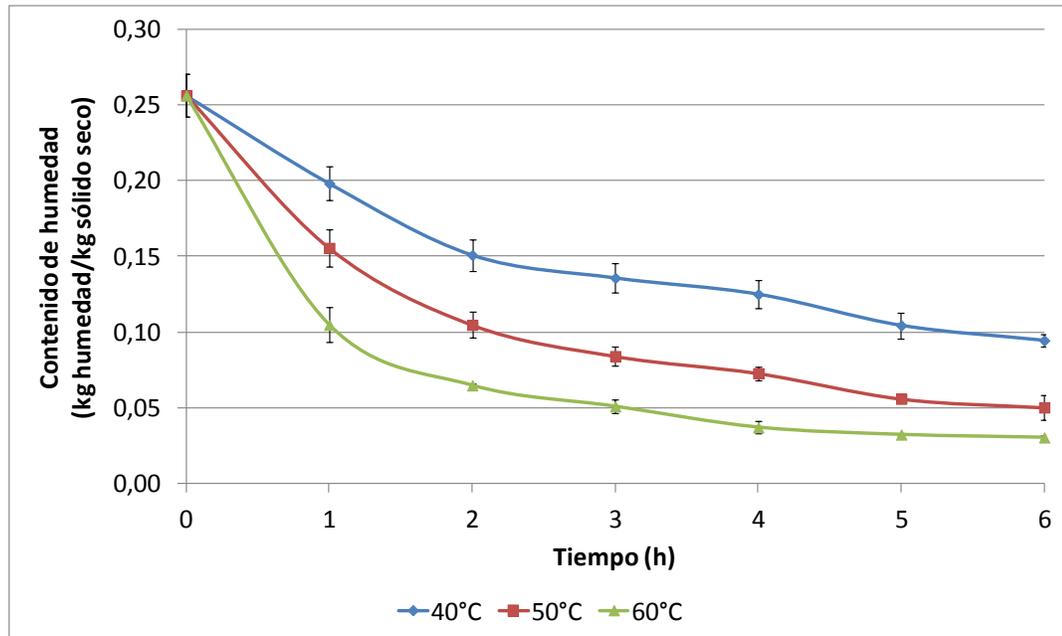


Figura 2-3. Curva de secado de polen a tres diferentes temperaturas

2.3.2.1.2. Efecto del secado sobre la estructura del polen

Con el fin de establecer el efecto del secado sobre la estructura del polen, se realizaron análisis por TGA y DSC y se tomaron micrografías SEM para las muestras tratadas en cada condición.

Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido

Los resultados de TGA usualmente son mostrados mediante el uso de la primera derivada con respecto al tiempo, con lo cual se obtiene una gráfica conocida como curva termogravimétrica (DTG) (Gabbott, 2008), presentada en la Figura 2-4. La pérdida de peso ocurre en dos etapas, la primera inicia a temperaturas cercanas a 50°C, donde se observa una menor altura del pico cuando se emplea secado a mayor temperatura, pasando desde valores en el polen fresco de 21.9% a 7.66% en el polen secado a 60°C (ver Tabla 2-8), con lo cual esta etapa corresponde a la pérdida de agua libre en el polen. La segunda etapa ocurre a temperaturas cercanas a los 180°C, que puede estar relacionado a la eliminación de compuestos volátiles (Ahmed *et al.*, 2007), en la que se

observa una pérdida de peso que se incrementa conforme el aumento en la temperatura del secado, pasando de 21.74% en polen húmedo a 25.69% en el polen seco a 60°C.

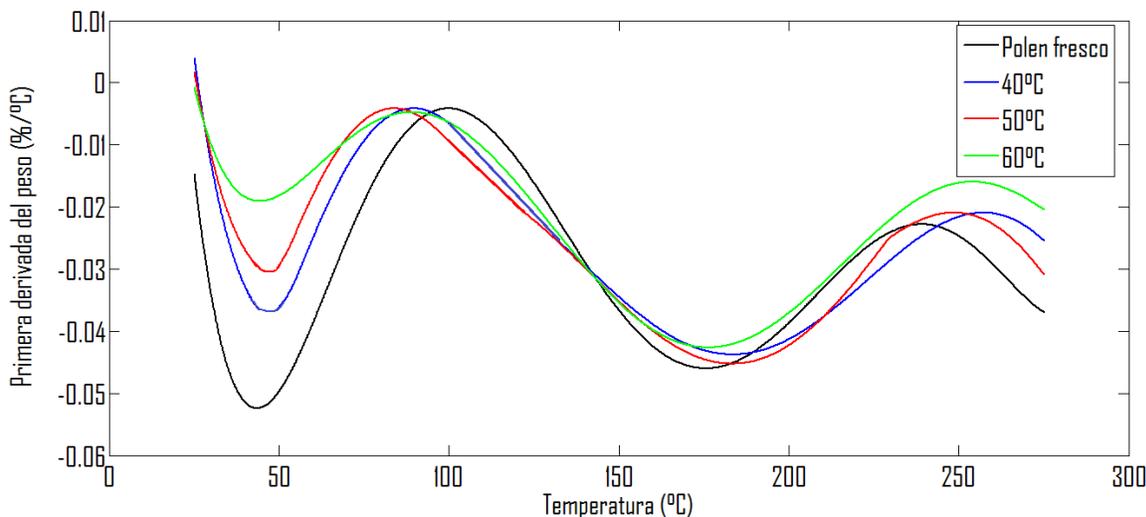


Figura 2-4. Gráfica de DTG para polen fresco y seco

Tabla 2-8. Resultados de temperatura de pico y masa perdida del polen sometido a secado

Producto	Primer pico		Segundo pico	
	Temperatura (°C)	Integración del pico (% masa perdida)	Temperatura (°C)	Integración del pico (% masa perdida)
Polen húmedo	48.57	22.90	175.53	21.74
40°C	49.70	12.82	180.55	22.02
50°C	49.54	9.79	180.39	22.19
60°C	49.37	7.66	178.20	22.89

Por otra parte, en la Figura 2-5 se observan los resultados de DSC para el polen fresco y seco a las diferentes temperaturas evaluadas. Un pico endotérmico es encontrado en los rangos de temperatura entre 130°C y 190°C, a partir del cual se puede establecer que existe un mayor consumo de energía en los pólenes que han sido sometidos a secado, en comparación al polen fresco. En particular, dentro de los pólenes secados, se observa que a mayor temperatura empleada para el tratamiento térmico hay un notable incremento en el consumo de energía. En la Tabla 2-9 se observan los valores de entalpía obtenidos para cada muestra analizada, los cuales fueron obtenidos mediante la integración del pico y la división entre la masa de polen empleada. Se observa un notorio incremento en estos valores, pasando de 17.5 J/g en polen fresco a 52.5 J/g, en el polen secado a 60°C. En adición, la temperatura del pico en los pólenes secos se redujo hasta

los 146°C, cuando en el polen fresco esta temperatura fue de 153°C. Estas condiciones hacen creer que mediante los procesos de secado se logra una degradación parcial de la exina, y que lo observado a través de DSC es una indicación que se estarían generando nuevas estructuras a medida que el secado es más intenso.

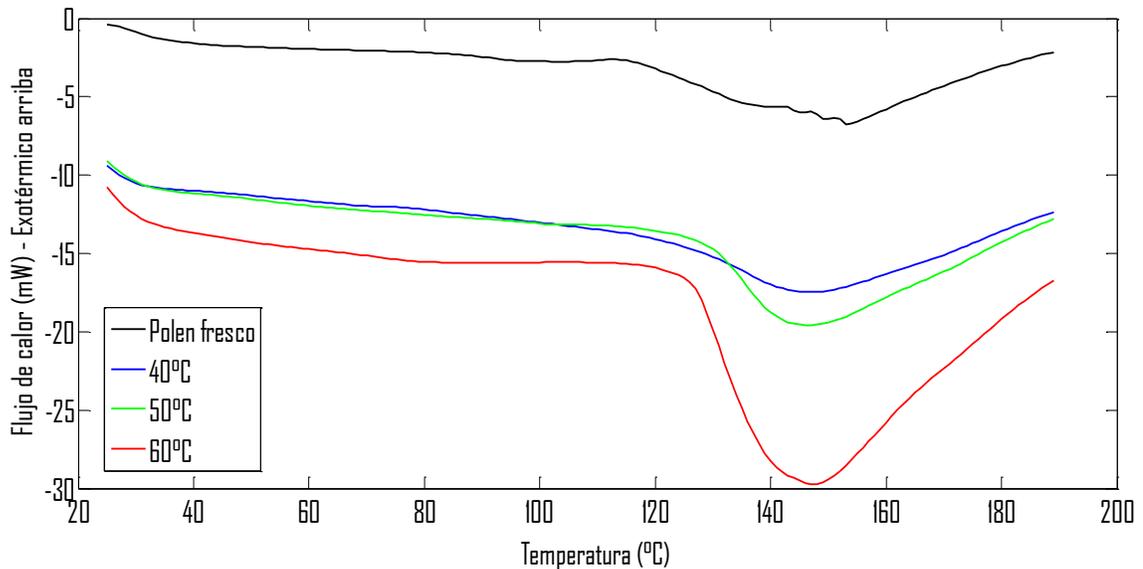


Figura 2-5. Gráfica de DSC para el polen fresco y sometidos a secado.

Tabla 2-9. Resultados de DSC para polen fresco y sometido a secado

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen húmedo	153	17.5
40°C	146	15.8
50°C	146	18.3
60°C	147	52.5

En los pólenes sometidos a secado hay un consumo inicial de energía considerable a 146°C proporcional a la intensidad del tratamiento, seguido por una pérdida de masa a 180°C, de acuerdo al reporte de DTG (ver Tabla 2-8). Los reportes bibliográficos hacen mención que a mayor temperatura del pico mayor estabilidad térmica (Gabbott, 2008), en este caso, se observa que el polen fresco tiene la temperatura del pico más alta en comparación a los pólenes secos, con lo cual puede hacerse mención que su estructura inalterada es más estable, lo cual se corrobora mediante la comparación con los valores de entalpía. El hecho que a mayor temperatura de secado la entalpía calculada en el pico endotérmico también sea mayor demuestra que la modificación estructural de la exina es dependiente de esta condición. Una vez la temperatura alcanza los 180°C los compuestos generados de menor peso molecular se volatilizan, haciendo que la muestra pierda peso.

Estos resultados son coherentes con otras investigaciones. Loewus *et al.* menciona que a partir de 120°C, la pared externa del polen (exina + intina) se erosiona, con lo que eventualmente se generan fisuras y rompimientos en el grano (Loewus *et al.*, 1985). En este punto es importante recordar que la esporopolenina es un compuesto conformado principalmente por ácidos p-hidroxicinámicos, ácidos grasos, éteres y ésteres (Barrier *et al.*, 2010). Ujiie *et al.* reportan que entre 136°C y 231°C ocurre una degradación parcial de la esporopolenina con una consecuente generación de hidrocarburos (Ujiie *et al.*, 2003), que Yule *et al.* identifican así: a temperaturas superiores a 136°C hay una generación de n-alcanos, n-alquenos y dienos, mientras que a 230°C inicia una formación de alquil fenoles y benzaldehído (Yule *et al.*, 2000). Ambos autores coinciden en llamar a este proceso 'craqueo térmico', y además hacen mención que en este rango de temperatura la estructura del polen es altamente inestable debido la remoción de grupos alifáticos y aromáticos de la esporopolenina. Los procesos de craqueo son altamente endotérmicos (Sadeghbeigi, 2000), esto querría decir que en el caso de los pólenes sometidos a secado, la temperatura de 60°C degradó en mayor proporción la esporopolenina en comparación a los demás tratamientos, esta alteración generó unas condiciones favorables para el craqueo, y por esta razón alcanzó tanto el mayor valor de entalpía como porcentaje de masa perdida.

La bibliografía también reporta que luego de 250°C ocurre una reorganización estructural de la esporopolenina mediante la formación de anillos policíclicos (Yule *et al.*, 2000). Se considera que ocurre una degradación parcial de la esporopolenina a temperaturas inferiores a 250°C, ya que para lograr su degradación total se deben alcanzar temperaturas cercanas a los 440°C (Sargin and Arslan, 2015).

En síntesis, a pesar de la complejidad de los fenómenos involucrados en la degradación de la esporopolenina, se logra evidenciar mediante TGA y DSC fundamentalmente que el secado induce una modificación parcial en la estructura de la capa externa del polen, siendo un fenómeno dependiente de la temperatura.

Microscopía Electrónica de Barrido

Las micrografías obtenidas por SEM son mostradas en la Figura 2-6. El polen tiene una estructura granular definida, específica para cada tipo de planta, con lo que se hace posible identificar a través del microscopio su origen palinológico. En la figura se observa que una vez el polen es sometido a secado, ocurre un hinchamiento, yendo de una forma ovalada a redondeada, probablemente debido a la difusión de humedad del interior al exterior del grano.

En polen secado a cualquier temperatura es aún posible observar la estructura típica de la superficie del grano; estos resultados junto a los obtenidos mediante DSC y TGA permiten establecer que la estructura del polen sufre alguna alteración, pero no lo

suficiente como para degradar la exina y tener acceso a la intina cuando es sometido a temperaturas de secado de máximo 60°C.

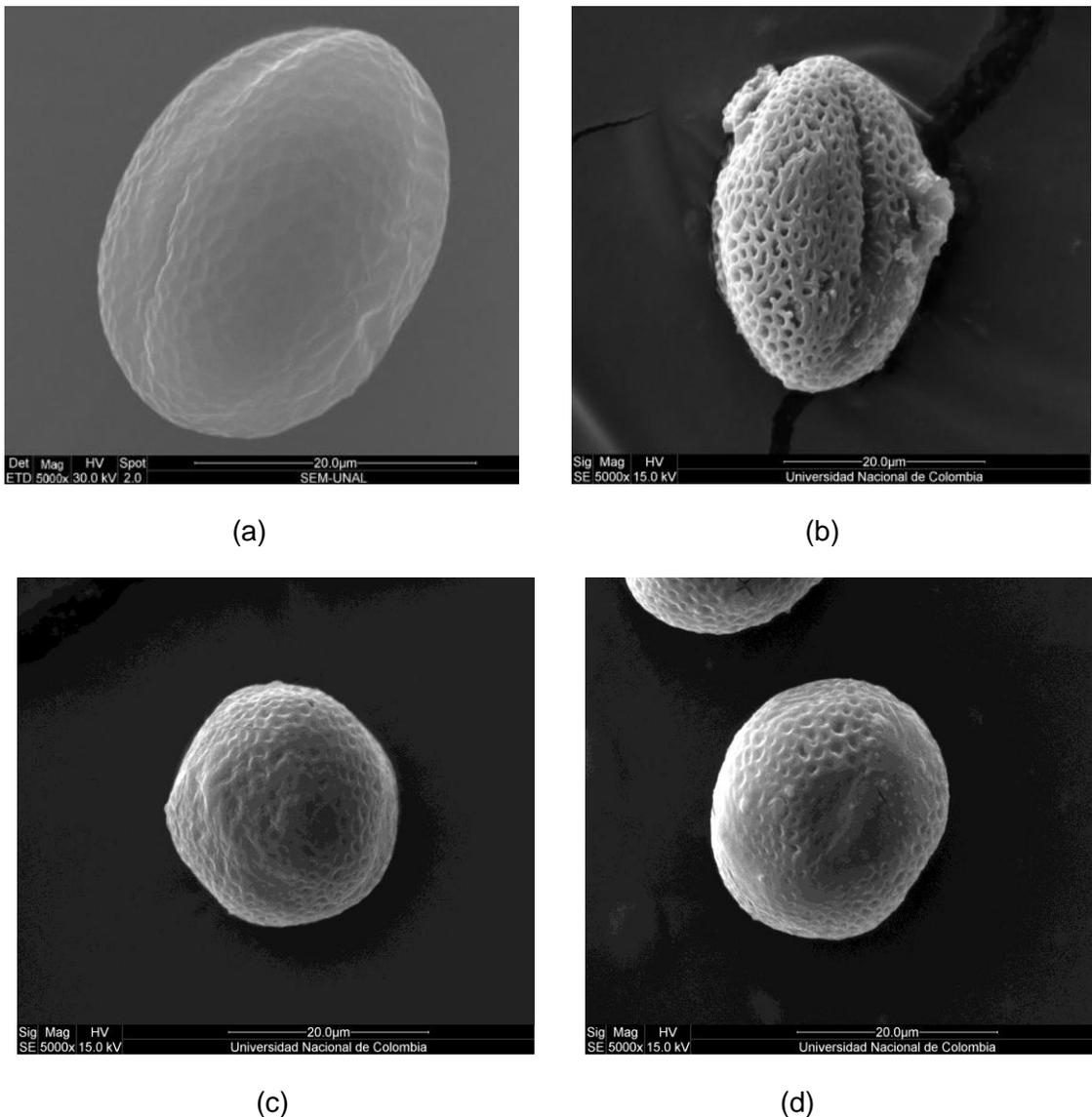


Figura 2-6. Micrografías SEM de polen fresco y seco. Magnitud 5000X. (a) Polen fresco, (b) Polen seco a 40°C, (c) Polen seco a 50°C, (d) Polen seco a 60°C.

2.3.2.1.3. Efecto del secado sobre la calidad microbiológica

En la Tabla 2-10 son mostrados los resultados de calidad microbiológica como también los valores de referencia sugeridos por bibliografía (Campos *et al.*, 2008). Los resultados microbiológicos indicaron una alta carga inicial en el polen fresco. A pesar de realizar prácticas para la limpieza y mantenimiento de las colmenas en el apiario, las condiciones ambientales y la biodiversidad en los países tropicales en algunos casos causa una

rápida contaminación del producto. A pesar de esto, se observa que el proceso de secado reduce significativamente la carga microbiológica a niveles aceptables. Se resalta cómo una elevación en la temperatura de 10 grados, de 40 a 50°C, reduce considerablemente el contenido de mesófilos, mohos y levaduras. En ningún caso se encontraron reportes de Salmonella.

Tabla 2-10. Reporte microbiológico de polen fresco y seco

	Valor de referencia	Fresco	40°C	50°C	60°C
<i>Salmonella</i> /10 g	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Conteo de mesófilos aerobios (CFU/g)	< 100 000	> 300 000	< 10 000	< 3 000	< 1 000
Mohos y levaduras (CFU/g)	< 50 000	> 200 000	< 30 000	< 4 000	< 3 000

En otros reportes, Estevinho *et al.* detectaron mohos y levaduras en el 60% y mesófilos en el 40% de muestras de polen secado por apicultores (condiciones de secado no reportadas), oscilando entre 2.8×10^3 y 7.6×10^2 UFC/g (Estevinho *et al.*, 2012b). Hervatin (2009) encontró mohos y levaduras en el 100% de las muestras estudiadas de polen fresco brasilero con cargas cercanas entre 10^4 y 10^6 UFC/g, así como en polen sometido a secado a 41°C (tiempo de secado no reportado), en el que el contenido de mohos y levaduras no pudo ser reducido a niveles inferiores a 10^4 UFC/g (Hervatin, 2009).

Con base en lo anterior, puede inferirse que para el polen, una temperatura de secado cercana a los 60°C reduce en dos órdenes de magnitud la cantidad de mesófilos aerobios y mohos y levaduras presente en el polen fresco, y en una orden de magnitud en comparación al polen secado a 40°C.

2.3.2.1.4. Efecto del secado sobre las características fisicoquímicas

Los resultados de la caracterización fisicoquímica del polen seco a 40°C, 50°C y 60°C se muestran en la Tabla 2-11. Por otra parte, en la Tabla 2-12 se presentan los resultados para compuestos bioactivos y actividad antioxidante. El secado de polen es un proceso común y ampliamente usado entre los apicultores como método de preservación del producto, ya que ayuda a reducir el contenido de agua libre a valores más seguros que limitan la degradación de componentes a causa de la acción microbiológica (González *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos muestran que la humedad es reducida de un valor mayor al 10% (20,4%) donde es susceptible de fermentación (Bogdanov, 2011), hasta valores más seguros. Aunque todos los secados tuvieron humedades finales menores al 10%, el análisis estadístico muestra como sólo a 50 o 60 °C se logra una humedad final estable. Estos resultados de humedad son coherentes con los hallazgos encontrados en

el análisis termogravimétrico con respecto al porcentaje de masa perdida en el primer pico encontrado a 50°C, en los que se observa que, al igual que en el contenido de humedad, hay una reducción en los valores conforme se incrementó la temperatura de secado. El hecho que el porcentaje de masa perdida del primer pico de DTG sea mayor que el reporte del contenido de humedad podría estar relacionado a que además de la evaporación de agua libre, hay compuestos volátiles que son liberados por efecto de la temperatura.

Tabla 2-11. Composición fisicoquímica promedio del polen seco y comparación con el polen fresco

	Humedad (g/100g)	Actividad de agua	pH	Acidez * (meq/kg)	Digestibilidad* (g /100 g)
Fresco	20.4 ± 1.4	0.762 ± 0.047	4.16 ± 0.07 ^b	245.6 ± 31.8 ^a	65.8 ± 10.1 ^a
40°C	7.9 ± 1.0 ^b	0.431 ± 0.028 ^b	4.02 ± 0.03 ^a	305.8 ± 9.3 ^b	71.3 ± 10.4 ^a
50°C	6.1 ± 0.6 ^a	0.285 ± 0.036 ^a	4.04 ± 0.02 ^a	283.2 ± 12.5 ^b	73.9 ± 11.7 ^a
60°C	5.2 ± 0.6 ^a	0.215 ± 0.042 ^a	4.11 ± 0.05 ^b	256.9 ± 30.1 ^a	76.4 ± 9.8 ^a
valor p	< 0.05	< 0.05	< 0.01	< 0.01	0.35

*Base seca. Promedio ± desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%. Los valores de humedad y actividad de agua del polen fresco no fueron incluidos en el análisis estadístico debido a su notoria diferencia con los pólenes tratados.

Excepto por unos pocos trabajos que mencionan los cambios bioquímicos que el polen sufre dentro de la colmena en su proceso de conversión a pan de abejas (Čeksterytė *et al.*, 2008), la acidez del polen ha sido rara vez evaluada. Por ejemplo, Fuenmayor *et al* reportaron la acidez del polen de ocho países diferentes y los valores oscilaron desde 196 meq/kg para polen español hasta 383 meq/kg para polen indio; además de este último, los pólenes polacos, chinos y búlgaros tuvieron un valor de acidez mayor a 300 meq/kg (Fuenmayor *et al.*, 2014), intervalo en el que también se encuentran los resultados de este trabajo. Adicionalmente, se puede observar como a medida que la temperatura de secado aumenta, el pH y la acidez se acercan hasta igualar estadísticamente a los reportados para el polen fresco. El incremento en la acidez y la reducción en el pH que se muestran a temperaturas de secado menores a 60°C podrían evidenciar la acción de microorganismos alteradores que como se discutió anteriormente tienen una población mayor a medida que la temperatura disminuye.

La digestibilidad de la proteína del polen fresco tuvo un valor promedio de 65.8 ± 10.1 g / 100 g, y estadísticamente no se encontró un efecto de la temperatura de secado sobre ésta medición. Los tratamientos térmicos en los alimentos generalmente tienen influencias tanto benéficas como adversas sobre la digestibilidad de la proteína. Los efectos benéficos incluyen el desdoblamiento de las proteínas, mientras que como adversos se cuentan la agregación de proteínas, la disminución de la solubilidad debido a la deformación de la estructura terciaria, la hidrólisis enzimática y la inducción de la

glucosilación de aminoácidos cuando hay azúcares presentes, ocasionando la reacción de Maillard (Tang *et al.*, 2009). Esto sucede en otras matrices alimentarias como leche o huevos, donde el tratamiento térmico es necesario para disminuir el riesgo de contaminación microbiológica, sin embargo en este caso no ocurrió. Este resultado podría estar influenciado por la poca acción de la temperatura de secado sobre la estructura del polen, la rígida esporopolenina no sufrió mayores alteraciones con las temperaturas empleadas en el secado, con lo cual pudo haber ocasionado que la digestibilidad no fuera modificada.

Tabla 2-12. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen seco y comparación con polen fresco *

	Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	Carotenoides totales (mg β - caroteno/kg)	Flavonoides totales (mg Quercetina/g)	FRAP (μ mol TROLOX/g)	TEAC (μ mol TROLOX/g)
Fresco	15.0 \pm 2.1 ^a	684.5 \pm 82.8 ^b	4.99 \pm 1.79 ^a	58.5 \pm 15.6 ^a	60.8 \pm 9.9 ^a
40°C	23.5 \pm 2.5 ^b	583.1 \pm 54.0 ^a	7.42 \pm 0.53 ^b	82.5 \pm 14.1 ^b	68.7 \pm 8.3 ^a
50°C	23.1 \pm 2.8 ^b	549.6 \pm 68.0 ^a	7.40 \pm 0.33 ^b	78.1 \pm 10.0 ^b	67.3 \pm 8.9 ^a
60°C	23.2 \pm 2.3 ^b	521.8 \pm 84.4 ^a	7.70 \pm 0.37 ^b	87.2 \pm 15.6 ^b	70.3 \pm 9.7 ^a
valor p	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.08

*Base seca. Promedio \pm desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.

Por otra parte, se observó un incremento en los valores de compuestos fenólicos y flavonoides en comparación al polen fresco, sin embargo la temperatura de secado no tuvo un efecto significativo. El contenido de fenoles totales del polen seco, con valores que oscilaron entre 23.10 y 23.50 mg GAE/g, es comparable al polen argelino (21.90 - 26.68 mg GAE /g), polen brasilero (19.28 - 48.90 mg GAE /g) o polen austriaco (24.6 mg GAE /g) (Kroyer and Hegedus, 2001; Carpes *et al.*, 2009; Rebiai and Lanez, 2012). El contenido de flavonoides del polen seco osciló entre 7.42 a 7.70 mg QE/g, lo cual lo hace comparable al reportado por Carpes *et al.* para polen brasilero (8.92 \pm 0.55 mg QE/g) (Carpes *et al.*, 2009).

Como se comentó previamente, la estructura del polen contiene la mayoría de los compuestos fenólicos y flavonoides en su capa externa. El Altiplano Cundiboyacense está localizado en una zona de radiación UV alta debido a su proximidad a la línea ecuatorial y al rango de altitud que alcanza esta región; esto explica los altos valores de compuestos bioactivos del polen estudiado, ya que se ha reportado que el polen usualmente contiene más compuestos fenólicos y una mayor actividad antioxidante cuando es recolectado en zonas de alta montaña (Stanley and Linskens, 1974; LeBlanc *et al.*, 2009).

En contraste a los resultados de polifenoles y flavonoides, el contenido de carotenoides del polen seco tuvo una reducción significativa en comparación al polen fresco, sin embargo, no hay diferencias significativas entre los pólenes secos a las tres temperaturas evaluadas. Los carotenoides son intermediarios o precursores de la vitamina A para los humanos y otros mamíferos y son altamente sensibles al oxígeno y la luz (Barajas *et al.*, 2012). Barajas *et al.* (2012) encontraron diferencias significativas entre el contenido de carotenos del polen fresco y seco cuando emplearon temperaturas superiores a 45°C, lo cual se asemeja a lo encontrado en este trabajo en el que se observa que desde 30°C ya existe una reducción en los valores reportados. Además de los carotenoides, estudios recientes muestran que existen pérdidas de vitaminas después del secado de polen tanto a 32°C como a 42°C, que pueden llegar en promedio a ser del 31%, para las vitaminas A, E y C (Oliveira, 2006; Campos *et al.*, 2010).

En los resultados de actividad antioxidante, el método FRAP mostró un incremento significativo en los valores de hasta un 50% en el polen seco comparado con el fresco: la actividad FRAP del polen paso de 58.5 ± 15.6 (fresco) a 87.2 ± 15.6 $\mu\text{mol Trolox/g}$ con un secado a 60°C, mientras que mediante el método TEAC no se encontraron diferencias significativas. A pesar de la reducción del contenido de carotenoides entre el polen fresco y seco, la medición de la actividad antioxidante fue mayor en los pólenes secos que en el fresco, esto podría ser explicado en parte debido a la fuerte capacidad antioxidante de los polifenoles a causa de sus propiedades redox, lo cual puede jugar un papel importante en la neutralización de radicales libres, la eliminación de oxígeno o la descomposición de peróxidos (Nijveldt *et al.*, 2001; Aličić *et al.*, 2014).

Los resultados de FRAP y TEAC, a pesar de ser tan diferentes, indican que los extractos de polen no pueden ser evaluados por sólo un método debido a la compleja naturaleza de sus constituyentes, condiciones específicas de reacción y mecanismos de acción (Mărghitaș *et al.*, 2009), como lo muestran investigaciones recientes que encontraron diferencias entre los valores de actividad antioxidante de una misma muestra cuando fueron medidas con métodos diferentes (Sakanaka and Ishihara, 2008; Mărghitaș *et al.*, 2009; Aličić *et al.*, 2014).

El incremento en los valores de flavonoides y compuestos fenólicos, y la reducción de carotenoides sugiere un debilitamiento en la capa de exina, liberando compuestos previamente ligados, que obviamente no pudieron ser medidos previamente. Esto también podría estar relacionado a la disminución del contenido de carotenoides, los cuales eventualmente luego de su liberación son degradados por efecto de la temperatura.

Por otra parte, se realizó un perfil de aminoácidos y ácidos grasos a las muestras de polen fresco y seco, cuyos resultados son presentados en el Anexo B. Quince aminoácidos fueron cuantificados, siendo los más abundantes prolina y ácido glutámico. Igualmente, se encontró que un proceso de secado a 60°C reduce los niveles de histidina y arginina hasta en 19%, lisina en 32% y prolina en 34%. En cuanto al perfil de ácidos grasos, se cuantificaron siete ácidos grasos en las muestras, de los cuales el láurico,

palmítico, linoleico y α -linolénico están en una cantidad mayor al 2% de los ácidos grasos totales. Los resultados mostraron ligeras reducciones de los ácidos grasos saturados palmítico (6%) y esteárico (29%) con el aumento de la temperatura de secado, mientras que en los insaturados hay un incremento de ácido oléico (39%).

En síntesis, con base en los resultados estructurales, microbiológicos y fisicoquímicos se puede inferir que las temperaturas de secado no son suficientes para lograr una ruptura de la exina del polen, a pesar de ello, tanto el TGA como el DSC muestran que sí se logra algún tipo de modificación de la estructura. El incremento del contenido de compuestos fenólicos y flavonoides y la disminución del contenido de carotenoides pueden estar ligados precisamente a esa modificación, ya que como se comentó previamente la esporopolenina está constituida de compuestos fenólicos y carotenoides, que, en el caso de los fenoles pudieron ser cuantificados, mientras que en los carotenoides, fueron degradados por causa de la temperatura. A su vez, la liberación de estos compuestos fenólicos ocasionó un incremento en la capacidad antioxidante medida por FRAP y TEAC.

Los mayores contenidos de compuestos bioactivos fueron encontrados en el secado a 60°C, que a su vez también fue el tratamiento que obtuvo los valores más altos de entalpía por DSC; en adición, este tratamiento disminuyó considerablemente la carga microbiológica del polen.

2.3.2.2. Esterilización

2.3.2.2.1. Efecto de la esterilización sobre la estructura del polen

Análisis Termogravimétrico y Calorimetría Diferencial de Barrido

Inicialmente, la curva termogravimétrica es presentada en la Figura 2-7. Al igual que en secado, la pérdida de peso ocurre en dos etapas. La primera pérdida, debido a la eliminación del agua, ocurre a temperaturas entre 46 y 48°C mientras que la segunda pérdida a temperaturas entre 173 y 176°C. En ambos casos se observa que las temperaturas de los picos de los pólenes estériles tienden a ser menores que las de polen fresco, lo cual puede ser un indicador de modificaciones estructurales, que a su vez alteran las interacciones moleculares en el polen. Como ya fue mencionado en el secado, aparecen diversos eventos que ocurren simultáneamente y que son los causantes de la alteración tanto de la temperatura del pico como del porcentaje de pérdida de peso (ver Tabla 2-13). Dentro de la búsqueda de referencias bibliográficas no se han encontrado reportes en los que se hubiera realizado un trabajo similar.

En el primer pico se observa que los pólenes tienen una pérdida de peso cercana al 20%. A diferencia del secado, la esterilización no remueve mayor cantidad de agua de la muestra, con lo cual era de esperar que el agua libre presente en todas las muestras

fuera similar. El segundo pico aparece a temperaturas entre 173 y 175°C, en la que se observa que la menor temperatura del pico se encuentra con la esterilización a 15 minutos. Este tratamiento también es el que mayor pérdida de peso reporta con casi un 24%. En comparación a los tratamientos de secado, la esterilización degrada un poco más la exina del polen, comparativamente, basado en el incremento de la pérdida de peso.

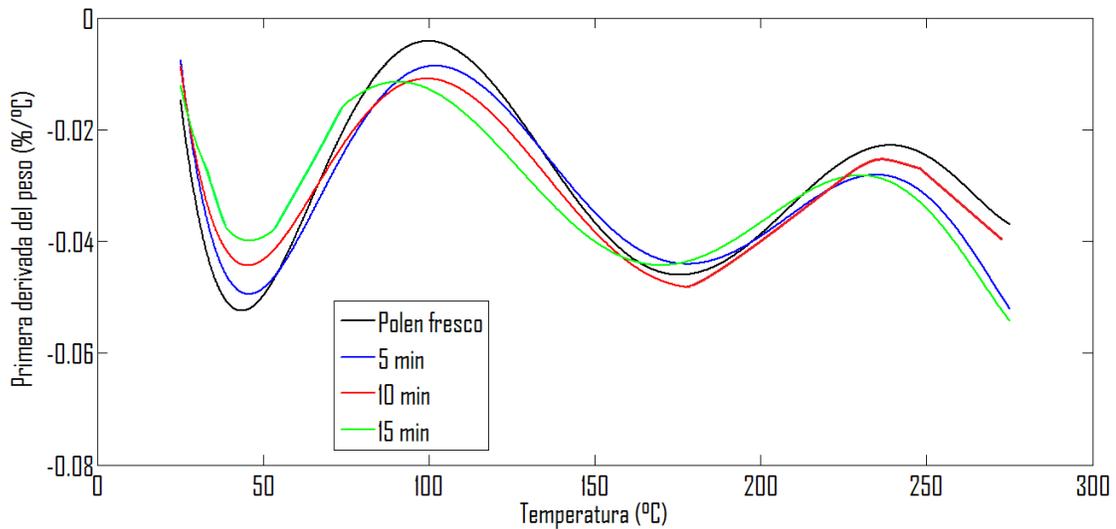


Figura 2-7. Gráfica de DTG para polen fresco y estéril

Tabla 2-13. Resultados de temperatura de pico y masa perdida del polen sometido a esterilización

Producto	Primer pico		Segundo pico	
	Temperatura (°C)	Integración del pico (% masa pérdida)	Temperatura (°C)	Integración del pico (% masa pérdida)
Polen húmedo	48.57	22.90	175.53	21.74
5 min	47.76	21.41	176.05	23.06
10 min	46.64	20.72	175.55	23.18
15 min	46.48	19.55	173.97	23.87

Por otra parte, el análisis de DSC mostró un pico endotérmico entre 150°C y 160°C (ver Figura 2-8). Este resultado y la obtención de los valores de entalpía (ver Tabla 2-14), permiten inferir que el tiempo de esterilización influye notablemente en la modificación estructural del polen. Las entalpías del polen estéril a 10 y 15 minutos son mayores que las reportadas para polen seco, lo que evidenciaría un efecto sobre la degradación de la exina mucho más drástica. Partiendo nuevamente del concepto descrito en el análisis de la estructura del polen sometido a secado, la degradación de la exina favorece el proceso

endotérmico de craqueo con lo que hay un mayor consumo de energía que alcanza un máximo a temperaturas entre 155 y 160°C; por lo tanto, es posible inferir que la esterilización a 15 minutos ocasiona una mayor degradación de la exina, con respecto a los demás tratamientos térmicos llevados a cabo. Una vez se alcanzan los 175°C, los compuestos de menor peso molecular se volatilizan, con lo que la muestra pierde peso.

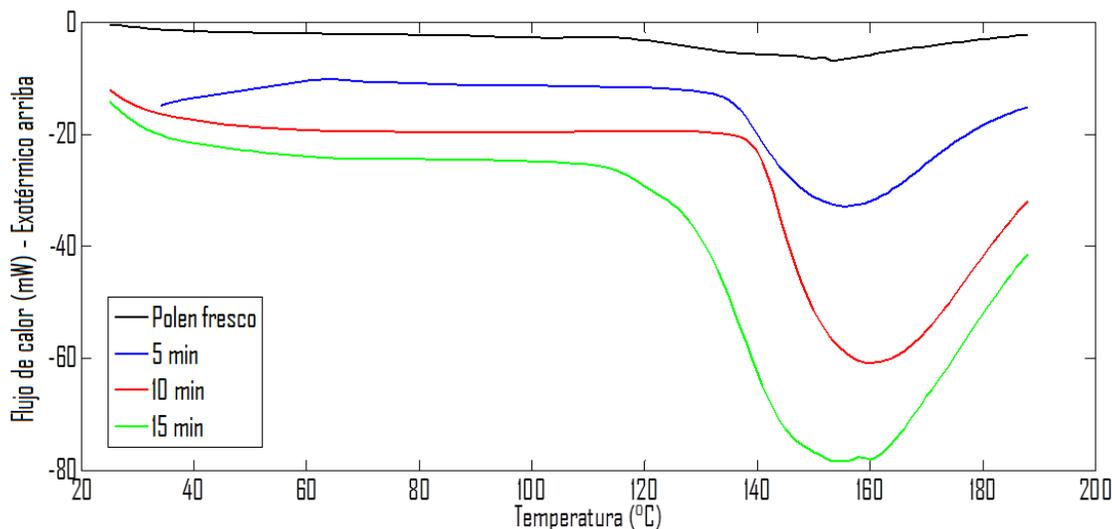


Figura 2-8. Gráfica de DSC para el polen fresco y estéril.

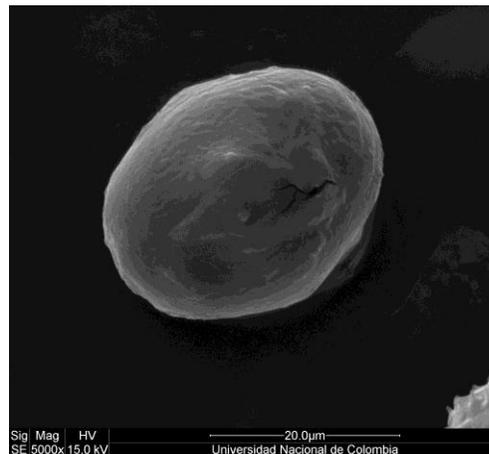
Tabla 2-14. Resultados de DSC para polen fresco y estéril

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen húmedo	153	17.5
5 min	157	55.6
10 min	160	100.4
15 min	155	192.5

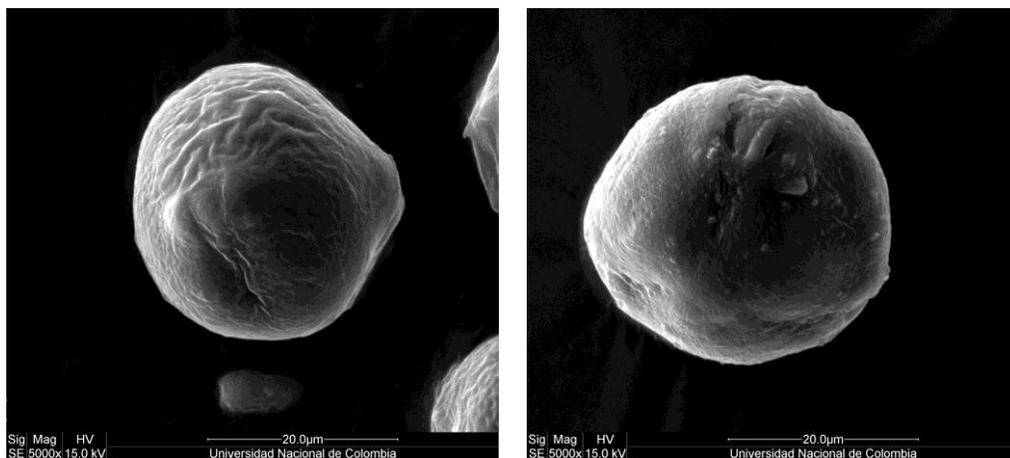
Nuevamente se encuentra una coherencia entre los resultados de TGA y DSC, en donde al igual que en el polen seco, se evidencia una modificación de la estructura del polen, no obstante, un proceso de esterilización a 15 minutos ejerce un efecto más notorio basado en los valores obtenidos de entalpía de los pólenes tratados térmicamente. Con base en que tanto TGA como DSC aportan información similar, los posteriores análisis de la estructura de polen se realizaron mediante DSC únicamente.

Microscopía Electrónica de Barrido

Con el fin de establecer una comparación visual del efecto del tratamiento en autoclave sobre la estructura del polen, se tomaron micrografías SEM, que son mostradas y descritas en la Figura 2-9. A los 5 minutos de tratamiento se observa un hinchamiento de los granos por efecto del calor húmedo, así como es notoria la pérdida de su forma característica. Se observa que con el incremento del tiempo de esterilización, el polen pasa de tener una estructura rugosa a lisa. A los 15 minutos se hace evidente la ausencia de rugosidades, quedando un grano completamente liso. Probablemente, la combinación de calor, tiempo y humedad dentro del autoclave favorece el debilitamiento de la exina en una proporción mayor que las condiciones de secado.



(a)



(b)

(c)

Figura 2-9. Micrografías SEM de seco. (a) 121°C, 5 min, (b) 121°C, 10 min, (c) 121°C, 15 min. Magnitud 5000X.

2.3.2.2.2. Efecto de la esterilización sobre la calidad microbiológica

Los resultados de esterilidad comercial mostraron una eliminación total de microorganismos en cada una de las condiciones probadas. No hubo crecimiento ni de microorganismos aeróbicos ni anaeróbicos a 35°C y 55°C. En el caso de polen, la esterilización puede ser usada en algunos casos como una etapa previa a los procesos biotecnológicos. Fuenmayor mencionó la necesidad de emplear un proceso de esterilización antes de la fermentación para asegurar un control del bioproceso, con el fin de prevenir la competencia por nutrientes entre microorganismos y el posible crecimiento de patógenos u hongos productores de aflatoxinas (Fuenmayor, 2009).

2.3.2.2.3. Efecto de la esterilización sobre las características fisicoquímicas

La caracterización fisicoquímica de los pólenes tratados en autoclave por 5, 10 y 15 min son mostrados en la Tabla 2-15. Como en el numeral anterior, todos los datos fueron evaluados estadísticamente por una prueba ANOVA. Además, en la Tabla 2-16 se presentan los resultados de los compuestos bioactivos y actividad antioxidante.

Tabla 2-15. Composición fisicoquímica promedio del polen tratado en autoclave y comparación con polen fresco

	Humedad (g/100g)	pH	Acidez * (meq/kg)	Digestibilidad* (g / 100g)
Fresco	20.4 ± 1.4 ^b	4.16 ± 0.07 ^a	245.6 ± 31.8 ^a	65.8 ± 10.1 ^a
5min	18.3 ± 0.4 ^a	4.19 ± 0.12 ^a	251.0 ± 30.0 ^a	66.8 ± 1.7 ^a
10min	18.1 ± 0.9 ^a	4.19 ± 0.13 ^a	251.7 ± 22.4 ^a	69.4 ± 8.2 ^a
15min	18.2 ± 0.7 ^a	4.12 ± 0.15 ^a	266.1 ± 29.7 ^a	69.4 ± 10.9 ^a
valor p	< 0.01	0.73	0.45	< 0.05

*Base seca. Promedio ± desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.

El polen tratado en autoclave a 121°C por los tres tiempos empleados (5, 10 y 15 minutos), mostró una ligera reducción en el contenido de humedad pasando de 20% a 18%, sin que haya un efecto significativo del tiempo de esterilización. Además, los valores de pH y acidez no difirieron entre las muestras, debido a la eliminación de los microorganismos presentes en el producto que podrían afectar sus características. Adicionalmente no se presentó una variación significativa en la digestibilidad luego del tratamiento. Al igual que en el secado, a pesar de lograrse un mayor debilitamiento de la esporopolenina en comparación al secado, pareciera que aún no es suficiente para alterar la estructura interna del grano, y por ende, no es posible incrementar la digestibilidad de proteína.

Tabla 2-16. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen tratado en autoclave y polen fresco*

	Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	Carotenoides totales (mg β- caroteno/kg)	Flavonoides totales (mg Quercetina/g)	FRAP (μmol TROLOX/g)	TEAC (μmol TROLOX/g)
Fresco	15.0 ± 2.1 ^a	684.5 ± 82.8 ^b	4.99 ± 1.79 ^a	58.5 ± 15.6 ^a	60.8 ± 19.9 ^a
5min	20.7 ± 1.0 ^b	504.9 ± 81.5 ^a	5.26 ± 0.19 ^a	75.8 ± 11.3 ^a	78.0 ± 17.4 ^a
10min	21.8 ± 0.6 ^b	483.5 ± 60.1 ^a	5.10 ± 0.44 ^a	71.2 ± 9.6 ^a	80.5 ± 17.3 ^a
15min	23.7 ± 0.7 ^b	404.5 ± 64.4 ^a	5.49 ± 0.59 ^a	73.8 ± 14.4 ^a	81.9 ± 38.3 ^a
valor p	< 0.01	< 0.01	0.52	0.31	0.51

*Base seca. Promedio ± desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.

En consideración al contenido de flavonoides totales no se evidenció un cambio significativo en comparación al polen fresco, ni con el tiempo de tratamiento. De forma contraria, el contenido de compuestos fenólicos, presentó un incremento significativo en el polen tratado en autoclave en comparación al polen fresco, en el cual el polen tratado durante 15 minutos presentó un valor significativamente mayor al resto. En cuanto a los carotenoides totales, se observa que ocurrió una disminución en su contenido una vez fue sometido al tratamiento térmico, sin embargo, no se observa una variación significativa con el tiempo de esterilización.

El calentamiento de matrices alimentarias a altas temperaturas, dependiendo de la complejidad de su composición, produce varios cambios químicos que podrían afectar la actividad antioxidante, uno es la pérdida de algunas de las sustancias con poder anti-radicalario (como tocoferoles y vitamina D) principalmente por reacciones oxidativas las cuales tienen un efecto en la actividad antioxidante global, y de otro lado, está la formación de compuestos que pueden contribuir a un incremento en esta propiedad como es el caso de aminoácidos y productos generados por la reacción de Maillard (como residuos histidina-azúcares) (Yilmaz and Toledo, 2005), por lo que en total la actividad antioxidante podría no cambiar. Precisamente este comportamiento es mostrado por la actividad antioxidante del polen tratado en autoclave (medida tanto por FRAP como TEAC) ya que no se dio una variación estadísticamente significativa, lo que concuerda con los hallazgos de Lee *et. al.* y Choi *et. al.* en los cuales el efecto de la pérdida de nutrientes lábiles es minimizado por el incremento en la capacidad antioxidante global cuando maníes y champiñones shiitake fueron tratados térmicamente, las cuales como el polen, son matrices alimentarias con estructuras vegetales complejas (Choi *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006a).

Un perfil de aminoácidos y ácidos grasos fue realizado sobre el polen estéril, cuyos resultados se presentan en el Anexo B. Una comparación de resultados con el polen fresco permite establecer, que al igual que en el secado, el tratamiento en autoclave

provocó una disminución en los aminoácidos histidina, arginina, lisina y prolina, sin embargo, en este tratamiento la disminución de estos aminoácidos fue mayor que en secado. Entre tanto, el perfil de ácidos grasos mostró una reducción de los ácidos grasos saturados laúrico, mirístico, palmítico y esteárico. Un efecto similar ocurrió para los ácidos grasos insaturados, en particular los ácidos linoléico y linolénico.

Los resultados obtenidos mediante el análisis de la estructura y composición fisicoquímica muestran que se logró una degradación de la exina en mayor proporción que en el secado, así como una mayor liberación de los compuestos fenólicos. Mientras los compuestos fenólicos, más estables a la temperatura, incrementaron su valor, los carotenoides fueron gradualmente degradados encontrándose en menor nivel que en el polen fresco. El análisis estadístico mostró que los valores de actividad antioxidante y digestibilidad no tuvieron diferencias significativas con el polen fresco. Los resultados de esterilidad comercial fueron satisfactorios, con lo que tratamientos desde 5 min son efectivos para eliminar toda la carga microbiológica que podría alterar el alimento.

2.3.2.3. Tratamiento combinado secado - esterilización

Se realizaron ensayos de tratamientos térmicos combinados sometiendo inicialmente el polen a secado a tres temperaturas (40°C, 50°C y 60°C), y luego a tratamiento en autoclave a 121°C empleando tres tiempos (5, 10 y 15 min). El efecto del tratamiento combinado fue analizado a través de la evaluación de la variación en la estructura del grano, parámetros fisicoquímicos y calidad microbiológica.

2.3.2.3.1. Efecto del tratamiento combinado secado - esterilización sobre la estructura del polen

Calorimetría Diferencial de Barrido

Las Figuras 2-10 a 2-12 presentan los resultados de DSC para los tratamientos secado-esterilización a 5, 10 y 15 min, respectivamente.

En estas figuras se puede observar una diferencia entre el comportamiento del polen fresco y los pólenes tratados térmicamente. Estos tratamientos combinados, al igual que en los tratamientos independientes de secado y esterilización, muestran un pico endotérmico a temperaturas entre los 133 y 153°C como es mostrado en la Tabla 2-17. En todos los casos, la temperatura del pico fue inferior a la registrada para el polen fresco, siendo un indicador de modificación de la estructura y de una mayor inestabilidad térmica, por los fenómenos que ya han sido descritos previamente.

En la Figura 2-10 se presentan los resultados del tratamiento combinado de secado a 40°C, 50°C y 60°C con una posterior esterilización de 5 min. En ésta gráfica se observa

un pico de flujo de calor a temperaturas entre 135°C y 143°C, siendo más alta para el tratamiento de 60°C - 5 min que a su vez tuvo la entalpía más alta. La entalpía de los tratamientos combinados fue mayor que la encontrada previamente en el polen fresco y polen seco. Así mismo la entalpía de los tratamientos combinados es mayor a la reportada en el tratamiento de esterilización a 5 min, lo cual es un indicador que los dos tratamientos realizados en el polen de manera conjunta ejercieron una mayor degradación del polen que los procesos individuales.

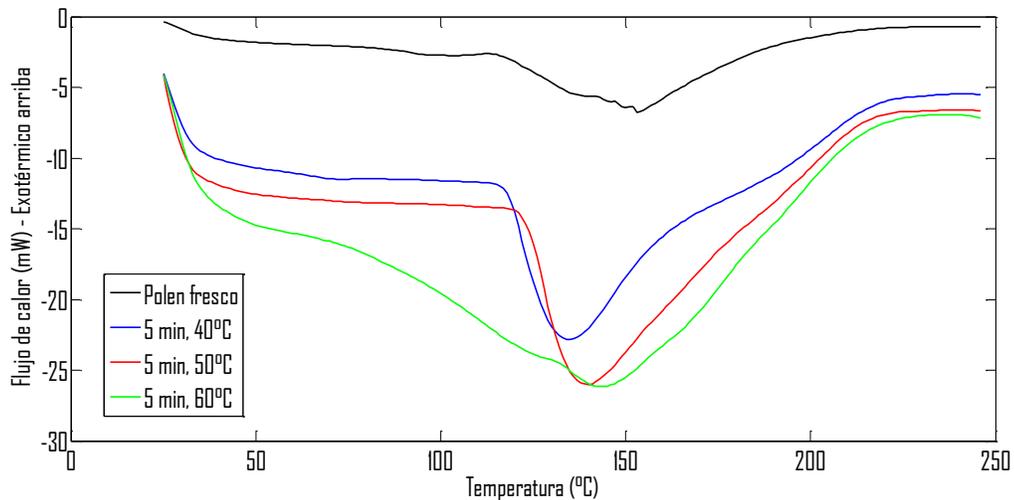


Figura 2-10. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado secado-esterilización a 40, 50 y 60°C, con 5 min.

Algo similar es obtenido en el tratamiento combinado de secado a 40°C, 50°C y 60°C con una posterior esterilización de 10 min (ver Figura 2-11). En este caso, el rango de temperatura donde ocurre el pico de flujo de calor se encuentra entre 138°C y 141°C, siendo el tratamiento de 60°C - 10 min el que a su vez tuvo la entalpía más alta. En este caso se observa que el tiempo de esterilización influye en la degradación de la esporopolenina, ya que los valores de entalpía encontrados en estos tratamientos son mayores con respecto al tratamiento combinado secado-esterilización con 5 min.

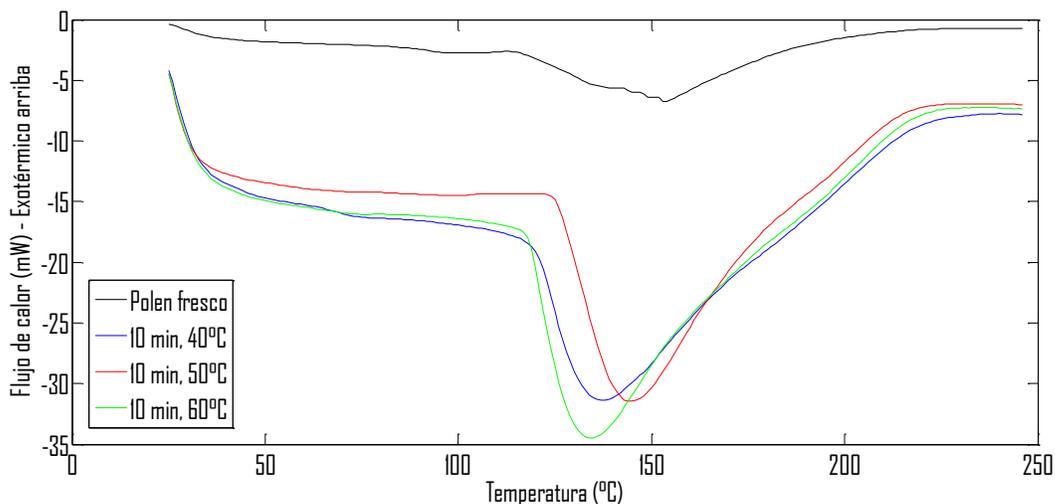


Figura 2-11. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado secado-esterilización a 40, 50 y 60°C, con 10 min.

Finalmente, en la Figura 2-12 se presentan los resultados de DSC para el tratamiento combinado de secado a 40°C, 50°C y 60°C con una posterior esterilización de 15 min. El rango de temperatura donde ocurre el pico de flujo de calor se encuentra entre 133°C y 140°C, siendo el tratamiento de 60°C - 15 min el que a su vez tuvo la entalpía más alta. En comparación con los resultados de los tratamientos térmicos secado-esterilización a 5 y 10 minutos, los tratamientos secado-esterilización a 15 minutos tienen entalpías ligeramente mayores.

Por otra parte, se destaca que el tratamiento de esterilización individual durante 15 minutos mostró un valor de entalpía más alto que los obtenidos en estos procesos combinados de secado-esterilización a cualquier condición, así como una menor temperatura del pico, los cuales son indicadores de un mayor debilitamiento de la exina en comparación a los demás tratamientos. Una posible explicación a lo sucedido, es que al emplear inicialmente el secado se retira del polen una cantidad importante de agua, y el proceso de esterilización sobre este polen seco sería menos efectivo en cuanto al debilitamiento de la exina; en consideración, algunos reportes mencionan que el agua influye positivamente sobre la eficiencia de la transferencia de calor conductiva (Sablani and Rahman, 2003).

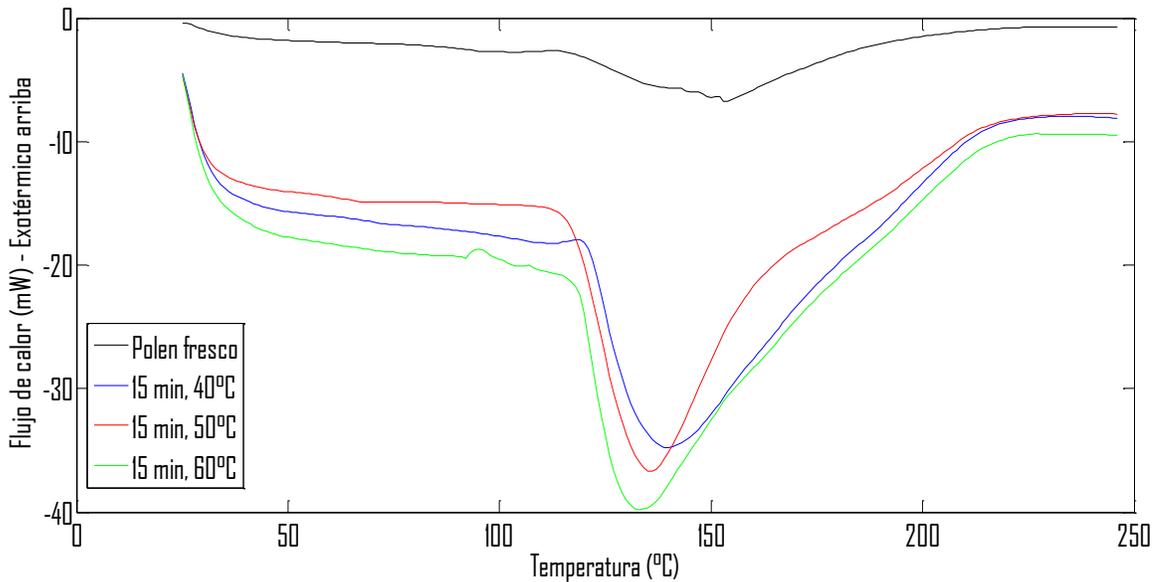


Figura 2-12. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado secado-esterilización a 40, 50 y 60°C, con 15 min.

Tabla 2-17. Resultados de DSC para polen fresco y sometido a un proceso combinado secado-esterilización

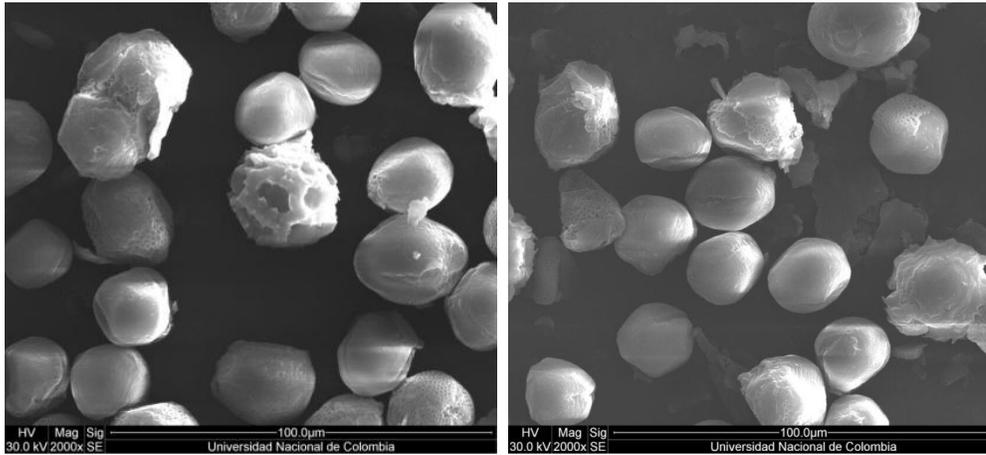
Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen húmedo	153	17.5
40°C - 5 min	135	70.2
50°C - 5 min	140	80.8
60°C - 5 min	143	108.5
40°C - 10 min	141	100.1
50°C - 10 min	147	96.4
60°C - 10 min	138	110.7
40°C - 15 min	140	100.6
50°C - 15 min	136	115.7
60°C - 15 min	133	125.1

Microscopía electrónica de barrido

En las Figuras 2-13 a 2-15 se presentan algunas micrografías de los tratamientos combinados secado-esterilización a 40°C, 50°C y 60°C, respectivamente.

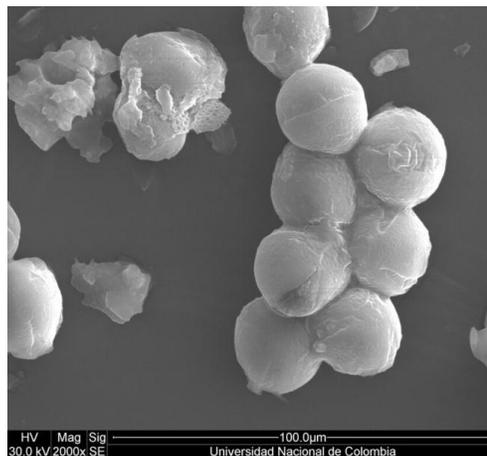
En este caso, los tratamientos de secado-esterilización a 40°C a 5, 10 y 15 min parecieran no alcanzar un efecto apreciable sobre el rompimiento de los granos de polen (ver Figura 2-13), siendo posible aún observar los diferentes morfotipos presentes en la muestra. Algo similar sucede en los tratamientos a 50°C a 5 y 10 min (ver Figura 2-14), no obstante, a 15 min se puede observar que los granos adquieren una textura lisa similar a la encontrada en la esterilización, algo que es posible observar también en los

tratamientos a 60°C a 5, 10 y 15 min (ver Figura 2-15). Estos resultados son coherentes a los hallazgos encontrados por DSC, a partir de los cuales se puede inferir que la combinación de tratamientos secado-esterilización no ejerce una modificación en la estructura del polen de manera apreciable, en particular si es comparado con la esterilización.



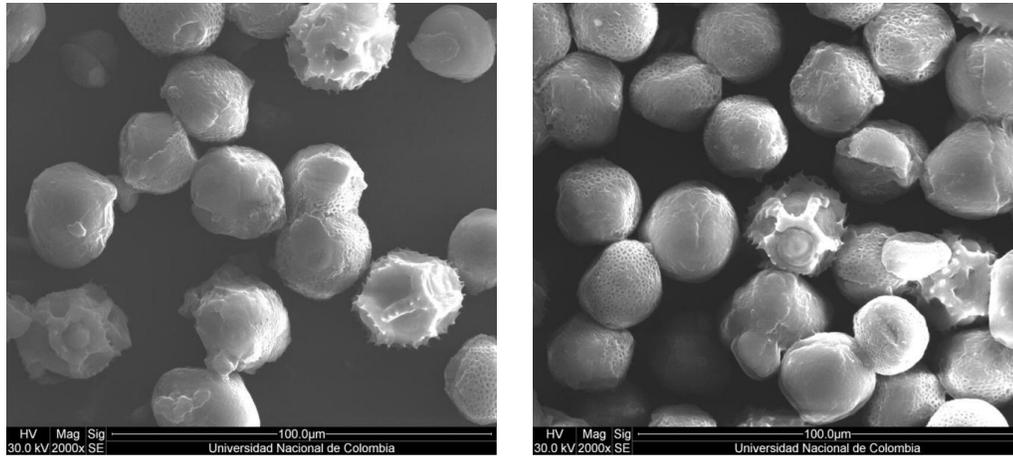
(a)

(b)



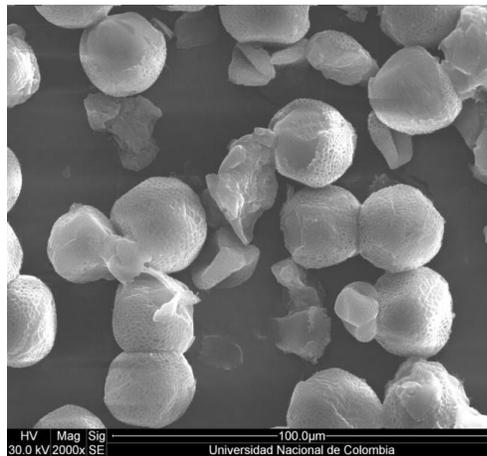
(c)

Figura 2-13. Micrografías SEM para tratamientos combinados secado-esterilización de polen. Magnitud 2000X. (a) 40°C, 5 min (b) 40°C, 10 min y (c) 40°C, 15 min



(a)

(b)



(c)

Figura 2-14. Micrografías SEM para tratamientos combinados secado-esterilización de polen. Magnitud 2000X. (a) 50°C, 5 min (b) 50°C, 10 min y (c) 50°C, 15 min

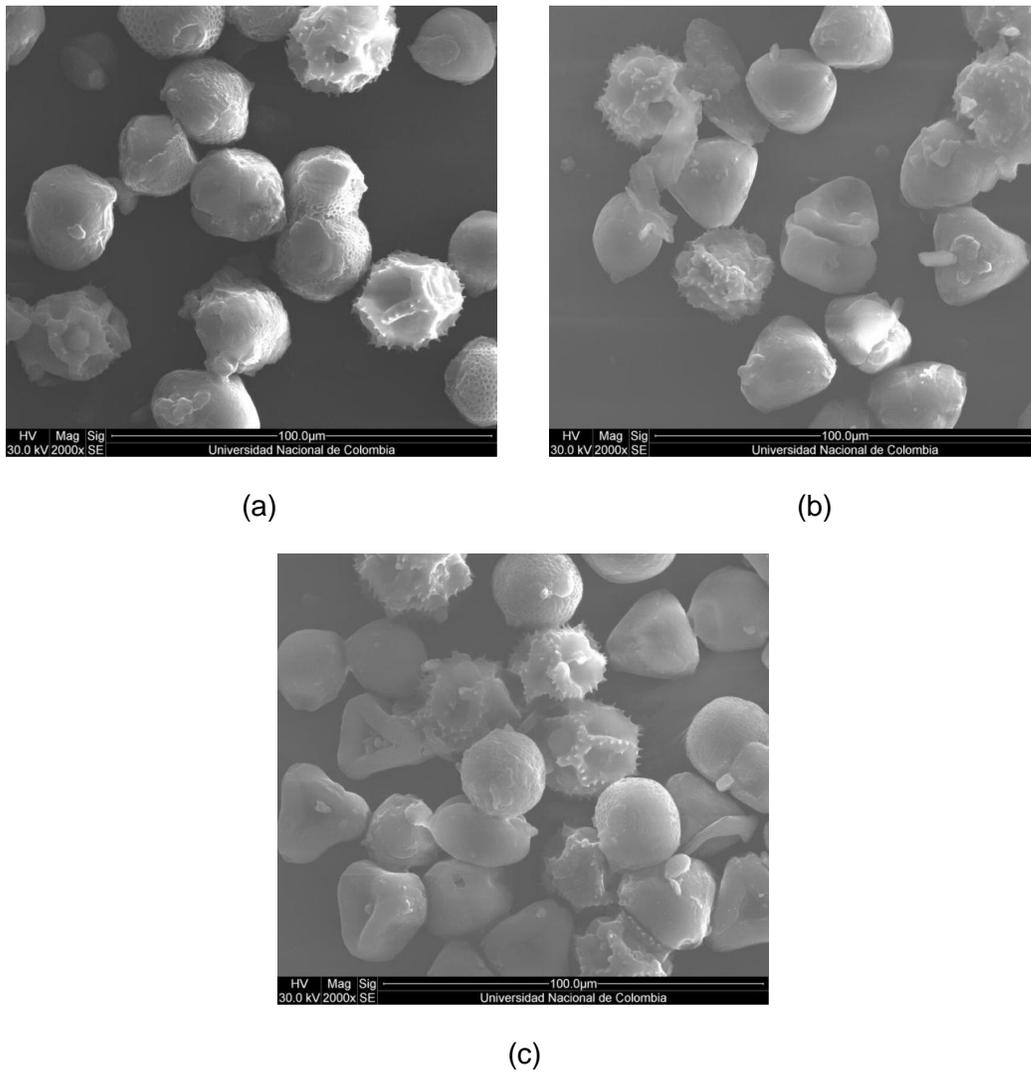


Figura 2-15. Micrográficas SEM para tratamientos combinados secado-esterilización de polen. Magnitud 2000X. (a) 60°C, 5 min (b) 60°C, 10 min y (c) 60°C, 15 min

2.3.2.3.2. Efecto del tratamiento combinado secado - esterilización sobre las características microbiológicas

Con la realización de tratamientos térmicos combinados, no solamente se deseaba observar el efecto de estos sobre las características estructurales, también es importante analizar su efecto en la reducción de la carga microbiológica. En la Tabla 2-18 se presentan los resultados de la prueba de esterilidad comercial de las muestras de polen sometidas a un tratamiento de secado - esterilización.

Los resultados obtenidos muestran que una vez sometido a secado el polen, solamente se alcanza un nivel satisfactorio de esterilidad cuando se realiza un proceso de

esterilización durante 15 minutos, a diferencia de los tratamientos independientes de esterilización con polen húmedo, los cuales fueron satisfactorios para todos los tiempos tratados. Esto confirma que el secado a temperaturas cercanas a 40°C promueve el crecimiento de microorganismos y solamente mediante un proceso de esterilización pueden ser eliminados. Los resultados alcanzados permiten formular la hipótesis que el contenido de agua disponible en el grano podría tener influencia en la capacidad del tratamiento para la eliminación de microorganismos, dado que en estos casos se necesitó de un mayor tiempo en autoclave para lograr las condiciones de esterilidad.

Tabla 2-18. Resultados de pruebas de esterilidad comercial a muestras de polen con tratamiento combinado secado - esterilización

Condiciones		Resultado
Secado (°C)	Esterilización (min)	
40	5	No Satisfactorio
40	10	No Satisfactorio
40	15	Satisfactorio
50	5	No Satisfactorio
50	10	No Satisfactorio
50	15	Satisfactorio
60	5	No Satisfactorio
60	10	No Satisfactorio
60	15	Satisfactorio

2.3.2.3.3. Efecto del tratamiento combinado secado - esterilización sobre las características fisicoquímicas

Los resultados de composición fisicoquímica son presentados en la Tabla 2-19. En todas las variables estudiadas, excepto digestibilidad, el Análisis de Varianza presentó diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.05$). En lo que respecta al contenido de humedad, se hace evidente que el secado reduce la cantidad de agua disponible en la matriz, igualmente, a medida que el secado es más fuerte la esterilización hace que se recupere proporcionalmente más humedad. El ambiente dentro del autoclave, rico en humedad, es favorable para que el polen absorba algo de agua, considerando que este es un producto altamente higroscópico (Medina *et al.*, 2004).

Por otra parte, el valor medido de pH osciló entre valores promedio de 4.03 y 4.29. Se observó que los valores significativamente más bajos de pH se encuentran en los tratamientos en autoclave a 15 min, sin importar la temperatura, lo que podría deberse a una liberación de ácidos grasos. Este hecho ya había sido observado en los ensayos de tratamiento de esterilización únicamente, en donde a medida que se incrementa el tiempo la acidez se incrementó con el consecuente descenso en el pH. También se observa que a temperaturas de secado más bajas, el contenido de acidez es mayor, pasando de un promedio máximo de 296.0 meq/kg a 40°C a 265.4 meq/kg a 60°C. Esto

también había sido observado en los ensayos de secado, y como se comentó previamente, puede deberse a alteraciones de orden microbiológico.

Tabla 2-19. Composición fisicoquímica promedio del polen con tratamiento combinado secado-esterilización y comparación con polen fresco

Condiciones		Humedad (g/100g)	pH	Acidez * (meq/kg)	Digestibilidad* (g / 100g)
Secado (°C)	Esterilización (min)				
	Fresco	20.4 ± 1.4	4.16 ± 0.07 ^b	245.6 ± 31.8 ^{ab}	65.8 ± 10.1 ^a
40	5	7.4 ± 0.6 ^d	4.21 ± 0.12 ^{ab}	287.9 ± 4.5 ^c	68.3 ± 3.3 ^a
40	10	8.1 ± 1.1 ^{de}	4.16 ± 0.15 ^a	294.5 ± 5.9 ^c	69.8 ± 4.8 ^a
40	15	8.8 ± 0.7 ^e	4.03 ± 0.09 ^a	296.0 ± 37.9 ^{bc}	71.8 ± 8.6 ^a
50	5	5.8 ± 0.6 ^c	4.26 ± 0.13 ^b	266.0 ± 5.8 ^b	70.3 ± 7.6 ^a
50	10	6.4 ± 0.2 ^c	4.22 ± 0.11 ^{ab}	266.9 ± 3.5 ^b	71.7 ± 6.4 ^a
50	15	8.0 ± 0.9 ^{de}	4.06 ± 0.14 ^a	279.9 ± 19.2 ^{bc}	73.4 ± 5.9 ^a
60	5	3.7 ± 0.3 ^a	4.29 ± 0.12 ^b	246.8 ± 7.0 ^a	70.3 ± 6.0 ^a
60	10	4.7 ± 0.3 ^b	4.21 ± 0.12 ^{ab}	253.2 ± 13.9 ^{ab}	71.5 ± 10.5 ^a
60	15	6.0 ± 0.3 ^c	4.11 ± 0.16 ^a	265.4 ± 13.4 ^{ab}	73.4 ± 2.4 ^a
<i>valor p</i>		< 0.05	< 0.05	< 0.05	0.26

*Base seca excepto humedad. Promedio ± desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%. El valor de humedad del polen fresco no fue incluido en el análisis estadístico debido a su notoria diferencia con los pólenes tratados.

Entre tanto, los resultados de compuestos bioactivos y actividad antioxidante son mostrados en la Tabla 2-20. Se encontraron diferencias significativas en todos los tratamientos ($p < 0.05$), excepto en el contenido de compuestos fenólicos. En cuanto al contenido de carotenoides totales, como se esperaba su valor descendió significativamente entre mayor tiempo de esterilización y mayor temperatura de secado, pasando de un promedio de 684.5 mg β -caroteno/kg en el polen fresco a 412.6 mg β -caroteno/kg en polen secado a 60°C y con 15 minutos en autoclave.

La actividad antioxidante medida por las técnicas FRAP y TEAC muestra una tendencia hacia el incremento de la capacidad antioxidante conforme se incrementa la temperatura de secado, así mismo se observa un ligero aumento con el tiempo de tratamiento en autoclave. Los valores promedio más altos en ambas técnicas fueron alcanzados a 60°C (68.3 y 84.9 $\mu\text{mol Trolox/g}$). A pesar de encontrarse ligeras variaciones en los resultados de actividad antioxidante entre los tratamientos independientes con respecto al tratamiento combinado, no es claro que al realizar los dos tratamientos sobre el polen se favorezca la extracción de compuestos bioactivos.

Tabla 2-20. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen con tratamiento combinado secado-esterilización y polen fresco*

Condiciones		Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	Carotenoides totales (mg β - caroteno/kg)	Flavonoides totales (mg Quercetina/ g)	FRAP (μ mol TROLOX/g)	TEAC (μ mol TROLOX/g)
Seca do (°C)	Esteriliz ación (min)					
	Fresco	15.0 \pm 2.1 ^a	684.5 \pm 82.8 ^c	4.99 \pm 1.79 ^{ab}	58.5 \pm 15.6 ^{ab}	60.8 \pm 19.9 ^{abc}
40	5	16.8 \pm 1.5 ^a	668.9 \pm 113.4 ^c	5.58 \pm 0.24 ^{ab}	52.8 \pm 1.2 ^a	51.6 \pm 3.3 ^a
40	10	16.7 \pm 0.7 ^a	639.7 \pm 33.1 ^c	5.79 \pm 0.26 ^b	55.2 \pm 4.1 ^a	57.5 \pm 2.3 ^b
40	15	16.9 \pm 0.4 ^a	619.2 \pm 33.0 ^c	5.49 \pm 0.17 ^{ab}	57.1 \pm 3.8 ^a	60.2 \pm 2.0 ^{bc}
50	5	16.5 \pm 1.3 ^a	584.4 \pm 25.6 ^c	5.16 \pm 0.10 ^a	61.8 \pm 4.7 ^{ab}	64.8 \pm 6.4 ^{bc}
50	10	16.4 \pm 1.7 ^a	577.1 \pm 51.2 ^{bc}	5.44 \pm 0.31 ^{ab}	66.4 \pm 9.4 ^{ab}	65.5 \pm 5.2 ^{bc}
50	15	18.9 \pm 1.9 ^a	526.1 \pm 25.0 ^b	5.90 \pm 0.23 ^b	68.8 \pm 2.7 ^b	64.5 \pm 3.1 ^c
60	5	16.2 \pm 0.7 ^a	470.3 \pm 59.2 ^{ab}	5.22 \pm 0.16 ^a	66.4 \pm 4.8 ^b	82.4 \pm 1.3 ^d
60	10	17.0 \pm 1.1 ^a	460.8 \pm 46.5 ^{ab}	5.54 \pm 0.53 ^{ab}	65.9 \pm 2.0 ^b	84.2 \pm 1.3 ^d
60	15	17.3 \pm 1.6 ^a	412.6 \pm 63.9 ^a	5.57 \pm 0.14 ^{ab}	68.3 \pm 3.1 ^b	84.9 \pm 3.8 ^d
<i>valor p</i>		0.43	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

*Base seca. Promedio \pm desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.

Finalmente, para el contenido de flavonoides se encontraron valores superiores luego del tratamiento combinado, en comparación al polen fresco. A pesar que existen diferencias estadísticamente significativas entre algunos tratamientos, éstas probablemente se deban más a un hecho ocasionado en la baja varianza de los resultados más a que en realidad existan diferencias apreciables entre tratamientos, con lo cual es posible establecer que no hay cambios notorios en el contenido de flavonoides, de manera similar a lo ocurrido con el contenido de fenoles totales.

En resumen, a partir de la observación de los resultados de DSC y SEM es posible inferir que la temperatura de secado como el tiempo de esterilización de manera conjunta influyen de cierta manera una alteración de la esporopolenina, sin embargo, los resultados de entalpía no demuestran que esta combinación de tratamientos térmicos sea mejor que la esterilización por 15 min. En consecuencia, los resultados de compuestos bioactivos, digestibilidad y actividad antioxidante no reflejan un incremento significativo con respecto al polen fresco, con lo cual un tratamiento térmico realizado en el orden secado-esterilización no es el más efectivo para procesar polen. Los resultados microbiológicos sugieren que reducir el contenido de agua libre en el polen implica que la esterilización requiera de mayor tiempo para garantizar su efectividad en la eliminación de la carga microbiológica indeseable, dado que solamente con tratamientos por 15 min fue posible lograr resultados satisfactorios. Podría inferirse que al grano seco le toma

más tiempo alcanzar la temperatura de esterilización por la ausencia de agua y en consecuencia ejercería un efecto protector sobre estos microorganismos.

2.3.2.4. Tratamiento combinado esterilización - secado

Un segundo tratamiento combinado fue realizado mediante ensayos en autoclave, seguido de un secado con aire caliente, a las mismas condiciones mencionadas en el numeral 2.3.5.

2.3.2.4.1. Efecto del tratamiento combinado secado - esterilización sobre la estructura del polen

Calorimetría Diferencial de Barrido

A continuación se presentan los diagramas DSC para el tratamiento combinado esterilización-secado, en las Figuras 2-16 a 2-18. En la Figura 2-16 se observan los resultados de DSC para el proceso de esterilización a 5, 10 y 15 min y posterior secado a 40°C.

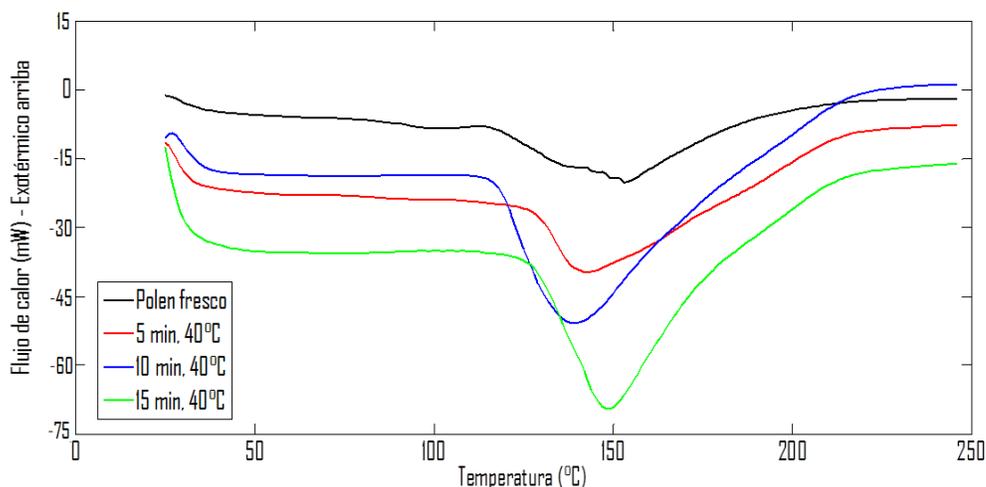


Figura 2-16. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado esterilización-secado a 5, 10 y 15 min, con 40°C.

Las temperaturas donde se presenta el pico máximo de flujo de calor se encuentra entre 139 y 149°C (ver Tabla 2-21), por debajo del nivel observado para el polen fresco. Los valores de entalpía muestran que el tratamiento de 15 min es el que alcanzó los niveles más altos. Una comparación con el tratamiento de esterilización muestra que las entalpías del proceso combinado a cualquier tiempo son mayores. Por otra parte, en

comparación al tratamiento combinado secado-esterilización, también se observan mayores valores, lo que podría mostrar que el contenido de agua en el polen sí favorece la degradación de la exina, en particular cuando la esterilización es empleada como el primer tratamiento.

Ahora, en la Figura 2-17 se observan los resultados de DSC para el proceso de esterilización a 5, 10 y 15 min y posterior secado a 50°C. En estos tratamientos, las temperaturas donde se presenta el pico máximo de flujo de calor se encuentra entre 152 y 158°C con la mayor entalpía en el tratamiento a 15 min. En comparación a los tratamientos descritos en la Figura 2-16, se observa que el incremento en la temperatura de secado tiende a aumentar la entalpía reportada para cada tratamiento. Es así que se puede inferir que se logra una mayor de degradación de la exina cuando se emplean mayores tiempos de esterilización y temperaturas de secado en un tratamiento combinado.

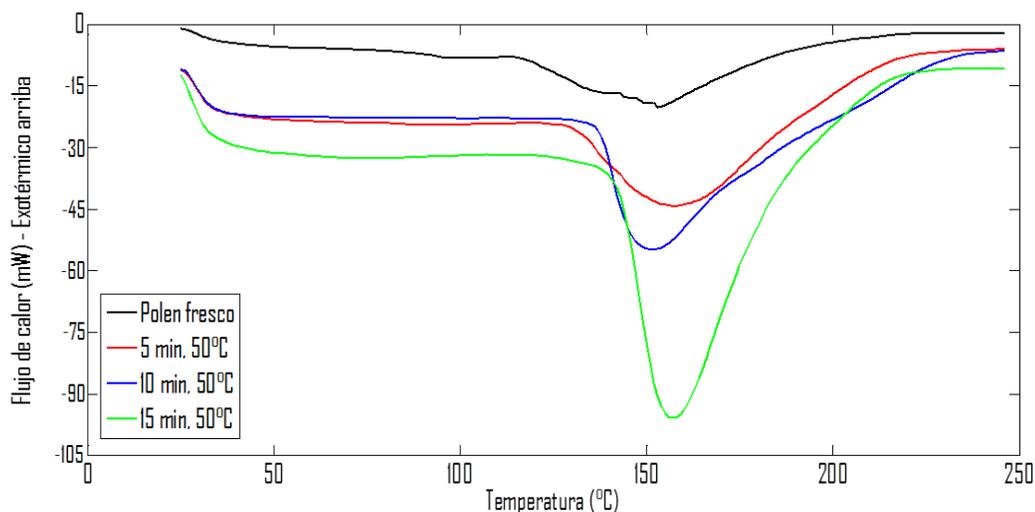


Figura 2-17. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado esterilización-secado a 5, 10 y 15 min, con 50°C.

Finalmente, en la Figura 2-18 se observan los resultados de DSC para el proceso de esterilización a 5, 10 y 15 min y posterior secado a 60°C. En estos tratamientos, las temperaturas donde se presenta el pico máximo de flujo de calor se encuentran entre 150 y 157°C. De todos los tratamientos térmicos empleados, se encontró que el proceso combinado de esterilización 15 min y secado 60°C presenta la mayor entalpía; con base en el análisis que se ha realizado a lo largo de los resultados de DSC, se puede establecer que este tratamiento es el que ocasiona una mayor degradación de la exina.

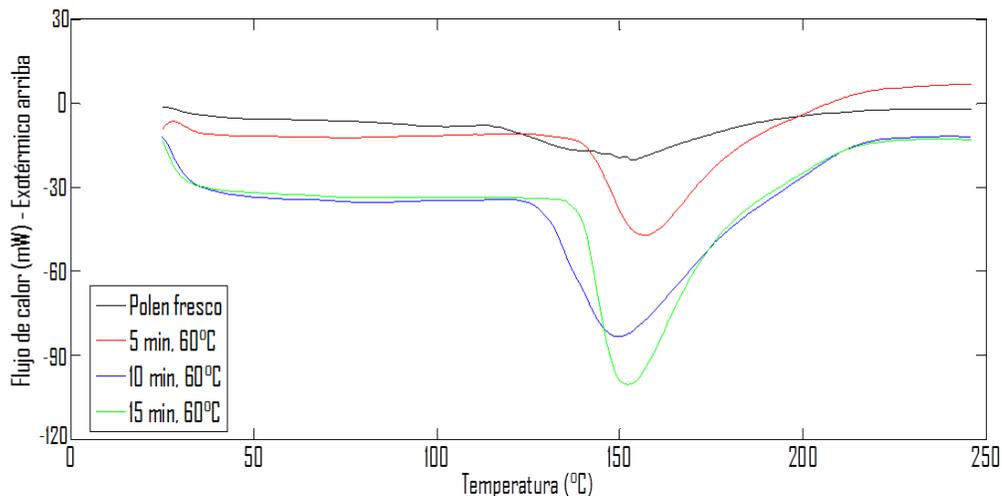


Figura 2-18. DSC de polen fresco y en tratamiento combinado esterilización-secado a 5, 10 y 15 min, con 60°C.

Tabla 2-21. Resultados de DSC para polen fresco y sometido a un tratamiento combinado esterilización-secado

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen húmedo	153	17.5
5 min - 40°C	143	80.8
10 min - 40°C	139	170.4
15 min - 40°C	149	205.6
5 min - 50°C	158	97.4
10 min - 50°C	152	131.6
15 min - 50°C	157	280.5
5 min - 60°C	157	142.3
10 min - 60°C	150	287.1
15 min - 60°C	152	302.8

Microscopía electrónica de barrido

Diferentes micrografías SEM fueron tomadas a los pólenes tratados en ambos tratamientos combinados. Las Figuras 2-19 a 2-21 muestran las micrografías tomadas para el tratamiento combinado esterilización-secado a 40°C, 50°C y 60°C, respectivamente.

En la Figura 2-19 se presentan las muestras esterilizadas por 5, 10 y 15 min y luego secadas a 40°C. Se observa que el polen estéril aún presenta en algunos casos la

estructura típica del grano. Por otra parte, en la Figura 2-20 se observan las microfotografías de las muestras esterilizadas por 5, 10 y 15 min y luego secadas a 50°C; los tratamientos con 5 y 10 minutos presentan una ligera modificación en la estructura, mientras que con 15 min se hace evidente una ruptura y degradación de la esporopolenina. Un resultado similar se encuentra en el proceso combinado de esterilización a 10 y 15 min y luego un secado a 60°C (ver Figura 2-21).

Estos resultados son coherentes con lo encontrado en DSC, con lo cual estos tratamientos afectaron en la estructura de la capa externa del polen. En comparación a los resultados obtenidos en los tratamientos combinados de secado-esterilización, se puede establecer que el orden de estos tratamientos sí influye de manera notoria en la efectividad del proceso para alterar de alguna manera la estable estructura de esporopolenina.

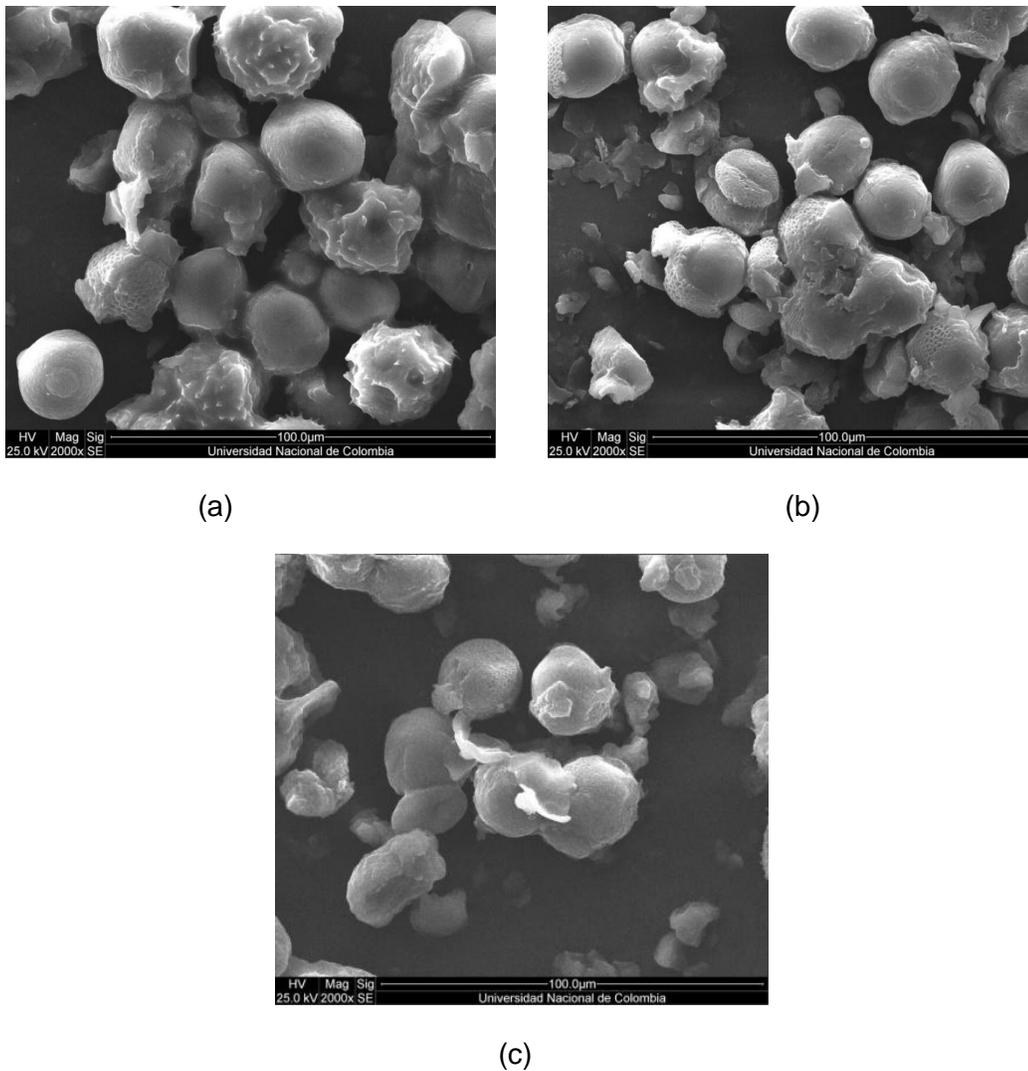
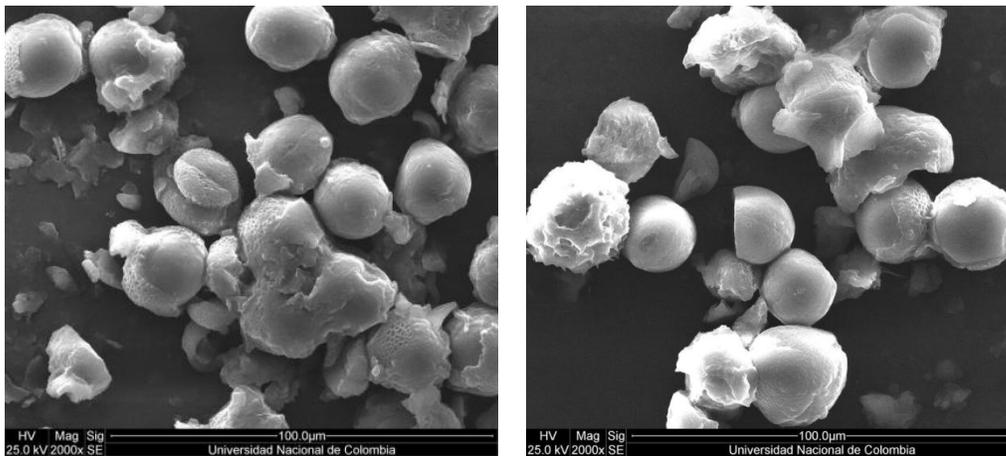
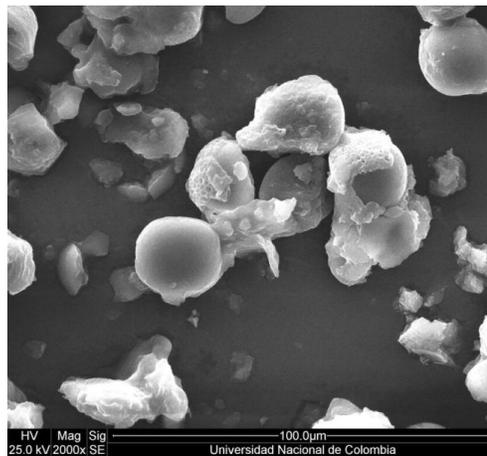


Figura 2-19. Micrografías SEM para tratamientos combinados esterilización - secado de polen. Magnitud 2000X. (a) 5 min, 40°C, (b) 10 min, 40°C y (c) 15 min, 40°C



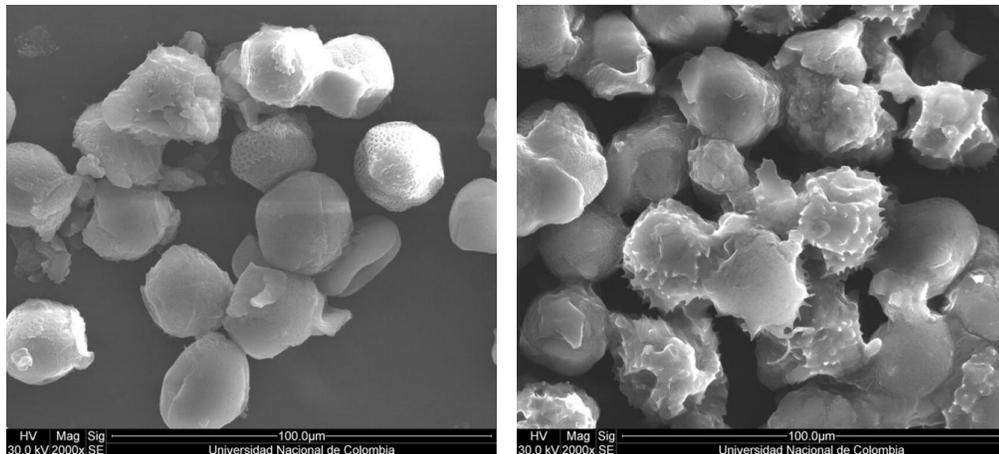
(a)

(b)



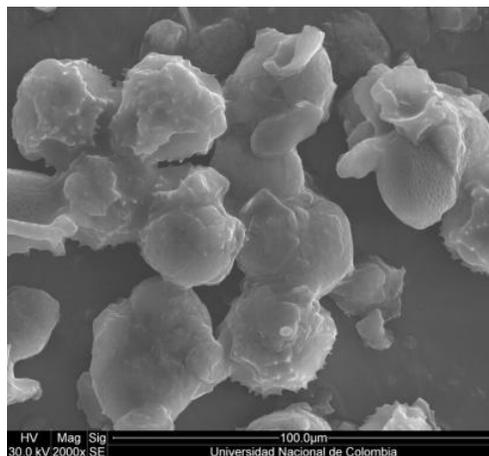
(c)

Figura 2-20. Micrografías SEM para tratamientos combinados esterilización - secado de polen. Magnitud 2000X. (a) 5 min, 50°C, (b) 10 min, 50°C y (c) 15 min, 50°C



(a)

(b)



(c)

Figura 2-21. Micrografías SEM para tratamientos combinados esterilización - secado de polen. (a) 5 min, 60°C, (b) 10 min, 60°C y (c) 15 min, 60°C

2.3.2.4.2. Efecto del tratamiento combinado esterilización-secado sobre las características microbiológicas

Los resultados de análisis microbiológicos del tratamiento combinado esterilización-secado son mostrados en la Tabla 2-22.

En este caso, no fue posible realizar la prueba de esterilidad comercial, ya que una vez se tomó el polen para la realización de los tratamientos de secado las condiciones propias de esterilidad se modificaron. Los resultados entonces se analizaron por los conteos alcanzados en la población de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, así como en la probabilidad de encontrar coliformes. Se observa que en los tratamientos no hubo crecimiento de coliformes y los valores de mesófilos, mohos y levaduras disminuyeron

considerablemente en comparación al secado. No obstante, es posible observar que el secado a 40°C aumenta el conteo de mesófilos aerobios.

Tabla 2-22. Reporte microbiológico del tratamiento combinado de polen esterilización-secado

Condiciones		Conteo de mesófilos aerobios (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)	NMP Coliformes totales	NMP Coliformes fecales
Esterilización (min)	Secado (°C)				
5	40	60	20	0	0
5	50	50	<10	0	0
5	60	30	10	0	0
10	40	40	30	0	0
10	50	< 10	< 10	0	0
10	60	< 10	< 10	0	0
15	40	60	< 10	0	0
15	50	< 10	< 10	0	0
15	60	< 10	< 10	0	0
Valor de referencia*		< 100 000	< 50 000	< 110	0

* De acuerdo a (Campos *et al.*, 2008). Se reporta el máximo valor encontrado en las réplicas realizadas.

2.3.2.4.3. Efecto del tratamiento combinado esterilización-secado sobre las características fisicoquímicas

Los resultados de composición fisicoquímica son mostrados en la Tabla 2-23. El Análisis de Varianza presentó diferencias significativas en humedad y acidez ($p < 0.05$). En lo que respecta al contenido de humedad, el proceso combinado logra resultados similares al obtenido con el secado de polen fresco. Se observa que un mayor tiempo de esterilización incrementa el contenido de humedad y, de manera paralela, el secado a mayor temperatura reduce estos valores. Entre tanto, la digestibilidad de las muestras a pesar de tener un incremento progresivo con el tiempo de tratamiento de esterilización, no presentó diferencias significativas. A pesar de esto, la digestibilidad pasó de 73.5% en un tratamiento de esterilización de 5 min y secado 40°C a 83.0% con un tratamiento durante 15 minutos en autoclave y secado a 60°C. Los valores obtenidos son un 10% inferiores a los obtenidos en el tratamiento combinado secado-esterilización (mostrados en la Tabla 2-19), lo cual permite inferir que el contenido de agua dentro del grano limitaría la capacidad de liberación de los nutrientes que están dentro del grano.

En lo referente al contenido de acidez, se observa que los valores más altos fueron obtenidos en los procesos de esterilización a 5 y 15 minutos y secado a 40°C. En los demás tratamientos no se observa una variación apreciable ni un incremento considerable en el contenido de acidez. Nuevamente, el incremento en la acidez podría

estar asociado con una contaminación microbiológica, en las que se puede establecer que un secado a 40°C no es conveniente.

Tabla 2-23. Composición fisicoquímica promedio del polen con tratamiento combinado esterilización-secado y comparación con polen fresco

Condiciones		Humedad (g/100g)	pH	Acidez * (meq/kg)	Digestibilidad* (g / 100g)
Esterilización (min)	Secado (°C)				
Fresco		20.4 ± 1.4 ^d	4.16 ± 0.07 ^a	245.6 ± 31.8 ^{ab}	65.8 ± 10.1 ^a
5	40	6.3 ± 0.7 ^{bc}	4.14 ± 0.08 ^a	294.6 ± 5.5 ^b	73.5 ± 6.4 ^a
5	50	6.6 ± 0.1 ^b	4.18 ± 0.11 ^a	267.4 ± 47.8 ^{ab}	75.0 ± 3.8 ^a
5	60	5.4 ± 0.4 ^a	4.17 ± 0.10 ^a	265.9 ± 49.9 ^{ab}	75.1 ± 3.1 ^a
10	40	7.7 ± 0.1 ^c	4.20 ± 0.11 ^a	255.1 ± 47.6 ^{ab}	75.5 ± 2.9 ^a
10	50	6.6 ± 0.3 ^b	4.30 ± 0.28 ^a	252.1 ± 13.4 ^a	76.5 ± 7.5 ^{ab}
10	60	5.3 ± 0.2 ^a	4.20 ± 0.16 ^a	252.1 ± 43.4 ^{ab}	76.7 ± 8.8 ^{ab}
15	40	7.5 ± 0.4 ^c	4.17 ± 0.07 ^a	283.7 ± 13.4 ^b	81.0 ± 5.9 ^b
15	50	6.6 ± 0.4 ^b	4.19 ± 0.09 ^a	257.4 ± 43.4 ^{ab}	82.5 ± 6.3 ^b
15	60	5.2 ± 0.2 ^a	4.18 ± 0.12 ^a	257.0 ± 43.2 ^{ab}	83.0 ± 7.8 ^b
<i>valor p</i>		< 0.05	0.53	< 0.05	< 0.05

*Base seca excepto humedad. Promedio ± desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.

Por otra parte, los resultados de compuestos bioactivos y actividad antioxidante son mostrados en la Tabla 2-24. Los resultados de fenoles totales muestran que su contenido se mantiene o incluso aumenta con los tratamientos combinados. A pesar que se observa que el tiempo de tratamiento en autoclave afecta la extracción de estos compuestos del polen, la temperatura de secado no, pasando de valores que oscilan entre 15.0 a 15.4 mg-eq ácido gálico/g a 40°C a entre 19.6 a 22.3 a 60°C. Considerando los resultados más altos obtenidos en el tratamiento de secado (23.5 mg-eq ácido gálico/g a 40°C) y esterilización (23.7 mg-eq ácido gálico/g a 15 min), no se observa un efecto mayor cuando se combinan los tratamientos en el orden esterilización-secado, y por el contrario, aparentan dar valores ligeramente más bajos.

Entre tanto, el contenido de carotenoides sufrió una reducción similar a lo que se había mencionado previamente, en que se evidencia que no hay efecto estadísticamente significativo de la temperatura de secado pero sí del tiempo de exposición en autoclave. De nuevo, la reducción alcanza un valor mínimo promedio de 408.2 mg β-caroteno/kg, que es similar a los valores más bajos obtenidos en los demás tratamientos.

El contenido de flavonoides totales tuvo incrementos significativos en los tratamientos de esterilización durante 15 minutos para las temperaturas de secado de 40°C y 50°C, alcanzando resultados que oscilaron entre 5.43 y 6.00 mg-eq Quercetina/g. A 60°C el

valor disminuye a un promedio de 4.65 mg-eq Quercetina/g, lo cual podría indicar que el tiempo de exposición en autoclave y la temperatura de secado fueron los suficientemente largos para degradar los compuestos que previamente fueron liberados por la ruptura de la exina.

Tabla 2-24. Valores promedio de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de polen con tratamiento combinado esterilización-secado y polen fresco*

Condiciones		Fenoles totales (mg ac. gálico/g)	Carotenoides totales (mg β - caroteno/kg)	Flavonoides totales (mg Quercetina/ g)	FRAP (μ mol TROLOX/g)	TEAC (μ mol TROLOX/g)
Esterili zación (min)	Seca do ($^{\circ}$ C)					
Fresco		15.0 \pm 2.1 ^a	684.5 \pm 82.8 ^{bc}	4.99 \pm 1.79 ^a	58.5 \pm 15.6 ^{ab}	60.8 \pm 19.9 ^{ab}
5	40	15.0 \pm 0.2 ^a	688.9 \pm 35.0 ^c	4.86 \pm 0.12 ^b	56.3 \pm 3.1 ^a	52.9 \pm 1.8 ^a
5	50	15.6 \pm 0.5 ^a	679.1 \pm 39.9 ^c	4.52 \pm 0.43 ^{ab}	58.0 \pm 2.2 ^a	56.5 \pm 1.9 ^a
5	60	15.4 \pm 0.3 ^a	665.5 \pm 37.8 ^c	4.91 \pm 0.31 ^{bc}	56.7 \pm 2.8 ^a	58.2 \pm 3.6 ^a
10	40	18.4 \pm 0.8 ^b	589.5 \pm 39.0 ^b	4.14 \pm 0.22 ^a	58.9 \pm 3.2 ^a	56.0 \pm 2.2 ^a
10	50	18.8 \pm 0.9 ^b	574.2 \pm 32.0 ^b	4.21 \pm 0.38 ^a	58.1 \pm 1.7 ^a	60.5 \pm 1.6 ^a
10	60	18.7 \pm 1.1 ^b	559.0 \pm 56.3 ^b	4.07 \pm 0.21 ^a	57.0 \pm 1.9 ^a	61.0 \pm 1.5 ^a
15	40	22.3 \pm 0.6 ^c	482.6 \pm 40.8 ^{ab}	6.00 \pm 0.46 ^c	63.1 \pm 3.3 ^{ab}	64.5 \pm 2.7 ^{ab}
15	50	19.6 \pm 1.6 ^b	425.1 \pm 51.2 ^a	5.43 \pm 0.41 ^c	64.1 \pm 2.4 ^b	66.8 \pm 1.6 ^b
15	60	20.0 \pm 2.9 ^{bc}	408.2 \pm 49.1 ^a	4.65 \pm 0.29 ^{ab}	66.8 \pm 3.4 ^b	68.0 \pm 3.2 ^b
<i>valor p</i>		< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

*Base seca. Promedio \pm desviación estándar. Letras distintas para una misma columna representan diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%.

La actividad antioxidante por los métodos FRAP y TEAC solo varía significativamente con un tiempo de esterilización de 15 minutos; en ambos casos los mayores resultados fueron conseguidos en estas condiciones, y cuyos valores oscilaron entre 63.1 y 66.8 μ mol Trolox/g y 64.5 y 68 μ mol Trolox/g para FRAP y TEAC, respectivamente.

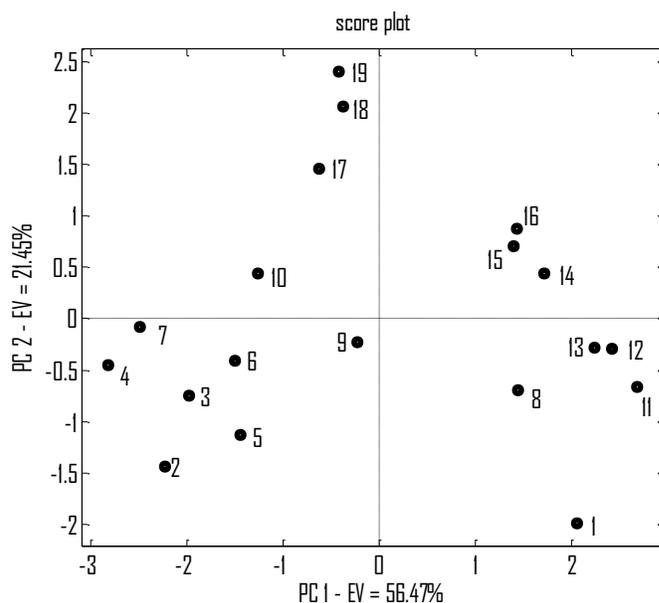
En resumen, a partir de la observación de los resultados de DSC y SEM es posible encontrar una modificación de la exina de manera considerable, en particular en los tratamientos de esterilización con 15 min y posterior secado a 50 y 60 $^{\circ}$ C. La combinación de tiempo de esterilización y temperatura de secado reduce considerablemente las cargas microbiológicas de mesófilos aerobios y mohos y levaduras. Así mismo, se encontró un incremento significativo en el contenido de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante relacionado principalmente al tiempo de esterilización y en menor medida a la temperatura de secado, siendo los tratamientos a 15 min los de mejores resultados. Adicionalmente, una ruptura de la capa externa pudo haber ocasionado que los tratamientos de mayor intensidad en tiempo y temperatura mostraran

un incremento significativo en la digestibilidad; de manera contraria, estos tratamientos fueron los que presentaron mayores pérdidas de carotenoides.

2.3.2.5. Análisis global de datos y selección del mejor tratamiento térmico

Inicialmente se presenta el análisis global de los tratamientos térmicos y su comparación con las características del polen fresco, mediante la elaboración de un Análisis de Componentes Principales (ver Figura 2-22 y Figura 2-23). Para el análisis de datos, no se tuvieron en cuenta aquellos tratamientos que mostraron resultados no satisfactorios en los análisis microbiológicos como se presentó en la Tabla 2-18.

El resultado del PCA muestra que es posible explicar las similitudes y diferencias entre tratamientos y su relación con las variables a través de los dos primeros componentes principales, los cuales explican cerca del 70% de la varianza total. A partir del primer componente principal es posible establecer que las variables que tienen mayor influencia en el procesamiento térmico son las relacionadas a la medición de compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Entre tanto, las muestras sometidas al proceso de secado únicamente y a esterilización son las que presentan los contenidos más altos de fenoles totales y flavonoides totales, así como la mayor capacidad antioxidante por FRAP, mientras que las muestras sometidas a tratamientos combinados de esterilización-secado y secado-esterilización tuvieron en adición mayores valores en digestibilidad. De igual manera, se observa cómo cualquiera de estos tratamientos está en cuadrantes opuestos a la variable de carotenoides totales, con excepción del tratamiento combinado esterilización-secado con tiempo de 5 minutos, lo cual refleja la disminución en su contenido por efecto de la temperatura.



1. Polen Fresco, 2. Secado 40°C, 3. Secado 50°C, 4. Secado 60°C, 5. Esterilización 5 minutos, 6. Esterilización 10 minutos, 7. Esterilización 15 minutos, 8. Secado 40°C - Esterilización 15 minutos, 9. Secado 50°C - Esterilización 15 minutos, 10. Secado 60°C - Esterilización 15 minutos, 11. Esterilización 5 minutos - Secado 40°C, 12. Esterilización 5 minutos - Secado 50°C, 13. Esterilización 5 minutos - Secado 60°C, 14. Esterilización 10 minutos - Secado 40°C, 15. Esterilización 10 minutos - Secado 50°C, 16. Esterilización 10 minutos - Secado 60°C, 17. Esterilización 15 minutos - Secado 40°C, 18. Esterilización 15 minutos - Secado 50°C, 19. Esterilización 15 minutos - Secado 60°C

Figura 2-22. Score plot obtenido mediante PCA de los tratamientos térmicos seleccionados.

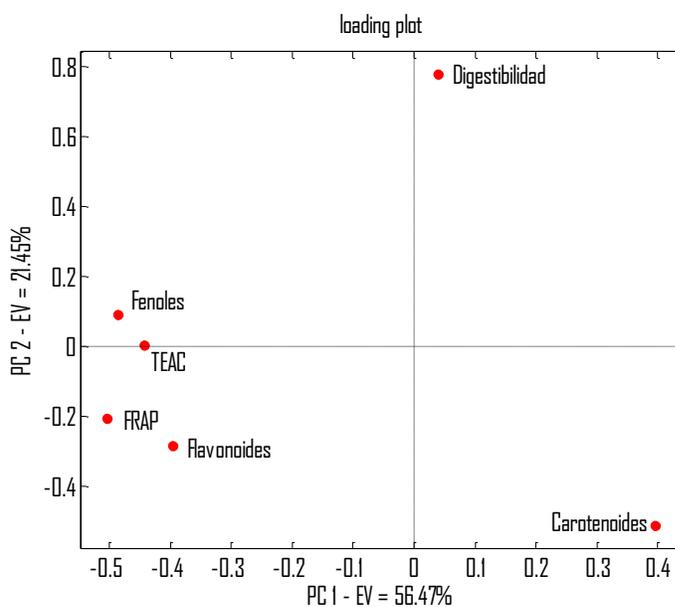
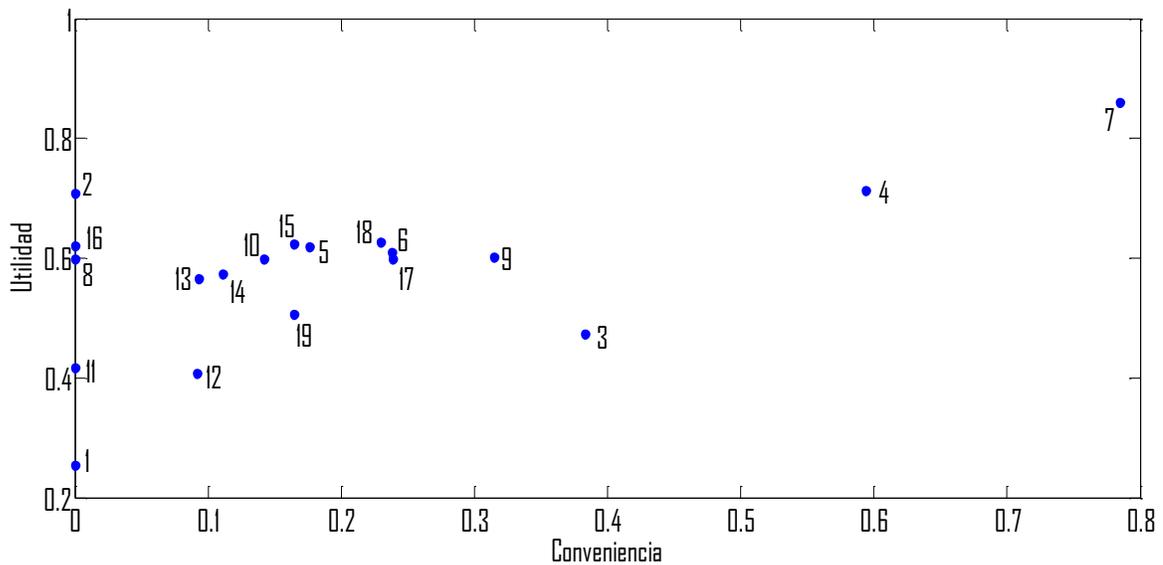


Figura 2-23. Loading plot obtenido mediante PCA de los tratamientos térmicos seleccionados.

Por otra parte, para la selección del mejor método se obtuvieron las funciones de conveniencia y utilidad, cuyos resultados se presentan en la Tabla 2-25 y la Figura 2-24. Según los valores de conveniencia y utilidad se recomienda emplear la esterilización durante 15 minutos como el mejor tratamiento térmico. A diferencia de lo sugerido en por algunos autores o en normativas internacionales, el secado a 40°C no es conveniente porque el polen sufre una elevación considerable en la acidez y presenta aún una carga microbiológica considerablemente alta. Se observa también que el polen fresco está cerca al origen en la Figura 2-24, lo cual indica que en comparación a los pólenes procesados el producto crudo no es útil ni conveniente.

Dentro de las opciones de secado, un tratamiento a 60°C se presenta como el mejor resultado. Esta condición es útil para reducir el contenido de agua en el polen si se desea emplear para su comercialización directa. En este caso, se debería tener en cuenta el tiempo de vida útil del alimento con el fin de establecer hasta que periodo el producto sigue siendo estable, en particular en sus características microbiológicas.



1. Polen Fresco, 2. Secado 40°C, 3. Secado 50°C, 4. Secado 60°C, 5. Esterilización 5 minutos, 6. Esterilización 10 minutos, 7. Esterilización 15 minutos, 8. Secado 40°C - Esterilización 15 minutos, 9. Secado 50°C - Esterilización 15 minutos, 10. Secado 60°C - Esterilización 15 minutos, 11. Esterilización 5 minutos - Secado 40°C, 12. Esterilización 5 minutos - Secado 50°C, 13. Esterilización 5 minutos - Secado 60°C, 14. Esterilización 10 minutos - Secado 40°C, 15. Esterilización 10 minutos - Secado 50°C, 16. Esterilización 10 minutos - Secado 60°C, 17. Esterilización 15 minutos - Secado 40°C, 18. Esterilización 15 minutos - Secado 50°C, 19. Esterilización 15 minutos - Secado 60°C

Figura 2-24. Diagrama de utilidad en función de conveniencia para los tratamientos térmicos seleccionados

Tabla 2-25. Resultados de las funciones de conveniencia y utilidad para los tratamientos térmicos seleccionados

Tratamiento	Conveniencia	Utilidad
Polen Fresco	0.000	0.254
Secado 40°C	0.000	0.708
Secado 50°C	0.383	0.473
Secado 60°C	0.594	0.712
Esterilización 5 minutos	0.176	0.619
Esterilización 10 minutos	0.238	0.609
Esterilización 15 minutos	0.785	0.860
Secado 40°C - Esterilización 5 minutos	No cumplió los requisitos microbiológicos	
Secado 40°C - Esterilización 10 minutos	No cumplió los requisitos microbiológicos	
Secado 40°C - Esterilización 15 minutos	0.000	0.598
Secado 50°C - Esterilización 5 minutos	No cumplió los requisitos microbiológicos	
Secado 50°C - Esterilización 10 minutos	No cumplió los requisitos microbiológicos	
Secado 50°C - Esterilización 15 minutos	0.315	0.602
Secado 60°C - Esterilización 5 minutos	No cumplió los requisitos microbiológicos	
Secado 60°C - Esterilización 10 minutos	No cumplió los requisitos microbiológicos	
Secado 60°C - Esterilización 15 minutos	0.142	0.598
Esterilización 5 minutos - Secado 40°C	0.000	0.417
Esterilización 5 minutos - Secado 50°C	0.092	0.408
Esterilización 5 minutos - Secado 60°C	0.093	0.565
Esterilización 10 minutos - Secado 40°C	0.111	0.573
Esterilización 10 minutos - Secado 50°C	0.165	0.623
Esterilización 10 minutos - Secado 60°C	0.000	0.620
Esterilización 15 minutos - Secado 40°C	0.239	0.598
Esterilización 15 minutos - Secado 50°C	0.230	0.627
Esterilización 15 minutos - Secado 60°C	0.165	0.506

2.3.3. Resultados de las muestras sometidas a altas presiones hidrostáticas

2.3.3.1. Análisis de la microestructura del polen por microscopía láser confocal de barrido

La Figura 2-25 muestra algunas imágenes confocales de granos de polen con y sin tratar.

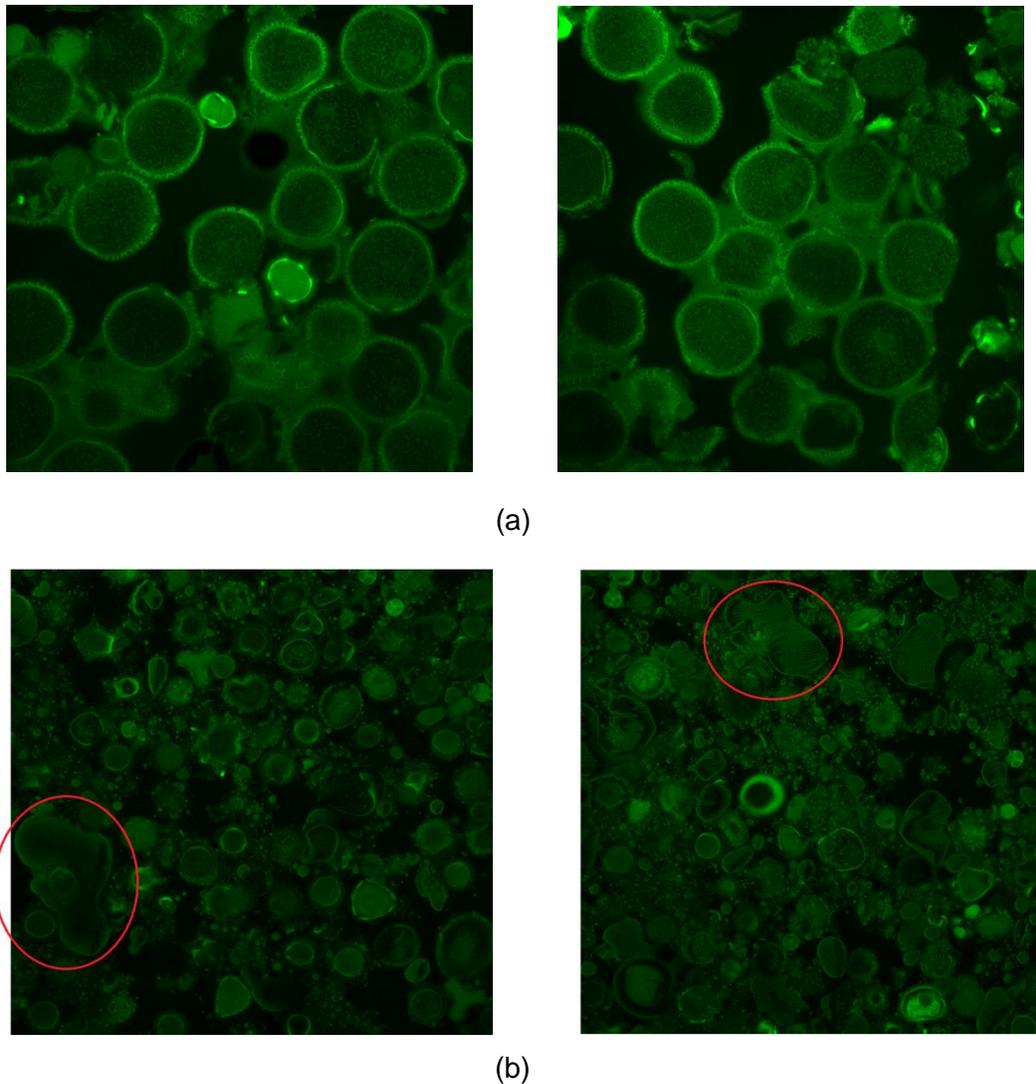


Figura 2-25. Imágenes confocales (60X) de polen sin tratar (a) tratado por altas presiones (b).

Puede observarse la modificación estructural del polen y la pérdida de la forma típica del grano. La autofluorescencia del polen viene principalmente de la capa de exina (Castro *et al.*, 2010). Esta fluorescencia es probablemente debida a los carotenoides y fenoles presentes en la exina, como se ha descrito en otro estudio (Roshchina *et al.*, 2010). De hecho, se demostró que la extracción de estos compuestos con solventes orgánicos lleva a la pérdida de la autofluorescencia del polen (Melnikova *et al.*, 1997). La intensidad de la autofluorescencia entre las muestras sin tratar y procesadas fue heterogénea. Las fotografías del polen sin tratar (Figura 2-25 parte (a)) muestran el grano sin deformidades, con la mayor intensidad de fluorescencia en la capa externa. Por otra parte, las imágenes evidencian una pérdida en el tamaño de los granos luego del tratamiento (Figura 2-25 parte (b)) y una menor intensidad en la fluorescencia; las fotografías tomadas con el mismo nivel de acercamiento en ambos casos permiten establecer que el diámetro de los granos disminuye por efecto de la alta presión. Así

mismo, en el polen tratado se observan trozos dispersos a lo largo de la imagen que podrían ser fragmentos de exina y la liberación y dispersión de sustancias desde el interior del grano (mostradas en la imagen con un círculo rojo). Esto podría hacer evidente que se logró una liberación de compuestos previamente encontrados en el interior del grano y, también, esto podría explicar el incremento en los valores reportados de compuestos bioactivos y actividad antioxidante.

2.3.3.2. Tratamiento de altas presiones en un néctar de piña con inclusión de polen apícola

2.3.3.2.1. Efecto sobre la extractabilidad de compuestos bioactivos e inactivación microbiológica

Los efectos del tratamiento por altas presiones con y sin inclusión de polen sobre los compuestos bioactivos, actividad antioxidante e inactivación microbiológica en néctar de piña son mostrados en la Tabla 2-26.

En consideración al contenido de carotenoides totales, la muestra sin tratar en ausencia de polen no ha tenido un valor detectable, mientras que las muestras sin tratar suplementadas con 5 y 10 % de polen tuvieron contenidos de 43.19 ± 1.19 y 54.10 ± 0.13 mg β -caroteno/kg, respectivamente, por lo que es claro que los carotenoides proceden del polen adicionado.

Como puede observarse en la Tabla 2-26, la presión y el tiempo favorecen la extracción de carotenoides, con mayores valores para periodos más largos de tratamientos y mayores niveles de presión. Con una adición de polen del 5%, el contenido de carotenoides se incrementa a 51.65, 56.33, 66.14, 78.85 y 80.14 mg β -caroteno/kg después del tratamiento a 200 MPa por 5 y 10 min, 300 MPa por 10 min y 400 MPa por 5 y 15 min, respectivamente. En consecuencia, aparentemente el tratamiento por altas presiones favorece la extracción de componentes desde el grano de polen aumentando los carotenoides en el medio de dispersión en comparación a las muestras sin tratar en valores de hasta 60% y 86% para el néctar de piña con adición de polen de 5% y 10%, respectivamente.

Un ANOVA de tres vías mostró que la presión, el tiempo y la concentración de polen tuvieron una influencia significativa sobre el contenido de carotenoides totales ($p < 0.05$). El contenido máximo alcanzado fue de 86.60 mg β -caroteno/kg con el tratamiento más alto probado (400 MPa, 15 min, 10% (p/v) polen). En este caso, parecería que el tratamiento por altas presiones induce un rompimiento en la capa de exina, no sólo favoreciendo la liberación de compuestos sino también su conservación, por lo que las altas presiones pueden ser consideradas como un tratamiento eficiente para incrementar la disponibilidad de compuestos bioactivos en el polen. Estos resultados contrastan con los obtenidos para el contenido de carotenoides empleando tratamientos térmicos; en el

caso del secado a 60°C el contenido de carotenoides se redujo en un 24%, mientras que en la esterilización durante 15 min se presentó un descenso del 41%.

Tabla 2-26. Efecto del tratamiento por altas presiones e inclusión de polen apícola sobre el contenido de fenoles totales, carotenoides totales, actividad antioxidante y carga microbiana de la muestra.

Presión (Mpa)	Tiempo (min)	Polen % (w/v)	TPC (mg GAE/g)	TCC (mg β-caroteno/kg)	FRAP (μmol Trolox/g)	<i>Salmonella</i> log ₁₀ S	<i>Z. rouxii</i> log ₁₀ S
0	0	0	7.01 ± 0.36	ND	40.50 ± 5.00	0	0
0	0	5	11.23 ± 0.57	43.19 ± 1.19	57.70 ± 2.30	0	0
0	0	10	13.82 ± 0.39	54.10 ± 0.13	58.30 ± 4.30	0	0
200	5	0	6.88 ± 0.79	ND	63.20 ± 1.70	1.27 ± 0.09	1.10 ± 0.01
200	5	10	17.55 ± 0.83	55.06 ± 0.36	122.60 ± 4.00	2.72 ± 0.18	1.06 ± 0.13
200	10	5	8.76 ± 0.38	51.65 ± 0.03	65.50 ± 7.10	2.42 ± 0.02	2.25 ± 0.27
200	15	0	4.74 ± 0.46	ND	59.30 ± 2.40	5.50 ± 0.13	2.33 ± 0.03
200	15	10	14.57 ± 0.32	70.47 ± 0.78	117.60 ± 6.10	5.66 ± 0.02	4.53 ± 0.08
300	5	5	9.22 ± 0.33	56.33 ± 0.53	94.10 ± 2.30	5.33 ± 0.51	4.13 ± 0.04
300	10	0	4.00 ± 0.29	ND	83.00 ± 4.20	5.16 ± 0.09	5.00 ± 0.03
300	10	5	12.90 ± 0.56 ^a	66.14 ± 0.18 ^a	91.50 ± 5.60 ^a	5.14 ± 0.11 ^a	5.07 ± 0.02 ^a
300	10	10	15.49 ± 1.84	74.05 ± 0.79	123.80 ± 6.00	3.48 ± 0.03	5.08 ± 0.07
300	15	5	11.89 ± 0.29	78.85 ± 0.38	105.10 ± 7.30	> 6 ⁺	4.76 ± 0.14
400	5	0	4.27 ± 0.34	ND	62.90 ± 8.40	5.71 ± 0.05	> 6 ⁺
400	5	10	16.65 ± 1.88	67.43 ± 0.21	129.70 ± 3.60	5.87 ± 0.11	> 6 ⁺
400	10	5	19.05 ± 0.06	80.14 ± 0.24	98.00 ± 0.90	5.52 ± 0.15	> 6 ⁺
400	15	0	3.97 ± 0.20	ND	93.30 ± 3.40	> 6 ⁺	> 6 ⁺
400	15	10	20.34 ± 1.08	86.60 ± 0.35	140.30 ± 4.90	5.40 ± 0.04	> 6 ⁺

^a Promedio del punto central. ⁺ más de seis reducciones logarítmicas. PC: Contenido de fenoles totales. TCC: Contenido de carotenoides totales. FRAP: Poder antioxidante reductor de hierro. mg GAE/g: miligramos equivalentes de ácido gálico. ND: No detectable. S=log₁₀(N/No), fracción de la población de microorganismos eliminados.

A diferencia de otros alimentos de origen vegetal tratados por altas presiones, como por ejemplo tomates (Butz *et al.*, 2002b), néctares de naranja, limón y zanahoria (Butz *et al.*, 2003), gazpacho (Plaza *et al.*, 2006) y zanahoria y brócoli (McInerney *et al.*, 2007b), en los que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la extracción de carotenoides entre las muestras tratadas y los controles, en este estudio, sí se evidencian mayores niveles; esto podría indicar que los carotenoides son extraídos exitosamente cuando se logra una modificación estructural del grano.

La concentración de fenoles totales en las muestras control sin polen fue de 7.01 ± 0.36 mg GAE/g. En la presencia de 5% y 10% (p/v) de polen los valores fueron 11.23 ± 0.57 y 13.82 ± 0.39 mg GAE/g, respectivamente. Así la adición de polen incrementó el contenido de fenoles significativamente ($p < 0.05$). Diferentes investigadores han reportado altos niveles de compuestos fenólicos en extractos de polen. Morais *et al.* (2011) obtuvieron valores de fenoles totales de polen en extractos de metanol (1:2) (p/v) entre 10.5 y 16.8 mg GAE/g y Carpes *et al.* (2007) obtuvieron valores entre 3.6 y 10.9 mg GAE/g a partir de 2 g de polen en un extracto de etanol.

Con base en los resultados obtenidos (ver Tabla 2-26), solamente la concentración de polen tuvo una influencia significativa ($p < 0.05$), incrementando el contenido de compuestos fenólicos en las muestras tratadas. Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Barba *et al.* (2010) quienes reportaron que los compuestos fenólicos no mostraron menores niveles que el control cuando se aplicaron altas presiones a bebidas vegetales. Además, los compuestos fenólicos incluso se incrementaron hasta 69% luego de un tratamiento a 400 MPa durante 10 min con 5% (p/v) de polen. Este incremento puede ser debido al resultado del rompimiento de la exina, formado en parte por compuestos fenólicos, los cuales son extraídos luego del procesamiento. Estos resultados son similares a lo reportado en zanahoría y espinaca (Jung *et al.*, 2013), y purés de fresa y mora (Patras *et al.*, 2009), donde la extracción de compuestos fenólicos fue mayor con un tratamiento a altas presiones.

Como puede observarse en la Tabla 2-26, los valores para FRAP en las muestras sin tratar incrementaron progresivamente con la inclusión de polen hasta alcanzar un promedio de 58.30 ± 4.30 $\mu\text{mol Trolox/g}$ con una adición del 10% (p/v). En cuanto a los productos tratados, la presión y concentración de polen tuvieron un aumento significativo en la capacidad antioxidante ($p < 0.05$), alcanzando valores de 140.30 ± 4.90 $\mu\text{mol Trolox/g}$ con el tratamiento más alto (400 MPa, 15 min, 10% (p/v) polen). Esto puede ser atribuido a la extracción de carotenoides y polifenoles, responsables por la capacidad antioxidante del polen (Carpes *et al.*, 2007; Leja *et al.*, 2007). Se encontraron correlaciones significativas ($p > 0.05$) entre FRAP y el contenido de fenoles totales ($R = 0.698$), como también entre FRAP y el contenido de carotenoides totales ($R = 0.713$). LeBlanc *et al.* (2009) obtuvieron una correlación entre FRAP y el contenido de polifenoles de extractos metanólicos de polen mayores que los encontrados en este estudio ($R = 0.873$).

En la evaluación del efecto de las altas presiones sobre la supervivencia de los microorganismos, se encontró que en el caso de *Salmonella* la presión y el tiempo afectaron significativamente la inactivación ($p < 0.05$). La inactivación microbiana fue mayor cuando el tiempo de tratamiento se incrementó (ver Tabla 2-26). Además, presiones equivalentes a 400 MPa o tiempos de 15 min siempre lograron inactivar al menos cinco ciclos logarítmicos, el cual es el estándar propuesto por cualquier estrategia de procesamiento dirigida a garantizar la inocuidad de los néctares de frutas y productos

similares (CFR, 2012). En el caso de *Z. rouxii* solamente la presión tuvo una influencia significativa ($p < 0.05$). Una tendencia notoria de inactivación de la levadura es observada cuando la presión se incrementa, a 200 MPa la inactivación alcanza como máximo cuatro ciclos logarítmicos, a 300 MPa casi cinco ciclos, mientras que a 400 la inactivación es mayor que cinco ciclos.

2.3.3.2.2. Optimización de los parámetros de proceso

Las mejores condiciones de proceso para tratar el néctar de piña cuando un tratamiento de altas presiones es combinado con la adición de polen fueron estudiadas por RSM. Las ecuaciones 2-5 a 2-7 muestran la función de respuesta para cada uno de los factores evaluados (carotenoides, fenoles y FRAP), mientras que la dependencia de los factores sobre las variables independientes (Presión (P), tiempo (t) y concentración de polen (BP)) es mostrada en la Figura 2-26.

$$CT = 67.04 + 11.40 * P + 11.42 * t + 70.72 * BP \quad \text{Corregido } r^2 = 0.96 \quad \text{Ecuación 2- 5}$$

$$FT = 11.67 + 10.14 * BP \quad \text{Corregido } r^2 = 0.78 \quad \text{Ecuación 2- 6}$$

$$FRAP = 9.23 + 1.92 * P + 5.45 * BP - 2.21 * P^2 + 1.25 * Pt + 2.12 * BP$$

Corregido $r^2 = 0.92$ Ecuación 2- 7

El factor tiempo tiene un efecto reducido en la extracción de compuestos bioactivos en comparación a la presión y la concentración de polen. Los resultados obtenidos mostraron que una concentración de polen de 8% (p/v) y 315 MPa durante 14.5 min fueron las condiciones que optimizan el tratamiento con una conveniencia global de 0.961. Los valores de respuesta predichos bajo estas condiciones por la optimización de respuesta múltiple fueron 88.18 mg β -caroteno/kg para carotenoides totales, 21.06 mg GAE/g para fenoles totales y 142.70 mmol Trolox/g para FRAP. Por lo tanto, la adición de polen a un néctar de frutas, en este caso piña, permite el incremento en el contenido de compuestos bioactivos del producto.

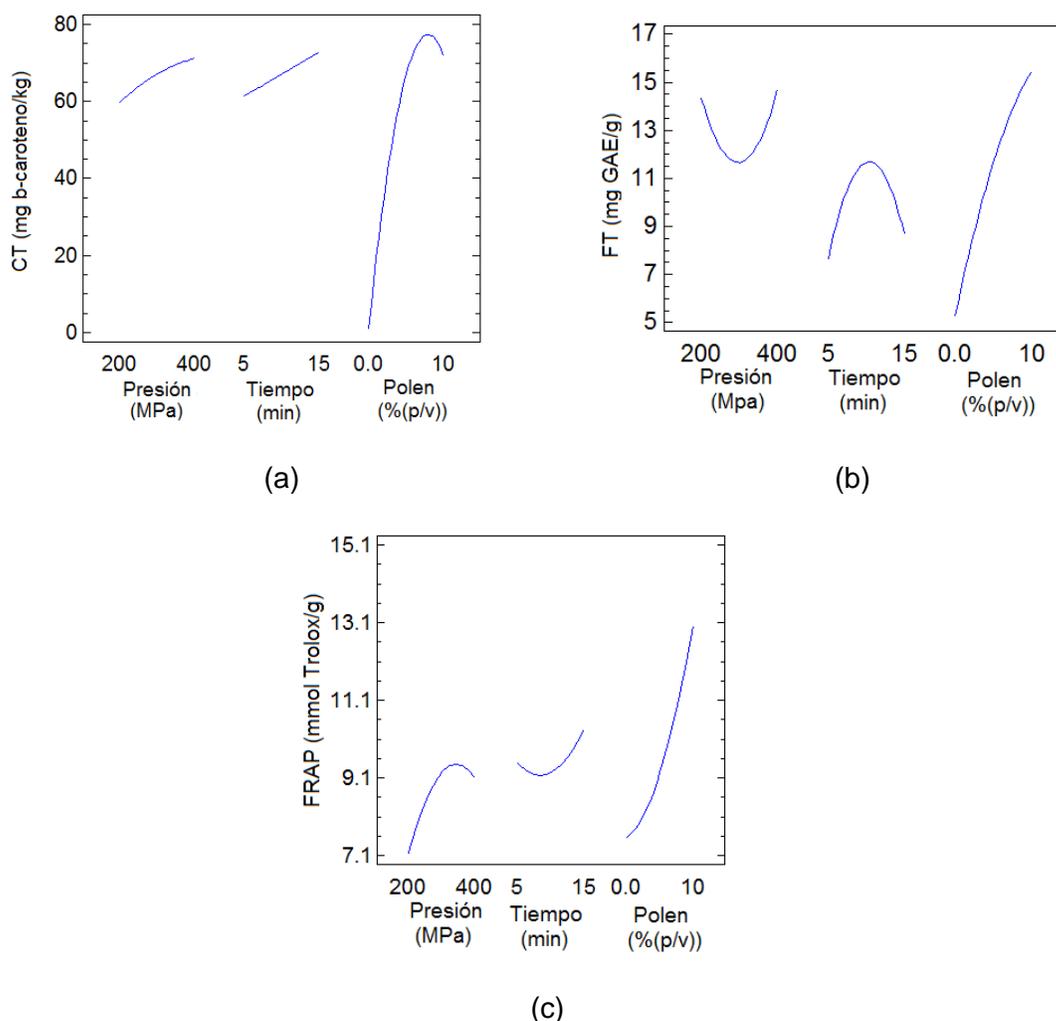


Figura 2-26. Efecto de la concentración de polen (%(p/v)), y las condiciones de tratamiento de altas presiones (presión (MPa) y tiempo (min)) sobre el contenido total de carotenoides (a), fenoles totales (b) y actividad antioxidante (c) de las muestras analizadas.

2.3.3.3. Tratamiento de altas presiones en un producto semi-sólido de polen apícola

2.3.3.3.1. Efecto sobre la extractabilidad de compuestos bioactivos e inactivación microbiológica

Los efectos del tratamiento de altas presiones sobre el contenido de carotenoides totales, fenoles totales, actividad antioxidante e inactivación microbiológica del polen mezclado en un medio de referencia (agua peptona) son mostrados en la Tabla 2-27. La efectividad

de la inactivación microbiológica es evaluada mediante la relación entre la población inicial y final.

Tanto la presión como el tiempo tienen un efecto positivo incrementando la disponibilidad de fenoles y carotenoides, como también la actividad antioxidante de la matriz semi-sólida de polen mezclada con agua peptona, en comparación a la muestra control. En el caso de los compuestos fenólicos, la extractabilidad se incrementó cuando fue empleada la máxima presión y tiempo dispuestas en el diseño experimental (400 MPa, 15 min), alcanzando valores promedio de 33.69 ± 1.37 mg GAE / g, lo cual significa un incremento total en la disponibilidad de estos compuestos de cerca de 36%, en comparación al control.

Tabla 2-27. Efecto de las altas presiones sobre el contenido de fenoles totales, carotenoides totales y actividad antioxidante (FRAP) y la carga microbiológica de la muestra.

Presión Mpa	Tiempo (min)	TPC (mg GAE/g)	TCC (mg β -caroteno/kg)	FRAP (μ mol Trolox/g)	<i>Salmonella</i> log ₁₀ S	<i>Z. rouxii</i> log ₁₀ S
0	0	24.83 \pm 3.68	552.27 \pm 0.91	100.6 \pm 11.2	0	0
200	5	24.79 \pm 3.30	597.11 \pm 2.73	105.3 \pm 19.5	1.65 \pm 0.03	0.65 \pm 0.05
200	10	27.43 \pm 4.07	631.29 \pm 0.20	105.7 \pm 29.5	1.83 \pm 0.01	0.67 \pm 0.08
200	15	31.47 \pm 2.21	655.18 \pm 4.02	112.7 \pm 13.1	3.93 \pm 0.04	1.36 \pm 0.03
300	5	25.33 \pm 3.21	720.75 \pm 0.93	110.4 \pm 11.0	2.87 \pm 0.02	0.71 \pm 0.12
300	10	26.66 \pm 3.08 ^a	723.65 \pm 2.90 ^a	115.5 \pm 15.8 ^a	3.41 \pm 0.12 ^a	2.06 \pm 0.05 ^a
300	15	32.59 \pm 4.43	770.86 \pm 5.60	122.3 \pm 15.4	3.73 \pm 0.26	2.09 \pm 0.24
400	5	28.52 \pm 0.95	718.07 \pm 2.28	110.4 \pm 11.1	2.49 \pm 0.10	2.10 \pm 0.05
400	10	29.76 \pm 1.62	751.47 \pm 9.51	117.5 \pm 16.0	3.29 \pm 0.02	2.31 \pm 0.04
400	15	33.69 \pm 1.37	778.03 \pm 1.16	126.5 \pm 11.1	3.41 \pm 0.06	3.69 \pm 0.01

^a Promedio del punto central. TPC: Contenido de fenoles totales. TCC: Contenido de carotenoides totales. FRAP: Poder antioxidante reductor de hierro. mg GAE/g: miligramos de equivalentes de ácido gálico. S=log₁₀(N₀/N), fracción de la población de microorganismos eliminados.

En lo que respecta al contenido de carotenoides y actividad antioxidante, se observó que no hay una diferencia significativa ($p > 0.05$) en ambos casos cuando se emplearon presiones de 300 o 400 MPa. Para el factor tiempo, se observó una tendencia hacia alcanzar valores más altos de extracción de carotenoides y mayor actividad antioxidante con periodos largos. Los mejores resultados fueron obtenidos a 400 MPa en un tiempo de 15 min, en el cual los niveles de carotenoides y FRAP fueron 778.03 ± 1.16 mg β -caroteno / kg y 126.5 ± 11.1 mol Trolox / g, respectivamente, siendo mayores en un 41% y 21% cada uno, en comparación a la muestra control.

Los valores de reducción en la población celular (Log S) mostraron que los tratamientos más efectivos fueron únicamente capaces de inactivar a lo sumo tres órdenes de

magnitud. En el caso de *Salmonella*, los mayores ciclos de inactivación fueron obtenidos luego de 15 min de tratamiento, sin consideración de la presión sometida (3.93 ± 0.04 , 3.73 ± 0.26 y $3.41 \pm 0.06 \log_{10}$ (ufc / mL) a 200, 300 y 400 MPa, respectivamente). Para *Z. rouxii*, los mayores valores fueron obtenidos a 400 MPa, con un tratamiento de 15 min ($3.69 \pm 0.01 \log_{10}$ (ufc / mL)).

2.3.3.3.2. Optimización de los parámetros de proceso

Las mejores condiciones de proceso para tratar polen semi-sólido mezclado con agua peptonada como medio de referencia fueron estudiadas por RSM. Las ecuaciones 2-8 a 2-10 muestran la función de respuesta para cada uno de los factores estudiados (Fenoles totales (FT), Carotenoides totales (CT) y FRAP), mientras la dependencia de los factores sobre las variables independientes (Presión (P) y Tiempo (t)) es mostrada en la Figura 2-27.

$$CT = 632.99 + 121.33 * P + 56.05 * t - 96.90 * P^2 \quad \text{Corregido } r^2 = 0.85 \quad \text{Ecuación 2- 8}$$

$$FT = 27.96 + 2.76 * P + 6.37 * t \quad \text{Corregido } r^2 = 0.71 \quad \text{Ecuación 2- 9}$$

$$FRAP = 112.66 + 18.5 * P + 20.3 * t \quad \text{Corregido } r^2 = 0.78 \quad \text{Ecuación 2- 10}$$

En vista de los resultados obtenidos, las interacciones y los términos cuadráticos tienen un efecto reducido en comparación a los lineales. Un análisis multilineal de diseño de superficie de respuesta empleando la función de conveniencia fue usado para optimizar las condiciones de tratamiento por altas presiones para maximizar los carotenoides totales, fenoles totales y capacidad antioxidante, como también inactivar tres ciclos logarítmicos de *Salmonella* y *Z. rouxii*. Los resultados obtenidos mostraron que 395 MPa y 15 min fueron las condiciones que optimizan el tratamiento con una conveniencia global de 0.936. Los valores de las variables de respuesta predichas bajo estas condiciones por la optimización fueron 781.31 mg β -caroteno/kg para carotenoides totales, 67.38 mg GAE/g para fenoles totales y 496.9 mmol Trolox/g para FRAP.

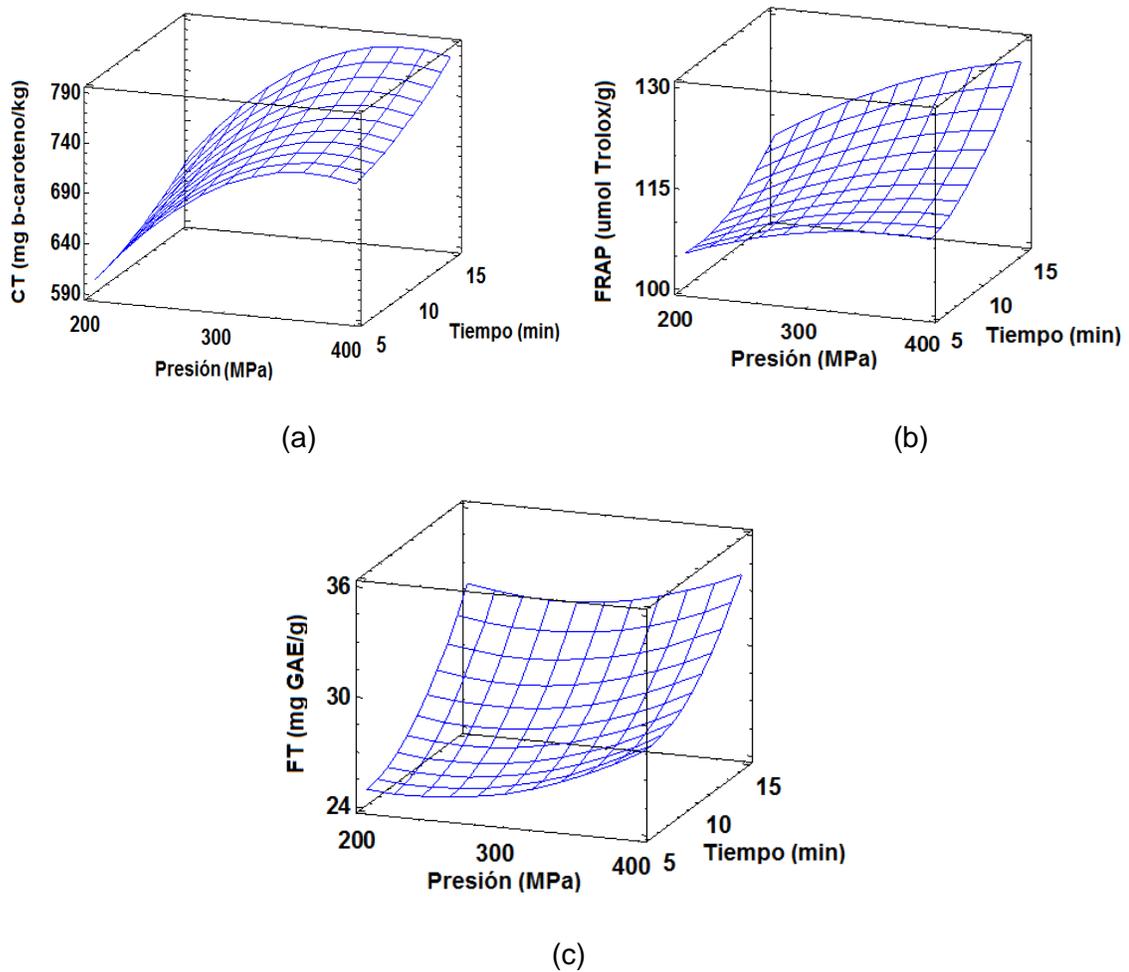


Figura 2-27. Efecto del tratamiento de las condiciones de altas presiones (Presión (MPa) y tiempo (min)) sobre el contenido de carotenoides totales, fenoles totales y actividad antioxidante de las muestras analizadas.

2.4. Conclusiones

El análisis de la estructura del polen mediante DSC mostró que existen mayores valores de entalpía en los pólenes tratados térmicamente que en el polen fresco. Los valores de entalpía pueden ser asociados al grado de modificación estructural del polen que como fue comentado son más intensos si la estructura fue degradada, haciendo que ocurra una generación de compuestos derivados de la esporopolenina, lo cual tiene como consecuencia un consumo energía medible a través del DSC. Con base en este resultado, el tratamiento que ocasionó una mayor modificación en la esporopolenina y a su vez tuvo el mayor valor de entalpía fue el tratamiento combinado esterilización-secado con 15 min y 60°C, el cual fue 17 veces superior a la entalpía medida para el polen fresco.

Se encontró que aunque temperaturas de secado de 40°C y 50°C pudieron eliminar las cargas de microorganismos mesófilos, mohos y levaduras por debajo del valor de referencia, estos tratamientos no son aún suficientes para asegurar la estabilidad del producto. En adición, de acuerdo a los resultados obtenidos, el incremento en la acidez y la disminución en el pH en el polen son ocasionados por la contaminación microbiológica y no por efecto de la temperatura. Por el contrario, los procesos de esterilización eliminan toda la carga microbiológica presente en el polen, a cualquiera de los tiempos ensayados. En lo referente a los tratamientos combinados, el proceso esterilización-secado arrojó resultados satisfactorios para todos los ensayos, mientras que con los ensayos de secado-esterilización solamente se obtuvieron buenos resultados con tiempos de esterilización de 15 min.

En consideración a los compuestos bioactivos, en términos generales se encontró un incremento en el contenido de flavonoides, fenoles totales y actividad antioxidante, así como un descenso en el contenido de carotenoides por el efecto de la temperatura. Estas condiciones fueron posiblemente ocasionadas por la modificación de la capa externa del polen con base en los resultados obtenidos en el análisis estructural, permitiendo la liberación de compuesto bioactivos, sin embargo, debido a la inestabilidad de los carotenoides con la temperatura, estos son fácilmente degradados una vez son liberados. En lo que respecta a la digestibilidad, en los tratamientos de secado, esterilización y el tratamiento combinado secado-esterilización no se encontraron diferencias significativas en los resultados con respecto al polen fresco. En contraste, en los tratamientos de esterilización-secado con 15 min se observan incrementos significativos. Esto quiere decir que solamente tratamientos térmicos fuertes y en este orden (15 minutos en autoclave - 60°C en secado) logran alterar o fracturar la esporopolenina y así promover la liberación de compuestos con actividad biológica, en los que pudieron ocurrir varias reacciones que promueven un decrecimiento en la solubilidad de proteína. En contraste, el contenido de carotenoides sufrió una reducción cercana al 40% por efecto prolongado de la temperatura.

En el caso de los tratamientos combinados, se encontró que en secado-esterilización, no ocurre una extracción de nutrientes y compuestos bioactivos al no encontrarse una diferencia significativa entre el polen y los pólenes tratados para las variables de contenido de fenoles totales, flavonoides totales y digestibilidad, con lo cual podría establecerse que la esterilización pierde efectividad cuando el grano contiene limitada agua libre, y por ende, su rompimiento o fractura por efecto del calor se hace más difícil.

El desarrollo de un método de ordenación, a través de funciones de conveniencia y utilidad, permitió la selección del mejor tratamiento térmico, que basado en aspectos microbiológicos y fisicoquímicos, logró establecer que el mejor tratamiento es la esterilización por 15 minutos. Si bien algunos parámetros fisicoquímicos sufren alguna alteración no deseada, como es el caso de los carotenoides, la carga microbiológica inicial con la que viene el polen, obliga a someterlo a tratamientos térmicos que reduzcan esta carga con el fin de garantizar la inocuidad del alimento. En la procesamiento de

cualquier tipo de alimento, la inocuidad está por encima de la calidad nutricional, con lo cual, se obliga a encontrar un equilibrio entre ambos aspectos garantizando la seguridad del producto y reduciendo las pérdidas de compuestos nutricionales y bioactivos como consecuencia del tratamiento.

En lo correspondiente al tratamiento por altas presiones hidrostáticas, se encontró que este proceso mejora la extractabilidad de algunos compuestos bioactivos del polen apícola, tales como carotenoides y compuestos fenólicos desde el interior del grano, por lo tanto facilita la retención de estos compuestos. Los resultados para la matriz semi-sólida de polen mezclada con agua peptonada mostraron un incremento en los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante, en particular cuando fueron empleados una presión y tiempo cercanos a los 400 MPa y 15 min. Sin embargo, la inactivación microbiológica reportó niveles por debajo de tres reducciones logarítmicas, lo cual podría ser un indicador de un tratamiento no uniforme dado el bajo contenido de agua de la muestra.

En el caso del néctar con inclusión de polen, fue posible incrementar la extractabilidad de carotenoides y compuestos fenólicos cuando fue tratado a altas presiones a diferentes niveles de presión, tiempo y adición de polen. Los resultados mostraron un incremento de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante en el punto óptimo encontrado en el modelo matemático de superficie de respuesta, 315 MPa por 14.5 min combinado con una inclusión de polen de 8% (p/v), el cual inactiva al menos 5 ciclos logarítmicos de *Salmonella* y *Z. rouxii* y maximiza el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante.

Por otra parte, las imágenes por microscopía confocal realizadas sobre polen sin tratar y tratado mostraron una modificación estructural en la capa externa del grano, lo cual podría indicar que las altas presiones hidrostáticas indujeron cambios que favorecieron la extracción de compuestos nutricionales y bioactivos. Debido a su alto contenido en compuestos bioactivos, los productos tratados por altas presiones con inclusión de polen serían un ingrediente útil para formular nuevos alimentos con características funcionales. A futuro, las técnicas de altas presiones hidrostáticas se presentan como una alternativa atractiva para tratar polen apícola, considerando los resultados obtenidos en este estudio.

3. Tratamientos biotecnológicos en polen

3.1. Introducción

Como se discutió en el Capítulo 1, las abejas naturalmente inducen un bioproceso para la obtención de pan de abejas. En este proceso, la interacción de una amplia gama de microflora nativa aportada por las abejas y externa llegada al polen por su contacto con el suelo, las flores y otros insectos, promueven un complejo fenómeno de fermentación en el que interactúan diferentes microorganismos y enzimas producidas por su acción metabólica y otras secretadas por las abejas a través de su saliva, que originan una modificación del polen a tal punto que el pan de abejas puede ser considerado un producto diferente de la materia prima original.

Los reportes bibliográficos hacen mención que esta modificación natural mejora las características nutricionales y bioactivas del polen (Gilliam, 1979a; Bogdanov, 2011), sin embargo la microbiota asociada es heterogénea y, si se considera la obtención de pan de abejas para su comercialización, bajo estas condiciones naturales es difícil garantizar la consecución de lotes de producción con las mismas características de calidad nutricional. En este sentido, sería conveniente realizar un proceso análogo al obrado por las abejas dentro de la colmena a nivel industrial, que haya sido desarrollado bajo condiciones controladas, ya que esto favorece no sólo el seguimiento de las condiciones del proceso, sino que además facilita la verificación de la calidad del producto final para que ésta sea mantenida de manera constante a lo largo del tiempo. En este orden de ideas, sería interesante poder evaluar el efecto que tienen tanto diferentes tipos de enzimas como los microorganismos sobre las características nutricionales, fisicoquímicas y bioactivas del polen apícola, cuando se llevan a cabo procesos de hidrólisis y fermentación, respectivamente.

El estudio de la hidrólisis enzimática del polen apícola podría ayudar en la extracción e incremento de la disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos. Diferentes estudios en varios productos vegetales han demostrado cómo la hidrólisis enzimática es un proceso de considerable importancia que puede ser usado para mejorar las características fisicoquímicas, nutricionales, bioactivas y organolépticas del alimento original, e incluso, incrementar las propiedades de absorción intestinal de tales compuestos en los seres humanos (Tsai and She, 2006; Adebisi *et al.*, 2008). Para tal fin, pueden emplearse diferentes enzimas que están disponibles comercialmente. Una de las ventajas de realizar hidrólisis enzimática frente a hidrólisis ácida o alcalina, es que en

general en los tratamientos enzimáticos no se reportan reacciones de degradación paralelas que puedan afectar el proceso, o incluso, producir componentes potencialmente dañinos (Gonzalez-Tello *et al.*, 1994).

En lo que respecta a reportes bibliográficos sobre el efecto de la hidrólisis enzimática en las diferentes características bioactivas, nutricionales o estructurales de polen apícola, solamente se tiene conocimiento de dos trabajos. Marinova y Tchorbanov emplearon proteasas y aminopeptidasas las cuales mejoraron los contenidos de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante por la liberación de aminoácidos (Marinova and Tchorbanov, 2010). Entre tanto, Xiaobo *et al.* emplearon la proteasa Alcalasa para la hidrólisis de polen, observando que esta enzima fue efectiva para la degradación de la glutelina, la proteína mayoritaria en el interior del polen (Xiaobo *et al.*, 2007).

Considerando que el polen es un sustrato bastante complejo, debido a que dentro de su composición se presenta una cantidad apreciable de proteína y carbohidratos, y además teniendo en cuenta la estructura de la exina de polen que posee una estructura ligada a compuestos fenólicos derivados de la lignina, se optó por evaluar diferentes tipos de enzimas para la producción de un hidrolizado enzimático de polen. Las proteasas son empleadas comúnmente para hidrolizar parcialmente proteínas y así obtener péptidos más pequeños y aminoácidos libres (Wang *et al.*, 2014). Entre tanto las carbohidrasas catalizan el rompimiento de carbohidratos para la obtención de azúcares simples (Meng *et al.*, 2005). La pectinasa es una enzima que rompe la pectina, un polisacárido encontrado en la pared celular de las plantas, que ha sido ampliamente utilizada en la clarificación de jugos y vinos para producir monosacáridos y ácido galacturónico, principalmente (Wilkins *et al.*, 2007). Finalmente, la lacasa es una oxidasa con capacidad de catalizar reacciones que involucran cualquier sustrato con características similares al p-difenol, por lo que son valiosas en la degradación de lignina y en la síntesis de pigmentos (Madhavi and Lele, 2009).

Por otra parte, en lo referente al polen apícola y pan de abejas, no son muchos los trabajos que se han encargado de la identificación de la microflora presente, en particular aquella perteneciente a las BAL o levaduras. Gilliam hacía los años 70, identificó las especies de bacterias y levaduras más comunes en pólenes norteamericanos, siendo *Bacillus subtilis* y *Torulopsis magnoliae* los organismos más comunes (Gilliam, 1979a; b). Más recientemente, empleando analizadores de genes, se ha podido establecer que en general, las abejas de la especie *Apis mellifera* aportan microorganismos de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* al polen, a través de secreciones salivares (Vásquez and Olofsson, 2009). En Colombia, sólo se conoce de una investigación que menciona que la BAL más común encontrada en el polen de esta región es *Lactobacillus kunkeii* (Moreno, 2012), mientras que no se han reportado estudios sobre identificación de levaduras.

A pesar de esto, y más allá de la identificación de la flora nativa en el polen y a algunos trabajos que mencionan que la obtención de pan de abejas ocurre en un proceso de colonización secuencial de microorganismos que inicia con bacterias *Pseudomona* sp. y

levaduras *Torulopsis* sp. hasta el agotamiento de oxígeno, la posterior colonización de *Bacillus* y *Streptococcus*, quienes realizan una pre-digestión del polen y finalmente la colonización de BAL, que producen rápidamente ácido láctico y realizan la mayor modificación estructural del polen mediante la secreción de enzimas, la literatura acerca de una fermentación inducida de polen es muy escasa y usualmente se limita a establecer la posibilidad de llevar a cabo este tipo de procesos. Es necesario, pues, crear valores agregados para el polen; una posible vía consiste en el desarrollo de un proceso de transformación bioquímico para convertir el polen apícola en un producto fermentado orientado al mejoramiento de indicadores nutricionales y bioactivos, tratando de reproducir un proceso que ya existe en la naturaleza, con unas características que permitan su explotación a escala industrial.

Tradicionalmente, las bacterias acidolácticas han sido utilizadas como los microorganismos más comunes en la fermentación de alimentos. Su constante aparición en diferentes productos fermentados ha propiciado que hoy en día sean aceptados y apreciados por los consumidores, teniendo un reconocimiento como GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros, por sus siglas en inglés) (Mathur and Singh, 2005). No obstante, existen muchas otras clases de alimentos fermentados en los cuales la contribución a la obtención de un producto final fermentado es obtenida a través de otros microorganismos como mohos y levaduras.

Es evidente entonces la necesidad de profundizar en la investigación acerca de la hidrólisis enzimática y la fermentación de polen apícola y el efecto asociado a cada tratamiento sobre las características estructurales, nutricionales y bioactivas del producto. Para tal fin se emplearon las enzimas comerciales Protamex, Viscoflow, Suberase, Alcalase, Novozym y Neutrase para la elaboración de los hidrolizados enzimáticos, evaluando dos diferentes relaciones enzima sustrato: 1 g enzima / 100 g de polen y 5 g de enzima / 100 g de polen. Entre tanto, para la fermentación de polen se emplearon los cultivos puros ATCC de las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae*, y los cultivos comerciales Choozit®, Yomix® y una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, en los que se evaluaron dos tipos de sustrato: polen y polen:agua, este último en relaciones 1:1 y 2:1.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Polen y pan de abejas

Para todos los ensayos se empleó polen corbicular y pan de abejas fresco proveniente del Municipio de Viracachá, Boyacá, Colombia. Ambos productos fueron recolectados en una bolsa de polietileno y almacenados en refrigeración (4°C) en ausencia de luz hasta su análisis y uso en los experimentos.

3.2.2. Hidrólisis enzimática de polen

En esta parte del trabajo se llevó a cabo la evaluación del efecto de la hidrólisis de polen apícola bajo la acción de enzimas con diferentes funciones sobre las características fisicoquímicas, bioactivas y estructurales del grano. Se usaron las enzimas comerciales Protamex, Viscoflow, Suberase, Alcalase, Novozym y Neutrased para la elaboración de los hidrolizados enzimáticos, evaluando dos diferentes relaciones enzima sustrato: 1 g enzima / 100 g de polen y 5 g de enzima / 100 g de polen. Al final de la hidrólisis, se analizaron los parámetros fisicoquímicos de proteína, digestibilidad, fenoles totales, flavonoides totales, actividad antioxidante y aminoácidos. De igual forma, para observar la eventual modificación de la estructura del polen debido a la acción enzimática se realizaron ensayos de Microscopía Electrónica de Barrido y Calorimetría Diferencial de Barrido.

3.2.2.1. Enzimas

Seis diferentes enzimas comerciales fueron empleadas en este estudio. Los nombres comerciales y características de cada enzima son presentados en la Tabla 3-1. Todas las enzimas son producidas por Novozymes (USA) y fueron adquiridas a través de Coldaenzimas (Colombia). Las actividades de cada enzima se describen de acuerdo a cada ficha técnica, las cuales son presentadas en el Anexo C.

Tabla 3-1. Descripción de las enzimas utilizadas para la elaboración de hidrolizados de polen

Nombre comercial	Tipo de enzima	Número EC	Rango de pH	Rango de temperatura	Unidades de referencia
Alcalase® 2.4 L FG	Proteasa subtilisina	3.4.21.62	7.0-9.0	30-65°C	2.4 Anson U/g
Novozym® 33095	Pectinasa galacturonasa	4.2.2.10	3.5-4.2	15-60°C	No especifica
Neutrased 1.5 MG	Endoproteasa	3.4.24.28	5.5-7.5	45-55°C	1.5 Anson U/g
Protamex™	Proteasa	3.1.4.2	5.5-7.5	35-60°C	1.5 Anson U/g
Viscoflow® MG	Mezcla de β-glucanasa (endo-1,3(4)-), xilanasas y carbohidrasas	3.9.5.2	4.0-8.0	33-41°C	500 β-glucanasa U/g
Suberase®	Lacasa	1.10.3.2	4.0-8.0	33-41°C	10500 corcho fenoloxidasa U/mL

3.2.2.2. Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial 6 x 2 en un bloque totalmente aleatorio. El primer factor fue el tipo de enzima, el cual contó con seis niveles siendo cada uno de ellos las enzimas mencionadas previamente. El segundo factor consistió en la relación de enzima sustrato, evaluándose en dos niveles: 1 g enzima/ 100 g polen y 5 g enzima/ 100 g polen. En total, 12 experimentos fueron realizados, cada uno con tres replicas.

3.2.2.3. Preparación del sustrato e hidrólisis

Para evitar condiciones no controladas y una eventual fermentación por microorganismos alteradores, se realizó una esterilización del sustrato. 100 g de polen fueron puestos en un frasco de 250 mL y suspendidos en 100 mL de agua. La mezcla fue homogenizada (Ultra-Turax, IKA-Werke, Germany) y luego esterilizada (NASCO (USA)) a 121°C durante 15 min.

Los ensayos de hidrólisis fueron realizados para cada enzima a su temperatura y pH óptimo, según lo sugerido por su ficha técnica. El sustrato estéril fue ajustado al pH óptimo empleando NaOH 0.1 N, y durante la hidrólisis esta solución se adicionó al sustrato para mantener el pH constante. La hidrólisis fue realizada por la adición de cada enzima a las relaciones previamente mencionadas y la temperatura fue mantenida estable en un baño termostataado (STUART SBS40 (USA)), con agitación constante a 200 rpm. La hidrólisis fue detenida por ebullición del producto hidrolizado durante 2 minutos. Los hidrolizados obtenidos fueron filtrados al vacío para remover el residuo. Ambas fracciones, el sobrenadante y el residuo, fueron recolectados por separado y mantenidos en refrigeración hasta su caracterización. Se obtuvieron adicionalmente blancos de enzimas para cada tratamiento bajo las mismas condiciones de digestión pero en ausencia de la muestra.

3.2.2.4. Análisis estructural y fisicoquímico realizado sobre los pólenes hidrolizados

Cada uno de los pólenes hidrolizados fue sometido a dos grupos de análisis diferentes. El primero de ellos corresponde al análisis de la estructura del polen, con este fin se emplearon Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para tener una evidencia visual, en el primer caso, del efecto que podía tener la hidrólisis sobre la estructura del grano de polen. En el caso de DSC, se pretendía analizar un eventual cambio en la estructura del polen mediante el análisis de la variación del flujo de calor en función de la temperatura. Estas técnicas fueron descritas previamente en el numeral 2.2.5.1.

Por otra parte, el segundo grupo corresponde a los análisis fisicoquímicos, que incluyeron mediciones de características nutricionales y bioactivas como proteína, digestibilidad, fenoles totales, carotenoides totales, flavonoides totales y aminoácidos, así como la valoración de la actividad antioxidante (TEAC y FRAP). Con excepción de proteína, las técnicas de análisis fisicoquímico se realizaron como se describió en el numeral 2.2.5.3.

En el caso de proteína, se realizó un ensayo de Bradford utilizando la coloración azul Commasie (Bradford, 1976), empleando una muestra de 1 g de producto y albúmina sérica como patrón para la curva de calibración. La absorbancia fue leída a 595 nm con un espectrofotómetro JASCO Model V-530 UV / VIS empleando el software Spectra Manager (Jasco, Italia). Los resultados fueron expresados como g de proteína por 100 g de polen.

3.2.3. Fermentación de polen

Se llevó a cabo la evaluación del efecto de la fermentación de polen apícola bajo la acción de bacterias acidolácticas y levaduras sobre diferentes características fisicoquímicas, bioactivas y estructurales, con el fin de obtener un alimento análogo al pan de abejas. Se usaron las cepas ATCC *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *S. cerevisiae* y cultivos comerciales Choozit, Yomix y *S. cerevisiae*, empleando tres diferentes relaciones de sustrato (polen, polen:agua 1:1 y polen:agua 2:1). Finalmente, se llevaron a cabo fermentaciones combinando BAL con levaduras, con el fin de evaluar el efecto de un tratamiento conjunto sobre las características anteriormente mencionadas. Además del conteo de células viables al final de la fermentación y la valoración de la acidez producida, se analizaron los parámetros fisicoquímicos de humedad, pH, digestibilidad, fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides totales y actividad antioxidante y aminoácidos. De igual forma, para evaluar la eventual modificación de la estructura del polen se realizó Microscopía Electrónica de Barrido y Calorimetría Diferencial de Barrido.

3.2.3.1. Microorganismos

En este estudio se emplearon los siguientes organismos ATCC: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 (Kwik Stik™, Minnesota, USA). Adicionalmente, fueron empleados los cultivos comerciales Choozit MY800 y Yo-Mix 883 LYO50 (Danisco, Dinamarca), así como un cultivo comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (Levapán, Colombia). Choozit es una mezcla de los microorganismos *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mientras que Yo-mix es una combinación de las cepas *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus. Todos los cultivos fueron mantenidos en congelación en su presentación comercial a $-20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.2. Diseño experimental

Se empleó un diseño factorial 6 x 3 en un bloque totalmente aleatorio. El primer factor fue el tipo de microorganismo, el cual contó con seis niveles siendo cada uno de ellos las cepas mencionadas previamente. El segundo factor consistió en la relación de sustrato a fermentar, evaluándose en tres niveles de relaciones polen:agua (1:0, 1:1 y 2:1). Estas condiciones fueron definidas de acuerdo a reportes previos para la fermentación de polen (Fuenmayor, 2009; Salazar, 2014). En total, 18 experimentos fueron realizados, cada uno con tres replicas.

3.2.3.3. Activación de bacterias acidolácticas

Las cepas ATTC fueron activadas a partir de una crioperla de vidrio en la que se conserva cada cultivo. Así mismo, la activación de los cultivos comerciales fue hecha pesando 1 g de polvo liofilizado. En cada caso, la cepa fue sumergida en 9 mL de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) e incubada a 35°C por 24 h en condiciones anaeróbicas. Luego, la cepa fue sembrada en placas con agar MRS, permitiendo su crecimiento durante 24 h a 35°C . Finalmente, las colonias fueron suspendidas en una solución salina 0.1% hasta lograr una turbidez equivalente a un patrón McFarland 0.5.

3.2.3.4. Activación de levaduras

En el caso de la levadura ATTC, ésta fue activada a partir de una crioperla de vidrio en la que se conserva cada cultivo, mientras que el cultivo comercial fue activado pesando 1 g de polvo liofilizado. En cada caso, la cepa fue sumergida en 9 mL de caldo especial para levaduras, elaborado mezclando peptona (2% p/v), glucosa (2% p/v) y extracto de levadura (1% p/v) en agua destilada, e incubada a 25°C por 24 h en condiciones aeróbicas. Luego, la cepa fue sembrada en placas con agar PDA (Papa dextrosa agar), permitiendo su crecimiento durante 24 h a 25°C . Finalmente, las colonias fueron suspendidas en una solución salina 0.1% hasta lograr una turbidez equivalente a un patrón McFarland 0.5.

3.2.3.5. Preparación del inóculo

Para evitar una baja producción de biomasa, previo a la fermentación, 1 mL de la cepa activa fue suspendida en una solución que contenía 1 g de polen y 9 mL de caldo MRS o

caldo especial para levaduras, dependiendo si los microorganismos eran bacterias acidolácticas o levaduras. El inóculo fue incubado a 35°C por 24 h en condiciones anaeróbicas para las bacterias y a 25°C por 24 h en condiciones aeróbicas para las levaduras.

3.2.3.6. Preparación del sustrato y fermentación

Previo a la fermentación, 200 g de sustrato fueron preparados con base en cada una de las relaciones polen:agua descritas en el numeral 4.2.3., los cuales fueron servidos en un frasco de 250 mL, el cual fue sellado y esterilizado a 121°C durante 15 minutos, con el fin de eliminar cualquier tipo de carga microbiológica que pudiera alterar la evolución de la fermentación.

A continuación se les adicionó el inóculo de cada una de las cepas y fueron dejados en incubación a 37°C durante 72 h en condiciones anaeróbicas para las bacterias acidolácticas y a 25°C durante 72 h en condiciones aeróbicas para las levaduras. Se seleccionó la condición aeróbica para las levaduras ya que no era de interés la producción de etanol, que es obtenido bajo condiciones anaeróbicas, y considerando además que el pan de abejas no presenta notas aromáticas alcohólicas. Bajo condiciones aeróbicas las levaduras convierten los azúcares reductores en CO₂ y H₂O (Jay, 2000). El inóculo inicial de 10⁸ UFC/g se seleccionó de acuerdo a sugerencias realizadas por Fuenmayor en un estudio previo (Fuenmayor, 2009). Ensayos preliminares mostraron que en fermentaciones superiores a 72 h se reduce la viabilidad de microorganismos, llegando a niveles inferiores a 10³ UFC/g luego de 120 h. Por otra parte, considerando que en el proceso natural de obtención de pan de abejas se reporta que las abejas adicionan miel al polen como posible fuente adicional de carbohidratos, se realizaron ensayos previos de inclusión con el fin de evaluar su influencia en el rendimiento de la fermentación; no obstante, no se encontró una diferencia significativa con respecto al bioproceso empleando polen únicamente. Los resultados de los ensayos preliminares fueron publicados y se encuentran relacionados en el Anexo A: Socialización de resultados (Trabajos No. 6 y 10 de la sección de memorias en eventos científicos).

3.2.3.7. Análisis estructural, microbiológico y fisicoquímico realizado sobre los pólenes fermentados

Cada uno de los pólenes tratados fue sometido a tres grupos de análisis diferentes. El primero de ellos corresponde al análisis de la estructura del polen, con este fin se emplearon Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para tener una evidencia del efecto que podía tener el tratamiento térmico sobre la estructura del grano de polen. Este procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito en el numeral 2.2.5.1.

El segundo grupo corresponde a los análisis microbiológicos referentes al monitoreo de la fermentación a través del conteo de células viables. El recuento en placa de la población en los diferentes puntos de toma de muestra (0, 12, 24, 48 y 72 horas) fue hecho de acuerdo a la metodología establecida por la American Public Health Association (Doores *et al.*, 2013). 10 g de la mezcla fueron disueltas en 90 mL de agua peptonada estéril al 0.1%. Luego, se realizaron diluciones sucesivas tomando 1 mL de la solución preparada y disolviéndolo en 9 mL de agua peptonada estéril, tantas veces como fue necesario. Cada alícuota de 1 mL de las diluciones realizadas se sirvieron en cajas de Petri estériles, a las cuales posteriormente se les adicionó el medio correspondiente de acuerdo a si el conteo estaba dirigido a bacterias acidolácticas o levaduras. En el caso de bacterias acidolácticas se adicionó agar MRS. Al solidificar se llevó a incubación a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en anaerobiosis durante 48 h. Por otra parte, en el caso de levaduras se adicionó agar PDA. Al solidificar se llevó a incubación a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ en aerobiosis durante 5 días. Para todos los casos se realizó el conteo y se reportó como UFC/g polen.

Finalmente, el tercer conjunto correspondió al análisis fisicoquímico. Se realizó el seguimiento del pH y acidez de la fermentación de polen en diferentes tiempos (0, 12, 24, 48 y 72 horas). En adición, se cuantificó el contenido de digestibilidad, fenoles totales, carotenoides totales, flavonoides totales y aminoácidos, así como la valoración de la actividad antioxidante (TEAC y FRAP). Todas las técnicas de análisis fisicoquímico se realizaron como se describió en el numeral 2.2.5.3.

3.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue desarrollado mediante una prueba Anova de dos vías, con el fin de encontrar eventuales diferencias entre el polen estéril con los productos hidrolizados y fermentados bajo las diversas condiciones estudiadas. Las variables cuantitativas (media y desviación estándar) fueron analizadas mediante la prueba de Tukey, utilizando un nivel de significancia del 5%. Adicionalmente, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con el fin de evaluar de manera global los datos obtenidos en este estudio. Así mismo, un método de ordenación total fue ejecutado con el fin de encontrar los mejores tratamientos, con base en las variables medidas.

3.2.4.1. Condiciones de análisis estadístico para la hidrólisis enzimática

Para este estudio, las variables empleadas para la realización tanto del PCA como para el método de ordenación total fueron proteína, digestibilidad, contenido de fenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante (FRAP y TEAC). Para el método de ordenación, se seleccionó una función de transformación de los datos de las variables tipo sigmoidea. Los pesos asignados para las variables de proteína y digestibilidad fueron de 0.2, mientras que el contenido de fenoles totales, flavonoides, actividad antioxidante

FRAP y TEAC tuvieron un peso individual de 0.15. En total, la suma de los pesos de todas las variables fue 1.

3.2.4.2. Condiciones de análisis estadístico para la fermentación

Las variables empleadas para la realización tanto del PCA como para el método de ordenación total fueron acidez, digestibilidad, contenido de fenoles totales, flavonoides totales, carotenoides totales y actividad antioxidante (FRAP y TEAC), así como el conteo final de microorganismos. Para el método de ordenación, se seleccionó una función de transformación de los datos de las variables tipo sigmoidea. Los pesos asignados para las variables de pH, conteo de células viables, acidez producida, productividad y rendimiento fueron de 0.05, mientras que el contenido de fenoles totales, flavonoides, actividad antioxidante FRAP y TEAC y digestibilidad tuvieron un peso individual de 0.15. En total, la suma de los pesos de todas las variables fue 1. Los análisis fueron realizados empleando los *software* MATLAB (The Mathworks, ver. 7.14, 2012) (Ballabio, 2015) y DART (Decision Analysis and Ranking Techniques) (Talete srl, Italia).

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Comparación entre las características bioactivas del polen, pan de abejas y polen estéril

La composición bioactiva y la actividad antioxidante del polen y pan de abejas son presentados en la Tabla 3-1. Se observó que el pan de abejas es un producto más ácido que el polen, mientras que el polen evidencia un mayor contenido de flavonoides totales.

Tabla 3-1. Caracterización fisicoquímica del polen, pan de abejas, y polen estéril*

Producto	pH	Acidez (meq/kg)	Fenoles totales (mg EGA/g)	Flavonoides totales (mg EQ/g)	FRAP (µmol Trolox/g)	TEAC (µmol Trolox/g)	Digestibilidad* (g /100 g)
Polen	4.16 ± 0.07	245.6 ± 31.8	15.0 ± 2.1	4.99 ± 1.79	58.5 ± 15.6	60.8 ± 19.9	65.8 ± 10.1
Polen estéril	4.12 ± 0.15 ^b	266.1 ± 29.7 ^a	23.7 ± 0.7 ^b	5.5 ± 0.6 ^b	73.8 ± 14.4 ^b	81.9 ± 38.3 ^a	69.4 ± 10.9 ^a
Pan de abejas	3.90 ± 0.10 ^a	419.6 ± 88.5 ^b	15.0 ± 6.5 ^a	3.7 ± 0.4 ^a	30.8 ± 14.8 ^a	42.7 ± 25.6 ^a	63.9 ± 6.2 ^a

* Base seca. EGA: Equivalentes de ácido gálico. EQ: Equivalentes de quercetina. Comparación estadística entre el polen estéril y pan de abejas. Letras distintas para una misma variable indica diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%.

Una comparación entre el polen estéril y el pan de abejas muestra como este último posee una acidez aproximadamente 37% mayor, debido al proceso ocurrido al interior de la colmena, en donde las bacterias presentes en el polen propiamente y aquellas provistas por las abejas, promueven una fermentación del producto. De forma paralela, una reducción significativa en el valor de pH se hizo evidente. En lo que respecta al contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante, fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas, donde una tendencia hacia mayores contenidos de compuestos bioactivos y actividad antioxidante es observada en el polen estéril. En las variables en las que no se encontraron diferencias significativas fueron la actividad antioxidante TEAC y digestibilidad, contradiciendo lo mencionado en algunos reportes bibliográficos, en los que se comenta que el pan de abejas tiene una mayor digestibilidad. En este aspecto en particular, es importante hacer mención que tanto la composición como la disponibilidad de nutrientes en el polen es dependiente del origen botánico (Roulston and Cane, 2000); también, hay que decir que la mayoría de información en la que se discute la digestibilidad del pan de abejas no está soportada sólidamente con datos, sino basada en la escasa información reportada por algunos investigadores, lo cual además dificulta la posibilidad de realizar comparaciones con otros productos.

A diferencia del interior de la colmena, en donde las condiciones están relativamente controladas, la actividad humana durante el proceso de recolección y almacenamiento del polen usualmente incrementa la carga microbiológica. Por tal motivo, previo a la fermentación, un tratamiento térmico a 121°C y 15 min fue llevado a cabo para adecuar el sustrato para el bioproceso con el fin de mantenerlo controlado sin que sufra modificaciones por la presencia de microorganismos alteradores, que así estén eventualmente en un conteo por debajo de la referencia establecida en el capítulo 2, bajo las condiciones de incubación pueden crecer hasta alterar notoriamente el proceso. Se encontró que este tratamiento no modifica significativamente la acidez y pH. Por el contrario, el contenido de fenoles totales se incrementó de manera significativa hasta en un 37%, y fue hallada una tendencia hacia mayores valores del contenido de flavonoides totales y actividad antioxidante.

3.3.2. Hidrólisis enzimática de polen

3.3.2.1. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre la estructura del grano de polen

3.3.2.1.1. Calorimetría Diferencial de Barrido

El gráfico de DSC (ver Figura 3-1) fue obtenido para el polen estéril y los productos hidrolizados en una relación enzima sustrato 5 g / 100 g, a través de DSC. Se observan los diferentes cambios en entalpía para todos los pólenes analizados, cuyos picos se encuentran en un rango de temperatura entre 128°C y 175°C (ver Tabla 3-1). En

comparación al resultado obtenido para el polen estéril, se encontró un comportamiento similar para el polen hidrolizado con Viscoflow, con lo que puede establecerse que la β -glucanasa no ocasionó ninguna alteración sobre la estructura del polen. Otras enzimas como Novozym y Suberase, a pesar de mostrar un incremento en la entalpía, no tuvieron un nivel apreciable si son comparadas con las proteasas, lo que permitiría inferir que la pectinasa y lacasa realizan modificaciones en menor proporción sobre la estructura externa del polen.

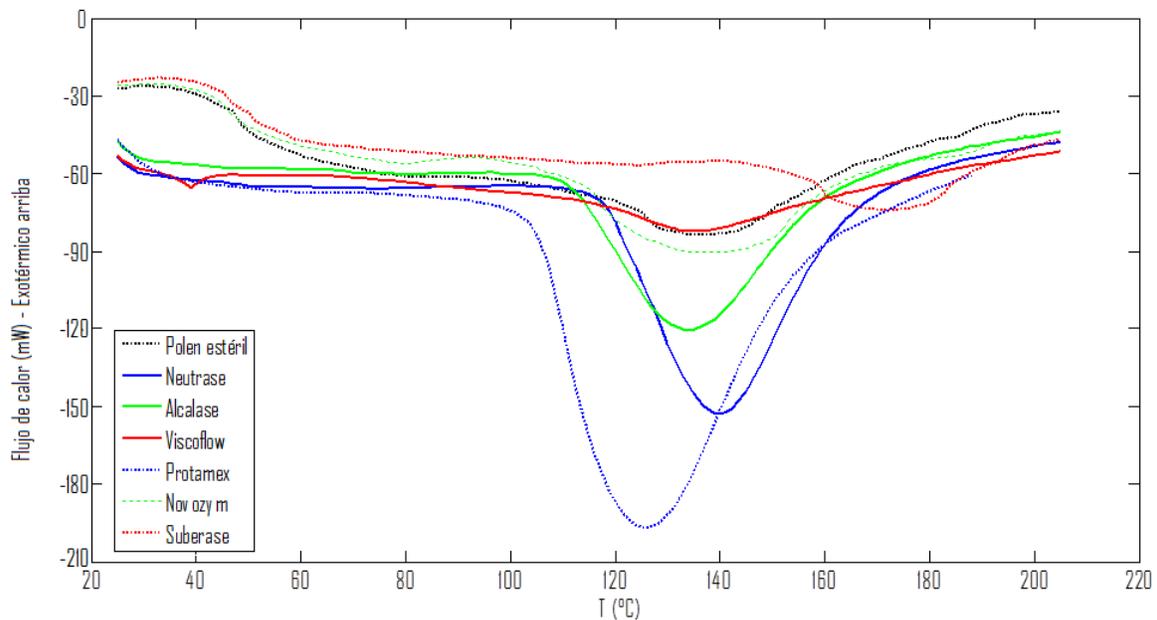


Figura 3-1. DSC de polen estéril e hidrolizados

Tabla 3-1. Resultados de DSC para polen fresco y estéril

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen estéril	155	192.5
Protamex	128	972.6
Neutrased	141	824.4
Alcalase	137	678.8
Novozym	139	247.2
Suberased	175	204.5
Viscoflow	154	180.4

En contraste, los tratamientos realizados con las enzimas proteolíticas mostraron la mayor entalpía en este orden: Protamex > Neutrased > Alcalase. Adicionalmente, es posible observar que el tratamiento con Protamex induce el mayor flujo de calor a una temperatura menor en comparación a los otros tratamientos, cercana a los 128°C; podría inferirse que una estructura más debilitada podría favorecer que el cambio estructural y la

generación de compuestos inicie a una temperatura menor. En comparación con el polen estéril, el tratamiento enzimático con Protamex incrementa en más de 5 veces el valor de entalpía, esto podría deberse a que la hidrólisis con ésta enzima actúa sobre el polen de una manera mucho más efectiva que las otras proteasas, debilitando la estructura de forma más apreciable, incluso mucho mayor que la encontrada para cualquier tratamiento térmico.

3.3.2.1.2. Microscopía electrónica de barrido

Diferentes microfotografías SEM fueron tomadas a los productos hidrolizados en las relaciones enzima sustrato 5 g / 100 g, las cuales son mostradas junto a microfotografías de polen estéril a modo de comparación de la Figura 3-2 a la Figura 3-8. En primer lugar, las fotografías de Viscoflow (ver Figura 3-3) permiten observar que no hubo ningún tipo de alteración en la estructura del polen luego del tratamiento y esencialmente se ven similares a las de polen estéril (ver Figura 3-2). Esto es coherente a lo encontrado a través del cálculo de los valores de entalpía de DSC.

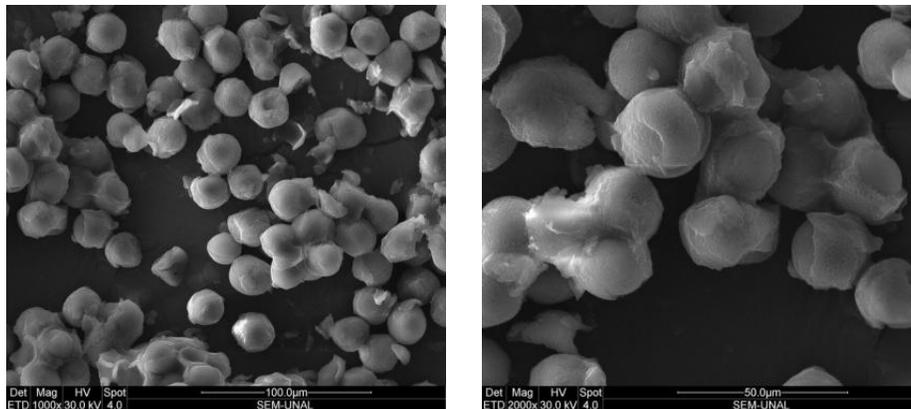


Figura 3-2. Micrografías SEM para polen estéril. Magnitud 1000X y 2000X.

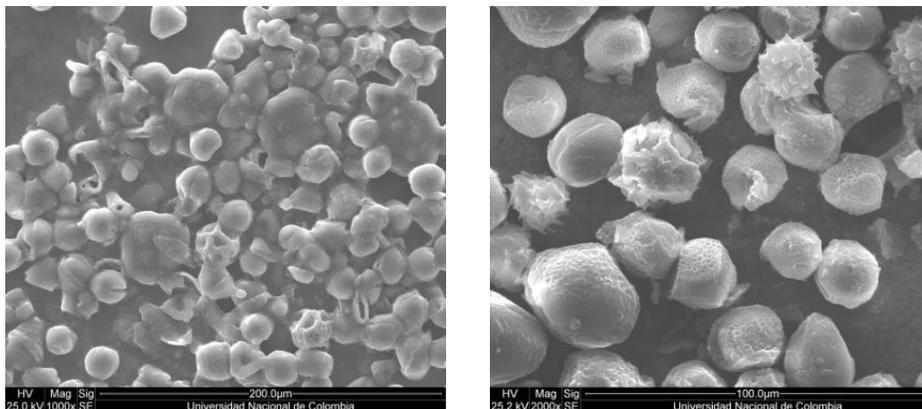


Figura 3-3. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Viscoflow. Magnitud 1000X y 2000X.

Para Suberase (ver Figura 3-4) y Novozym (ver Figura 3-5) puede hacerse un análisis similar al de Viscoflow, a pesar que los valores de entalpía fueron ligeramente superiores a los del polen estéril, las microfotografías SEM permiten observar que la estructura aún se mantiene, infiriéndose así que esta enzima no tuvo mayor efecto sobre la esporopolenina.

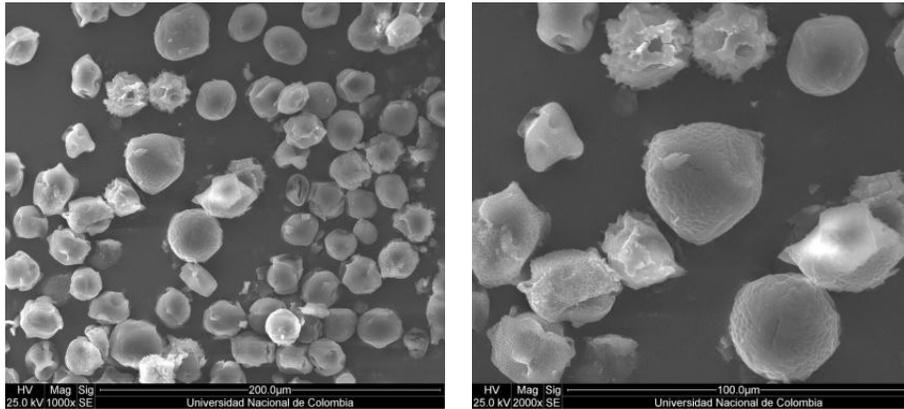


Figura 3-4. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Suberase. Magnitud 1000X y 2000X.

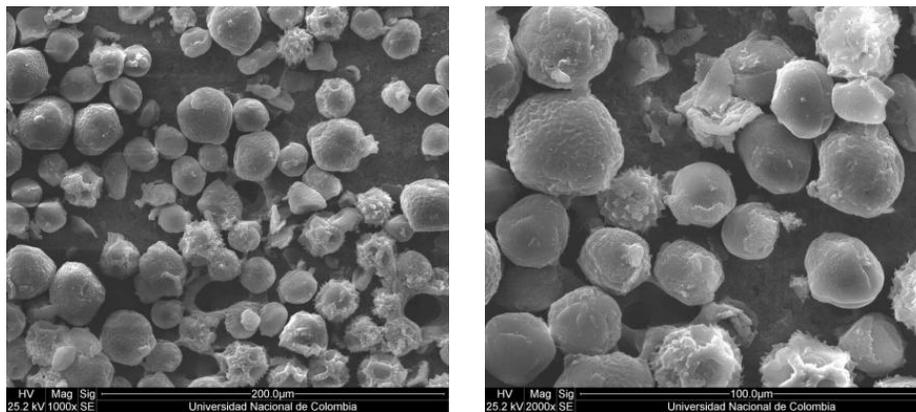


Figura 3-5. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Novozym. Magnitud 1000X y 2000X.

En contraste, para los productos hidrolizados con proteasas, los resultados muestran modificaciones más evidentes, basados en una alteración de la capa externa del grano como es el caso de los pólenes hidrolizados con Alcalase (ver Figura 3-6); entre tanto, los tratamientos con Neutrased y Protamex (ver Figura 3-8) además de esta modificación, mostraron que el producto hidrolizado adquiere una característica pastosa, que podría servir como un indicador de no sólo la degradación de la estructura del polen, sino además de la liberación de los compuestos bioactivos anteriormente mencionados, así como también de ácidos grasos y carbohidratos, que en conjunto podrían favorecer la aparición de esta característica. Estos resultados se relacionan adecuadamente con lo

encontrado en DSC, en donde el tratamiento con mayor entalpía fue Protamex, casi cinco veces superior a la del polen estéril.

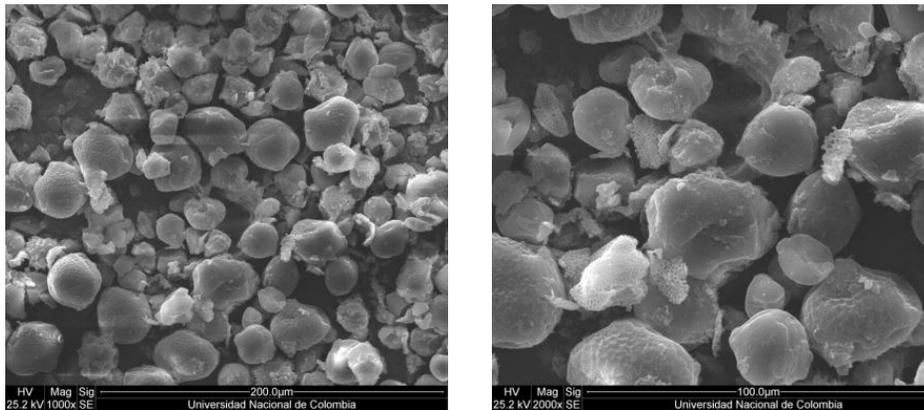


Figura 3-6. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Alcalase. Magnitud 1000X y 2000X.

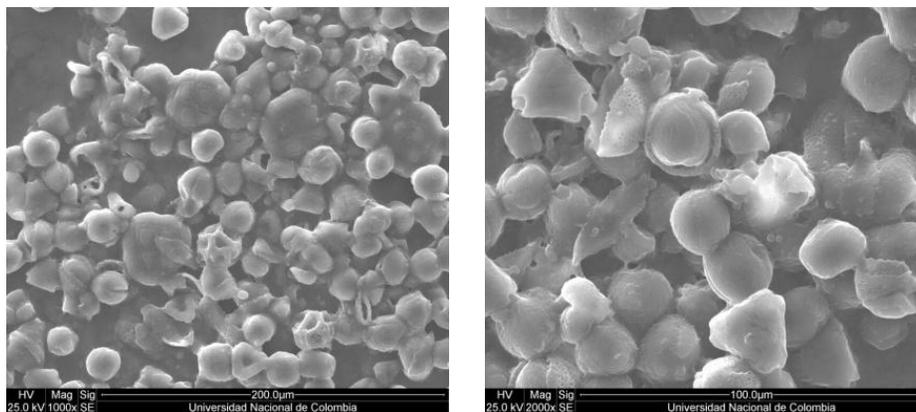


Figura 3-7. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Neutrase. Magnitud 1000X y 2000X.

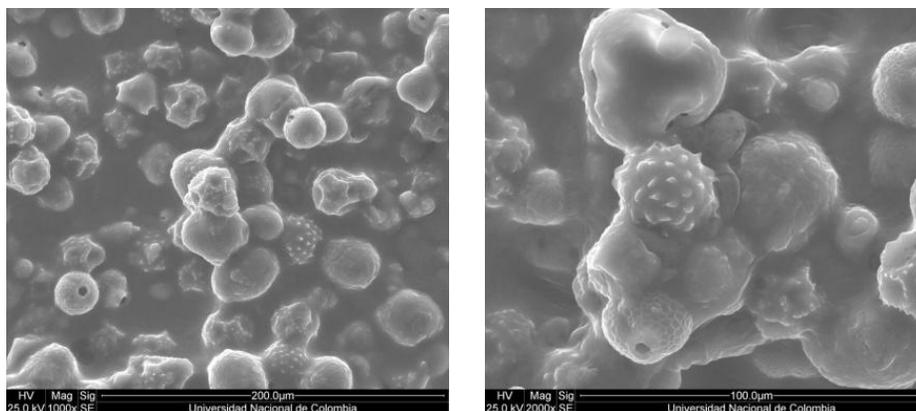


Figura 3-8. Micrografías SEM para polen hidrolizado con Protamex. Magnitud 1000X y 2000X.

3.3.2.2. Efecto de la hidrólisis enzimática sobre las características fisicoquímicas del polen

Para cada variable analizada se calculó el promedio y desviación estándar, los cuales son mostrados en la Tabla 3-2. En lo que respecta al contenido de proteína, pocos estudios reportan el contenido en polen por el método de Bradford, ya que la mayoría emplean el método de Kjeldahl para su cuantificación. En el caso de productos hidrolizados, el método de Bradford puede ser más útil en el sentido que a través de esta técnica es posible cuantificar el contenido de nitrógeno proveniente de proteína, mientras que Kjeldahl cuantifica el nitrógeno total presente en la muestra (Kamizake *et al.*, 2003). Sá Otero *et al.* (Sá Otero *et al.*, 2009) encontraron valores entre 1.0-1.5 mg/g de polen para las especies *Crocus sp*, *Halimium alyssoides*, *Prunus spinosa*. Éste es un valor bajo si se compara con el contenido promedio encontrado para el polen fresco colombiano (2.23 mg/g polen). En cuanto a los pólenes hidrolizados, en general se puede observar un incremento significativo del valor de proteína para todos los tratamientos enzimáticos, con los mayores resultados cuando el polen fue tratado con Neutrased, en cuyo caso se encontraron también diferencias significativas entre las relaciones enzima-sustrato empleadas, siendo mejor con una relación 0.05 g enzima/g sustrato.

Tabla 3-2. Composición bioactiva de polen fresco, estéril e hidrolizado

Producto	Relación enzima / sustrato	Proteína (µg/mg)	Fenoles totales (mg GAE/g)	Flavonoides totales (mg EQ/g)	TEAC (µmol TROLOX/g)	FRAP (µmol TROLOX/g)	Digestibilidad (g/ 100 g)
Polen fresco	-	222.20 ± 1.06 ^B	14.96 ± 2.11 ^A	4.99 ± 1.79 ^A	58.48 ± 15.55 ^A	60.83 ± 19.86 ^A	65.8 ± 10.1 ^A
Polen estéril	-	213.65 ± 1.19 ^A	23.65 ± 0.65 ^C	5.49 ± 0.59 ^A	73.78 ± 14.40 ^{AB}	81.93 ± 18.27 ^{ABCD}	69.4 ± 10.9 ^A
Protamex (Proteasa)	0.01	251.26 ± 1.10 ^{aEF}	30.79 ± 0.36 ^{aE}	9.80 ± 0.49 ^{aE}	96.34 ± 6.97 ^{aC}	100.03 ± 1.35 ^{aD}	83.2 ± 6.5 ^{aA}
	0.05	252.08 ± 1.01 ^{aF}	30.00 ± 0.44 ^{aE}	10.42 ± 0.05 ^{bE}	102.14 ± 14.32 ^{aC}	103.11 ± 2.25 ^{aDE}	80.1 ± 9.3 ^{aA}
Alcalase (Proteasa)	0.01	249.29 ± 1.12 ^{bE}	25.65 ± 0.62 ^{aD}	8.22 ± 0.17 ^{aC}	89.40 ± 3.43 ^{bBC}	90.22 ± 1.78 ^{aB}	77.7 ± 6.2 ^{aA}
	0.05	246.03 ± 1.00 ^{aD}	26.73 ± 2.78 ^{aCD}	8.44 ± 0.35 ^{aC}	81.56 ± 4.08 ^{aB}	96.53 ± 1.20 ^{bC}	79.5 ± 7.8 ^{aA}
Neutrase (Proteasa)	0.01	261.25 ± 1.09 ^{aH}	27.37 ± 2.35 ^{aDE}	9.23 ± 0.31 ^{aCD}	90.80 ± 7.69 ^{aBC}	102.45 ± 2.00 ^{aDE}	82.2 ± 10.7 ^{aA}
	0.05	291.22 ± 1.07 ^{bi}	29.18 ± 0.92 ^{aDE}	9.17 ± 0.17 ^{aD}	89.57 ± 3.76 ^{aBC}	108.97 ± 4.48 ^{bE}	84.3 ± 9.1 ^{aA}
Suberase (Lacasa)	0.01	252.11 ± 1.02 ^{aF}	20.61 ± 0.38 ^{aB}	9.05 ± 0.24 ^{aC}	82.09 ± 3.60 ^{aB}	91.53 ± 2.19 ^{aB}	78.3 ± 6.5 ^{aA}
	0.05	253.21 ± 1.07 ^{aG}	20.39 ± 0.27 ^{aB}	8.55 ± 0.27 ^{aC}	88.82 ± 9.07 ^{aBC}	91.05 ± 1.56 ^{aB}	78.2 ± 3.8 ^{aA}
Viscoflow (β-glucanasa)	0.01	253.14 ± 1.03 ^{bG}	22.63 ± 0.78 ^{aC}	9.09 ± 0.72 ^{aC}	80.04 ± 6.38 ^{aAB}	90.57 ± 2.18 ^{aB}	72.9 ± 7.2 ^{aA}
	0.05	250.02 ± 1.00 ^{aE}	23.56 ± 0.81 ^{aC}	9.47 ± 0.12 ^{aD}	82.95 ± 25.29 ^{aABC}	92.01 ± 0.68 ^{aB}	77.8 ± 8.7 ^{aA}
Novozym (Pectinasa)	0.01	232.82 ± 1.60 ^{aC}	25.66 ± 0.55 ^{aD}	8.03 ± 0.19 ^{aB}	73.45 ± 9.03 ^{aAB}	97.21 ± 2.98 ^{aC}	73.4 ± 6.3 ^{aA}
	0.05	246.20 ± 1.06 ^{bD}	26.90 ± 1.61 ^{aD}	8.19 ± 0.23 ^{aB}	79.76 ± 4.56 ^{aB}	99.92 ± 2.38 ^{aC}	78.4 ± 8.1 ^{aA}

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada variable.

Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre relación enzima-sustrato para cada variable y cada enzima. Por otra parte, en consideración a los productos hidrolizados, se observó una tendencia general hacia la obtención de mayores valores para compuestos bioactivos y actividad antioxidante, por lo que se puede inferir que los tratamientos enzimáticos favorecerían la modificación estructural del grano de polen y la liberación de los componentes de interés. Se realizaron diferentes pruebas t-student para demostrar la existencia de diferencias significativas entre los resultados obtenidos entre las dos relaciones enzima sustrato utilizadas para cada enzima, encontrándose que en el caso de Neutrased y Novozym la relación 5 g / 100 g mostró valores significativamente mayores que la relación 1 g / 100 g, mientras que en Suberased y Protamex no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos para el contenido de proteína. Adicionalmente se observa que el nivel de proteína más bajo se obtuvo para el polen estéril, lo cual permite inferir que el tratamiento térmico redujo en cerca del 14% su valor en comparación al polen fresco. No obstante, se observó que la hidrólisis enzimática favorece un incremento en el contenido de proteína de hasta el 31% si es comparado con el polen fresco, en el caso de Neutrased, por lo que globalmente el proceso es favorable.

Los contenidos de fenoles totales y flavonoides en los productos hidrolizados también mostraron un incremento significativo en comparación al polen fresco ($p < 0.05$). Sin embargo, con respecto al polen tratado térmicamente, el polen hidrolizado con suberased tuvo valores significativamente inferiores ($p < 0.05$) y con viscoflow no tuvo diferencias significativas; mientras tanto el resto de productos sí tuvieron un incremento significativo ($p < 0.05$). Los valores más altos fueron obtenidos con las proteasas Protamex y Neutrased con valores máximos de 30.79 y 29.18 mg EAG/g respectivamente. El análisis estadístico realizado para cada enzima mostró que no se encontraron diferencias significativas entre las dos relaciones enzima sustrato para ninguno de los productos hidrolizados ($p > 0.05$). En este caso es posible observar cómo las proteasas tuvieron un mejor efecto sobre el contenido de compuestos fenólicos que las demás enzimas con otro tipo de especificidad, y a su vez es coherente con lo encontrado en el análisis de proteína, considerando que Protamex y Neutrased fueron las de mejores resultados.

Adicionalmente, los flavonoides totales tuvieron un incremento significativo para todos los tratamientos enzimáticos con valores mayores a los encontrados para el polen fresco y polen estéril, siendo Protamex la enzima con los mejores resultados, y la única con un efecto significativo de la relación enzima sustrato. Luego de Protamex, los productos hidrolizados con mayor contenido de flavonoides fueron los tratados con Neutrased y Viscoflow. Con base en los resultados obtenidos para Protamex, puede establecerse que hubo un incremento en el contenido de flavonoides totales de hasta el 109%. Al igual que lo mencionado para el contenido de compuestos fenólicos, al parecer, una hidrólisis enzimática mediada por enzimas proteolíticas favorece la extracción o liberación de compuestos bioactivos que previo al tratamiento estaban ligados a la estructura externa del polen, lo cual impedía su cuantificación. En el caso particular de las proteasas, Protamex y Neutrased tuvieron los mejores resultados y fueron más exitosas que Alcalase, a pesar que las tres enzimas presentan especificidad para el rompimiento de proteínas, no obstante, Alcalase tiene una preferencia por los sitios grandes residuos carboxilo sin

carga de proteínas y los enlaces pépticos adyacentes a aminoácidos hidrófobos o aromáticos, como la tirosina (Paraman *et al.*, 2007; Rossini *et al.*, 2009; Butré *et al.*, 2014). A pesar que la especificidad de Protamex y Neutrased no están claramente definidas (Dryáková *et al.*, 2010), se sabe que son endoproteasas que se caracterizan por su capacidad para hidrolizar enlaces pépticos internos (Liu *et al.*, 2014), que liberan preferencialmente aminoácido hidrófobos: Fenil alanina, Isoleucina, Leucina, Metionina y Valina. (Dijk *et al.*, 2007).

En lo que respecta a los resultados de actividad antioxidante, las proteasas de nuevo dan los mayores valores en comparación a las demás enzimas. El método TEAC sólo mostró diferencias significativas entre el polen estéril y el hidrolizado con Protamex ($p < 0.05$), para el cual las relaciones enzima sustrato 1 g /100g y 5 g /100g tuvieron valores promedio de 96.34 y 102.14 $\mu\text{mol TROLOX/g}$, sin que exista una diferencia significativa entre ellos. Con excepción de Viscoflow y Novozym, éste último en la relación enzima sustrato 1g / 100g, los demás tratamientos mostraron valores significativamente mayores en comparación al polen fresco. Las pruebas *t-student* para la comparación de las relaciones enzima sustrato para todos los tratamientos de hidrólisis mostraron la ausencia de diferencias significativas en todos los casos ($p > 0.05$). Para Protamex, los incrementos en la actividad antioxidante en comparación al polen fresco fueron de 66% y 76% para las relaciones enzima sustrato 1 g /100g y 5 g /100g, respectivamente.

La actividad antioxidante medida mediante el método de FRAP mostró un incremento significativo para los productos hidrolizados con respecto al polen fresco ($p < 0.05$), sin embargo, los resultados no mostraron diferencias con respecto al polen estéril, con excepción de Neutrased empleando una relación enzima sustrato de 5 g / 100 g, para el cual se obtuvo un valor promedio de 108.97 $\mu\text{mol Trolox/g}$, lo cual indica que con respecto al polen fresco se obtuvo un incremento del 80%. En adición, los tratamientos con Protamex y Neutrased, éste último con una relación enzima sustrato de 1 g / 100 g también mostraron valores altos con promedios de 100.03 y 103.11 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para Protamex y 102.45 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para Neutrased. Las pruebas *t-student* realizadas para cada enzima con respecto a la relación enzima sustrato mostraron diferencias significativas para los tratamientos con Alcalase y Neutrased, con mayores valores de actividad antioxidante para las relaciones enzima sustrato 5 g/ 100 g. En consecuencia, y siguiendo la tendencia encontrada para las demás variables, las proteasas aparentan tener una mayor efectividad en la modificación de la estructura del polen y la eventual liberación de compuestos bioactivos.

Otros hidrolizados de origen vegetal como el maíz (Zheng *et al.*, 2006), girasol (Ren *et al.*, 2010), soya (Cai *et al.*, 2012), germen de trigo (Niu *et al.*, 2013) y nabo (He *et al.*, 2013) como también algunas proteínas de origen animal como leche (Pihlanto, 2006) y huevo (Huang *et al.*, 2010) han mostrado características antioxidantes cuando se emplean proteasas. Las propiedades antioxidantes de los hidrolizados o péptidos dependen ampliamente de la especificidad de la enzima, grado de hidrólisis, y la naturaleza de los péptidos incluyendo la distribución de peso molecular (Sarmadi and Ismail, 2010).

En el caso de polen, Xiaobo *et al.* (Xiaobo *et al.*, 2007) encontró que las glutelinas y albúminas son las proteínas predominantes en el polen, comprendiendo entre el 55.7% y 39.0% de las proteínas totales, mientras que las globulinas y prolaminas fueron de 3.2% y 2.1%, respectivamente. Protamex y Neutrased ya han probado su eficacia en la hidrólisis de glutelina como lo reporta Zheng *et al.* (Zheng *et al.*, 2015) y Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 2013), mientras que Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2009b) encontró útil el empleo de Neutrased para la hidrólisis de la proteína de cáñamo, compuesta principalmente de glutelinas y albúminas.

Finalmente, en el caso de digestibilidad no se encontraron diferencias significativas entre el polen estéril y los productos hidrolizados ($p > 0.05$). Tampoco fue posible encontrar diferencias en los resultados entre relaciones enzima sustrato para cada una de las enzimas probadas en el estudio. La alta variabilidad de los resultados hace que en parte se dificulte la posibilidad de establecer diferencias significativas a través de la estadística. No obstante, es posible observar una tendencia hacia encontrar mayores valores promedio de digestibilidad en los productos hidrolizados, en particular Protamex y Neutrased en ambas relaciones enzima sustrato, lo cual puede ser un indicador de lo encontrado en las variables anteriormente comentadas, así como en el comportamiento de su estructura. El valor más alto fue el descrito para Neutrased en la relación enzima sustrato 5 g / 100 g, con un promedio de 84.3 g / 100 g de proteína, que representa un 29% más alto que el polen fresco.

Por otra parte, la composición de aminoácidos se presenta en la Tabla 3-3. En general, se observa que los hidrolizados tienen una mayor composición de aminoácidos que el polen fresco. Las proteasas Neutrased, Protamex y Alcalase han mostrado mayores valores para casi todos los aminoácidos medidos, excepto prolina. Con respecto a los otros productos hidrolizados con Novozym y Viscoflow, se observa que en comparación a las proteasas poseen menores valores en serina, glicina, fenil alanina e isoleucina. Finalmente, se observa que la hidrólisis con Viscoflow no afectó de manera notoria ningún aminoácido, confirmando que ésta enzima no tuvo efecto sobre la estructura del polen. Estos resultados son coherentes con respecto al contenido total de proteína encontrado para estos hidrolizados por el método de Bradford, donde se encontraron mayores valores para proteína en los productos hidrolizados con proteasas, en comparación al polen fresco.

Koo *et al.* (Koo *et al.*, 2014) reportaron que los aminoácidos hidrofóbicos como prolina, glicina, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina y fenil alanina se incrementaron cuando trigo fueron tratado con Protamex para la obtención de un producto hidrolizado. En adición, los aminoácidos triptófano, tirosina, histidina, leucina, prolina y cisteína han sido reportados por exhibir actividades antioxidantes y capacidad para quelar metales (Chen *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2001), con lo cual podría sugerirse que el incremento en la actividad de la capacidad antioxidante de los productos hidrolizados con respecto al polen fresco es debido en parte al aumento en los aminoácidos libres.

Tabla 3-3. Perfil de aminoácidos para el polen fresco, polen estéril y productos hidrolizados

Aminoácido	(g/100 g proteína)						
	Polen Esteril	Neutrased	Protamex	Novozym	Alcalase	Viscoflow	Suberased
Asp	2.49	3.68	3.76	2.68	3.60	2.54	3.15
Glu	2.89	4.17	4.39	3.54	4.14	2.71	3.76
Ser	1.36	2.03	2.02	1.85	1.96	1.32	1.82
His	0.41	0.96	0.57	0.64	0.60	0.38	0.94
Gly	1.25	1.60	1.80	0.93	1.74	1.32	1.46
Thr	1.19	1.99	1.96	1.96	1.78	1.15	1.76
Arg	1.41	2.22	1.51	1.46	1.91	1.43	2.13
Ala	1.43	1.78	2.01	1.96	1.95	1.47	1.63
Tyr	0.78	1.53	1.36	1.47	1.31	0.70	1.51
Val	1.24	1.40	1.82	0.95	1.72	1.30	1.45
Phe	1.21	1.92	2.05	0.95	1.90	1.26	0.93
Ile	1.09	1.55	1.80	1.37	1.71	1.15	0.93
Leu	1.87	2.67	3.06	2.34	2.88	1.78	1.59
Lys	0.94	1.64	1.30	1.45	1.68	0.89	0.95
Pro	1.35	1.39	1.33	0.90	1.57	1.42	1.23

En síntesis, puede verse cómo los resultados de DSC, SEM y los obtenidos mediante el análisis fisicoquímico se complementan entre sí. Los productos hidrolizados con mayores modificaciones en su estructura fueron Protamex y Neutrased, que a su vez son los que reportan los incrementos más altos en proteína, compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Podría plantearse la hipótesis que el tratamiento térmico degradó en una medida suficiente la exina lo cual pudo ocasionar fisuras en la capa externa del polen, por donde las enzimas pudieron ingresar al grano e hidrolizar parte de la proteína que se encontraba dentro. Como consecuencia, una liberación de aminoácidos incrementó la capacidad antioxidante y la proteína del polen. Adicionalmente, la modificación de las proteínas podría haber alterado algunos enlaces que poseen con compuestos fenólicos, quedando éstos últimos libres, lo cual explicaría el incremento en la medición. Se sabe que en los alimentos la interacción proteína-compuestos fenólicos existe y se altera fácilmente por diversos aspectos tales como temperatura, pH o modificación de la estructura de las proteínas (Rawel *et al.*, 2005). Las diferencias significativas de las variables mencionadas con respecto al polen estéril permiten establecer que las enzimas ocasionan una modificación adicional sobre el polen, lo que demuestra la conveniencia de una integración del proceso físico de la esterilización con el biotecnológico de la hidrólisis para la obtención de un producto con características bioactivas mejoradas.

3.3.2.3. Análisis global de datos y selección del mejor tratamiento

Un Análisis de Componentes Principales fue realizado incluyendo los pólenes hidrolizados y el polen estéril. Tanto el *score plot* como el *loading plot* son presentados en la Figura 3-9 y Figura 3-10, respectivamente.

Los dos primeros componentes principales explican cerca del 83% de la varianza total de los datos. Se puede observar una evidente diferencia entre las características bioactivas del polen estéril en comparación al polen hidrolizado. Los productos hidrolizados con Viscoflow y Suberase tuvieron un incremento apreciable en el contenido de proteína y flavonoides; sin embargo, la distribución de las muestras a lo largo de la parte positiva del primer componente principal permite establecer que los productos hidrolizados con Protamex y Neutrased fueron aquellos con las mejores características bioactivas en general.

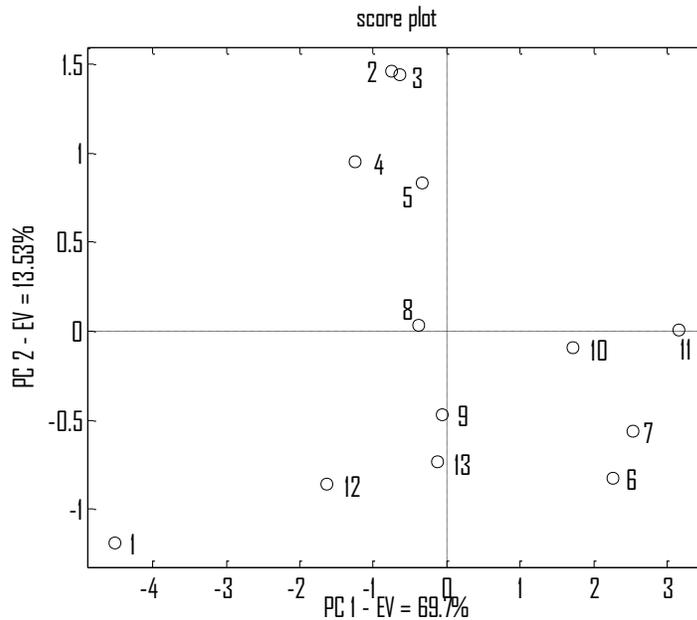


Figura 3-9. *Score plot* de los productos hidrolizados

1. Polen estéril, 2. Suberase 1g/100g, 3. Suberase 5g/100g, 4. Viscoflow 1g/100g, 5. Viscoflow 5g/100g, 6. Protamex 1g/100g, 7. Protamex 5g/100g, 8. Alcalase 1g/100g, 9. Alcalase 5g/100g, 10. Neutrased 1g/100g, 11. Neutrased 5g/100g, 12. Novozym 1g/100g, 13. Novozym 5g/100g.

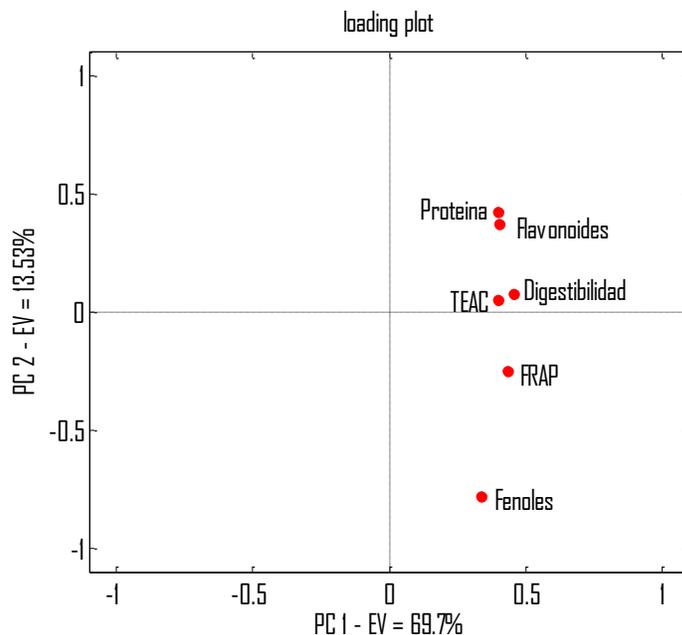


Figura 3-10. Loading plot de los productos hidrolizados

También es posible encontrar una relación entre el incremento del contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante FRAP y TEAC a partir de su ubicación vecina en el cuarto cuadrante del *loading plot*. Es importante mencionar que los ácidos hidroxicinámicos tales como ácido ferúlico y p-cumárico están ligados a la esporopolenina en la pared celular del polen (Rozema *et al.*, 2001). Cuando la hidrólisis sucede, una eventual liberación de los compuestos fenólicos podría ocurrir, por lo que se incrementa el valor reportado para estas sustancias, con base al método de Folin Ciocalteu, y en consecuencia, se obtiene un incremento en la capacidad antioxidante del producto.

Por otra parte, la técnica de ordenación total permitió seleccionar los mejores tratamientos de hidrólisis, los cuales son presentados en la Tabla 3-4. A partir de estos modelos, el tratamiento con Neutraxe en una relación enzima sustrato 5 g/100 g resultó la mejor. Protamex tuvo menores valores para FRAP y proteína, mientras Neutraxe mostró menores valores para compuestos fenólicos, flavonoides y TEAC. De acuerdo a la escala de deseabilidad propuesta por Harrington (Harrington, 1965), que va desde cero (completamente inaceptable) a uno (mejor punto), los valores entre 0.8 y 1 son "aceptables y excelentes" (Canobbio *et al.*, 2008); es así que tanto Protamex como Neutraxe en relación enzima sustrato 5 g /100 g serían enzimas útiles en el rompimiento de la exina de polen y en la eventual modificación del producto en un alimento con características bioactivas incrementadas en comparación al polen estéril. Se considera que el nivel de aceptabilidad de un modelo de conveniencia y utilidad para un producto está en el límite con valores entre 0.63 y 0.8, por lo que los tratamientos con Neutraxe y Protamex con relaciones enzima sustrato 1g / 100g podrían considerarse también efectivos. El resto de enzimas tuvieron bajos valores, y por ende, serían inaceptables en términos de eficiencia para la hidrólisis.

Tabla 3-4. Valores de conveniencia y utilidad a partir de la técnica de ordenamiento total.

Producto	Relación enzima / sustrato	Conveniencia	Utilidad	Posición
Polen estéril	-	0.000	0.350	13
Suberase	0.01	0.340	0.471	12
	0.05	0.341	0.520	10
Viscoflow	0.01	0.440	0.575	9
	0.05	0.600	0.694	5
Protamex	0.01	0.838	0.875	3
	0.05	0.862	0.894	2
Alcalase	0.01	0.454	0.625	8
	0.05	0.607	0.679	6
Neutrase	0.01	0.626	0.806	4
	0.05	0.988	0.988	1
Novozym	0.01	0.250	0.505	11
	0.05	0.597	0.678	7

Los resultados obtenidos permitieron definir que las proteasas serían las más efectivas para la hidrólisis de polen que las demás enzimas ensayadas en este estudio. Se realizaron diferentes pruebas utilizando pectinasa (Novozym), carbohidrasa (Viscoflow) y lacasa (Suberase), en las que a pesar de encontrar cambios notables en la composición bioactiva del polen y actividad antioxidante, no fueron tan efectivas como las proteasas. En particular, los resultados de la hidrólisis con lacasa no fueron satisfactorios, cuando era de esperarse un mejor resultado considerando que la estructura de la esporopolenina contiene compuestos fenólicos. Es también importante resaltar que el modelo de ordenación total excluye Alcalase debido a los resultados inferiores para compuestos bioactivos y actividad antioxidante, a pesar de tener valores aceptables en el contenido de proteína.

3.3.3. Fermentación de polen

Inicialmente, se presentan los resultados de fermentación de polen empleando cultivos comerciales con BAL y luego levaduras. En una segunda parte se muestran los resultados de fermentación con mezcla de cultivos de bacterias y levaduras.

3.3.3.1. Fermentación de polen con cultivos individuales

3.3.3.1.1. Fermentación con BAL

3.3.3.1.1.1. Efecto de la fermentación sobre la estructura del grano de polen

A continuación se presentan los resultados de los análisis realizados sobre los productos fermentados mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) sobre los productos fermentados con una relación polen:agua 1:1.

Calorimetría Diferencial de Barrido

Inicialmente, en la Figura 3-11 se presenta el resultado de DSC a las muestras fermentadas con BAL. Es posible observar que en comparación tanto al polen estéril y pan de abejas, los productos fermentados con BAL tienen una mayor entalpía (ver Tabla 3-1), lo cual podría sugerir una modificación en la estructura del polen por la degradación de la exina.

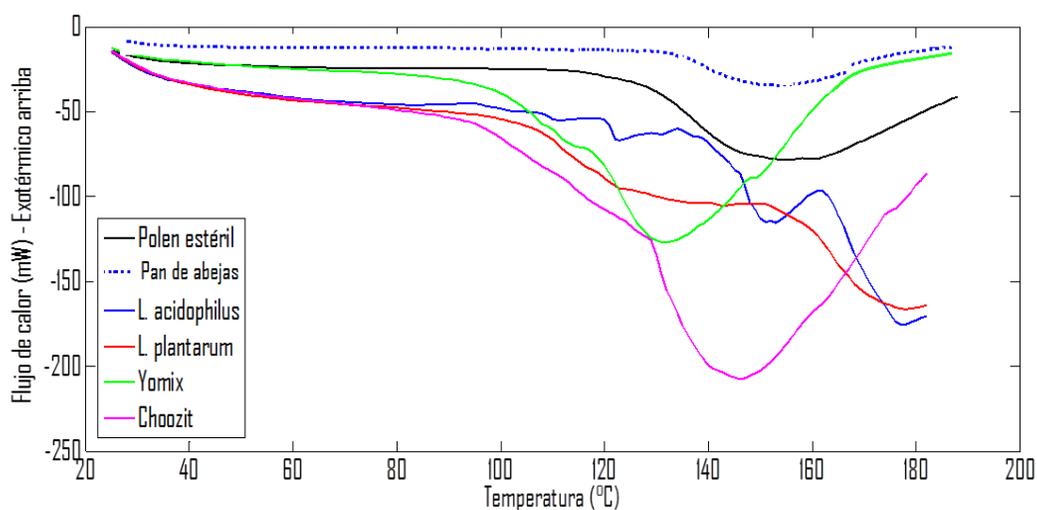


Figura 3-11. DSC de polen estéril y polen fermentado con BAL

La temperatura en la que ocurre el máximo flujo de calor es variable y depende del tipo de cultivo empleado, no obstante se puede establecer que en los cultivos comerciales empleados esta temperatura se ubicó entre 132 y 146°C, con la mayor entalpía obtenida para Choozit®. Entre tanto, para las cepas ATCC particularmente *L. plantarum* y *L. acidophilus* se observó un flujo máximo de calor a temperaturas cercanas a 180°C; esta diferencia con respecto a los cultivos comerciales podría deberse a que éstos últimos son una combinación de microorganismos que actúan de manera sinérgica haciendo que el polen fermentado sufra una modificación estructural más intensa en comparación al

proceso realizado por un sólo microorganismo, que a pesar de también lograr una alteración de la estructura del polen, puede no alcanzar la misma efectividad.

Tabla 3-1. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con BAL

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen estéril	155	192.5
Pan de abejas	150	50.2
<i>L. plantarum</i>	178	112.4
<i>L. acidophilus</i>	177	89.2
Yomix	132	295.7
Choozit	146	485.2

Microscopía Electrónica de Barrido

Diferentes microfotografías SEM fueron tomadas a los productos fermentados, las cuales se presentan en las Figuras 3-12 a 3-15 para Choozit®, Yomix®, *L. acidophilus* y *L. plantarum* respectivamente, en una relación polen:agua 1:1. En general, se puede observar el mantenimiento de la estructura de los granos de polen, sin embargo, la comparación con los resultados de las entalpías por DSC muestran un incremento con respecto al polen estéril. Esto podría indicar, que la ligera modificación de la esporopolenina luego de la esterilización fue suficiente para que los microorganismos se adaptaran y pudieran realizar el proceso fermentativo, que como resultado tuvo una alteración adicional en la estructura del polen, que en términos de entalpía fue 2.5 veces superior a la de la esterilización para el caso de fermentación con Choozit®. No obstante, una comparación con los resultados de hidrólisis enzimática permite establecer que a nivel de modificación estructural, las proteasas fueron más efectivas.

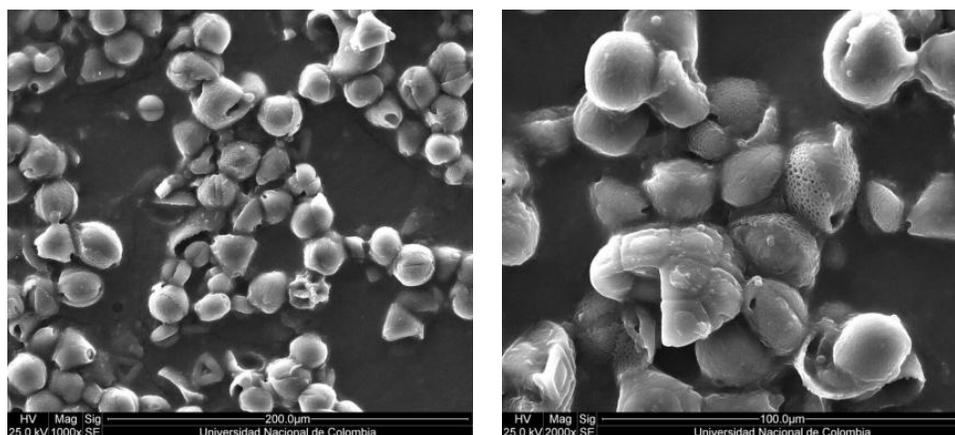


Figura 3-12. Microfotografías SEM para polen fermentado con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.

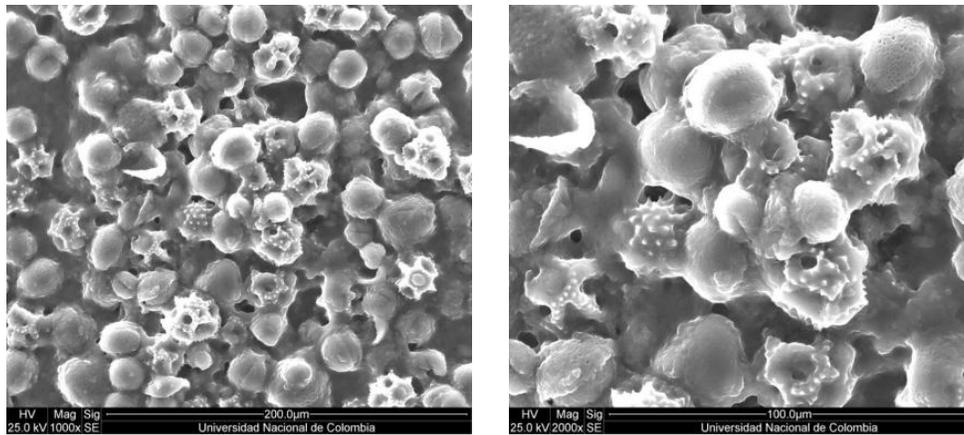


Figura 3-13. Microfotografías SEM para polen fermentado con Yomix®. Magnitud 1000X y 2000X.

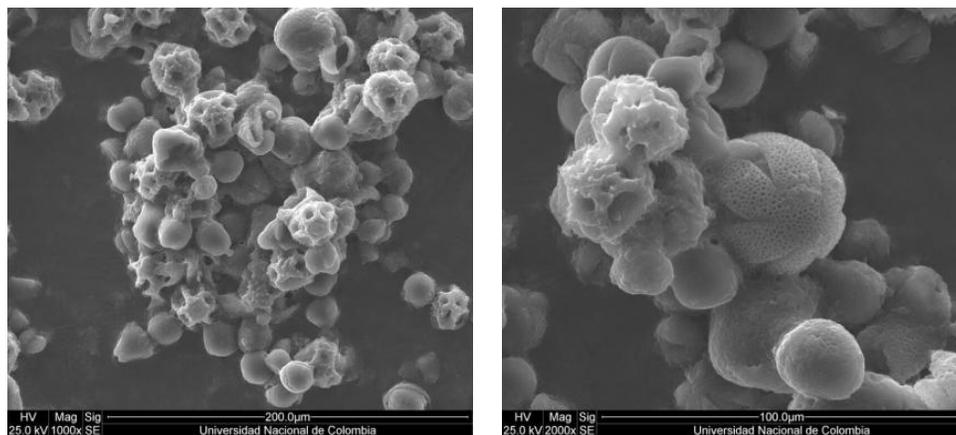


Figura 3-14. Microfotografías SEM para polen fermentado con *L. plantarum*. Magnitud 1000X y 2000X.

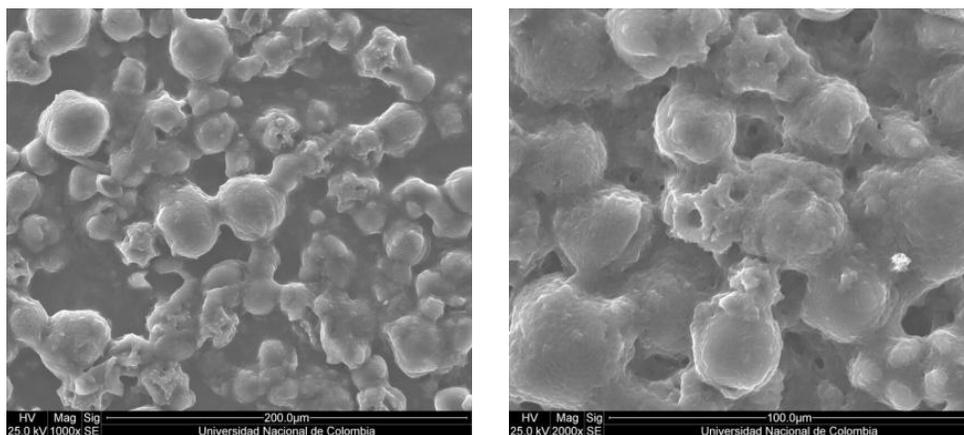


Figura 3-15. Microfotografías SEM para polen fermentado con *L. acidophilus*. Magnitud 1000X y 2000X.

3.3.3.1.1.2. Seguimiento de la fermentación

El monitoreo de las fermentaciones con BAL es mostrado en las Figuras 3-16 a 3-19. En la Figura 3-16 se realiza un seguimiento a la acidez producida y el conteo de microorganismos viables en la fermentación con cultivo Choozit®, en el cual se observa que el bioproceso realizado con una relación de sustrato polen:agua 1:1 alcanza la mayor producción de acidez hasta valores de 200 meq/kg, y de igual manera, son las condiciones donde se mantuvo la población de microorganismos en valores cercanos a 8 \log_{10} (UFC/g). Bajo las tres condiciones de fermentación ensayadas, se observó que la cantidad de BAL viables presentes en los sustratos disminuyó con el tiempo, para luego volver a tener crecimiento, lo cual es un indicador de una fase de adaptación al sustrato que osciló entre 12 h para el sustrato polen:agua 1:1 y 48 h para las otras dos condiciones. En este caso, se puede inferir que el contenido de agua afecta de manera directa tanto la viabilidad de las BAL presentes en el cultivo comercial, como la producción de acidez. Un resultado similar para el contenido de acidez fue encontrado con la fermentación realizada con el cultivo Yomix® (ver Figura 3-17), sin embargo, la población de células viables descendió a valores entre 5 y 7 \log_{10} (UFC/g) al final del proceso, sin que mostrara una recuperación como sí fue encontrada en el caso de la fermentación con Choozit®.

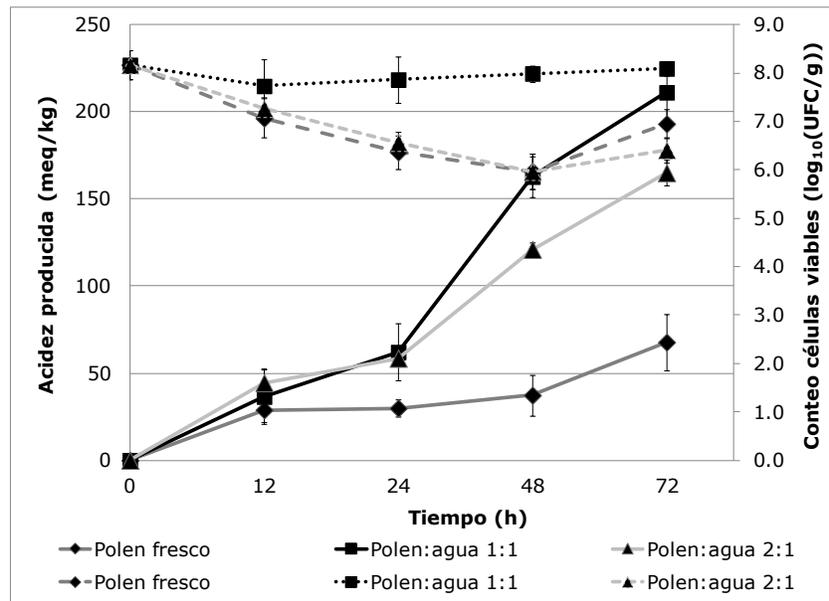


Figura 3-16. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con Choozit®.

Líneas continuas: acidez producida. Líneas punteadas: Conteo células viables.

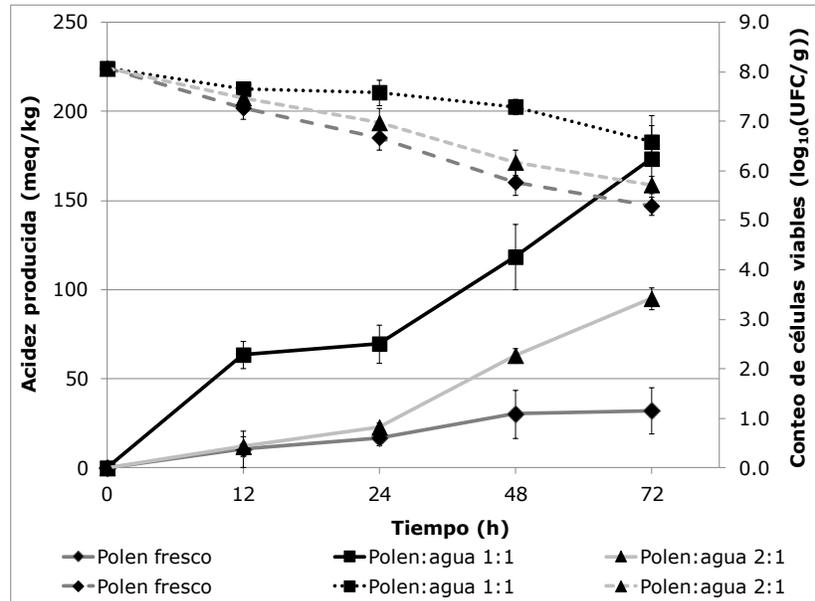


Figura 3-17. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con Yomix®

Líneas continuas: acidez producida. Líneas punteadas: Conteo células viables

En lo que respecta a la fermentación realizada con *L. plantarum*, las fermentaciones realizadas con relaciones los sustratos polen:agua 2:1 y 1:1 no mostraron diferencias significativas en la producción de acidez (ver Figura 3-18), pero esta última relación no sólo mantuvo la población de microorganismos viables por encima de 8 log₁₀(UFC/g), sino que alcanzó valores cercanos a 9 log₁₀(UFC/g) al final de la fermentación. Al igual que en las fermentaciones realizadas con los cultivos comerciales, el agua disponible aparenta favorecer el bioproceso. En contraste, las fermentaciones realizadas con la cepa *L. acidophilus* arrojaron los valores de acidez más bajos, por debajo de 100 meq/kg (ver Figura 3-19), con un mayor rendimiento en la relación polen:agua 2:1. En cuanto al seguimiento del número de LAB viables a lo largo del bioproceso, hubo una disminución progresiva a lo largo del tiempo, con una recuperación en la población luego de 48 h.

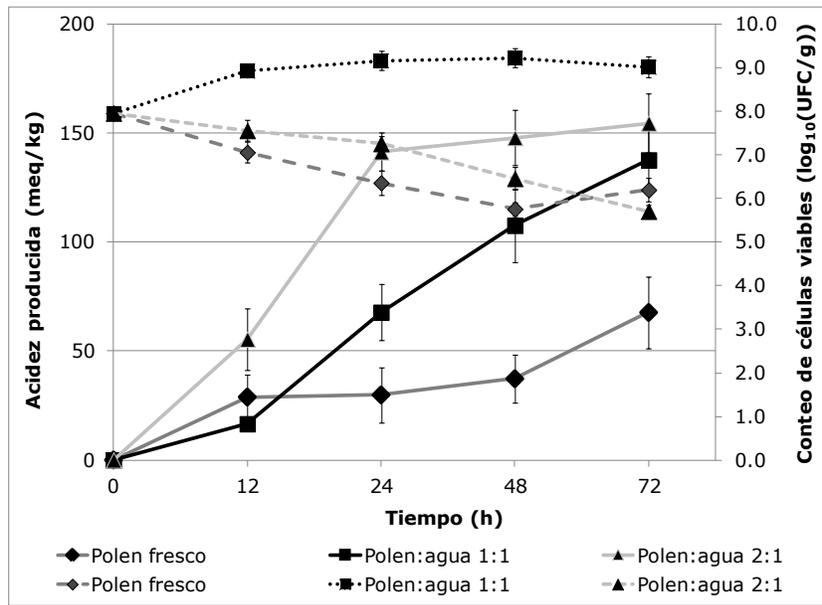


Figura 3-18. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con *L. plantarum*

Líneas continuas: acidez producida. Líneas punteadas: Conteo células viables

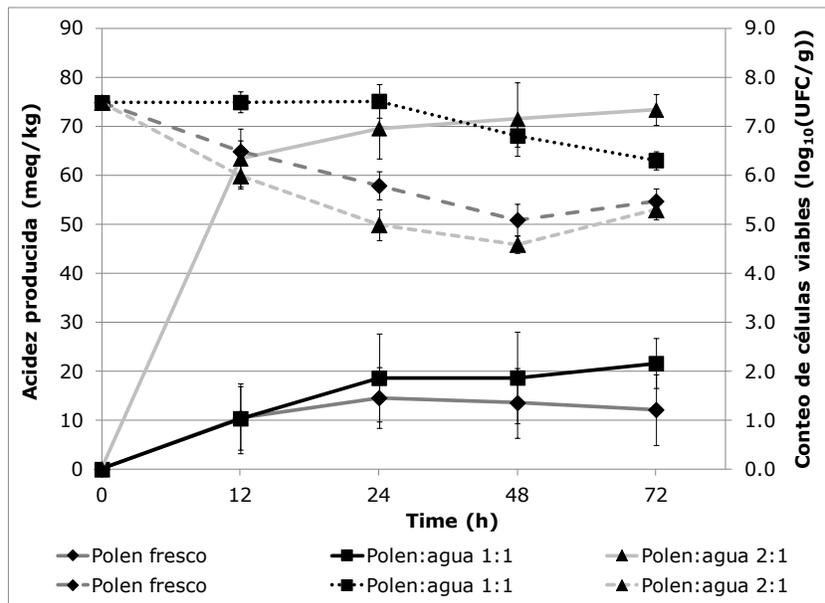


Figura 3-19. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con *L. acidophilus*

Líneas continuas: acidez producida. Líneas punteadas: Conteo células viables

3.3.3.1.1.3. Resultados de la fermentación

En la Tabla 3-2 se presentan los resultados de la fermentación de cada cultivo de bacterias acidolácticas a las tres relaciones polen:agua investigadas.

Tabla 3-2. Resultados de fermentación con BAL

Análisis	Sustrato	Cultivo			
		<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>	Choozit®	Yomix®
Células viables \log_{10} (UFC/g)	Polen	6.20 ± 0.27 ^{Bb}	5.48 ± 0.25 ^{Aa}	6.95 ± 0.30 ^{Ba}	5.29 ± 0.19 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	5.71 ± 0.14 ^{Ba}	5.30 ± 0.19 ^{Aa}	6.41 ± 0.26 ^{Ca}	5.72 ± 0.18 ^{Bb}
	Polen:agua 1:1	9.02 ± 0.24 ^{Cc}	6.31 ± 0.19 ^{Ab}	8.09 ± 0.15 ^{Bb}	6.59 ± 0.34 ^{Ac}
Acidez producida (meq/kg)	Polen	67.73 ± 23.64 ^{Ca}	12.16 ± 3.13 ^{Aa}	67.73 ± 7.09 ^{Ca}	32.16 ± 6.11 ^{Ba}
	Polen:agua 2:1	154.65 ± 46.36 ^{BCb}	73.44 ± 14.18 ^{Ac}	165.02 ± 15.92 ^{Cb}	95.03 ± 24.59 ^{ABb}
	Polen:agua 1:1	137.72 ± 24.30 ^{Bb}	21.64 ± 5.14 ^{Ab}	211.05 ± 15.64 ^{Cc}	173.44 ± 12.90 ^{Bc}
pH	Polen	3.95 ± 0.05 ^{Cb}	3.97 ± 0.03 ^{Ca}	3.61 ± 0.04 ^{Aa}	3.79 ± 0.04 ^{Bb}
	Polen:agua 2:1	3.84 ± 0.08 ^{Bab}	4.01 ± 0.04 ^{Ca}	3.57 ± 0.04 ^{Aa}	3.62 ± 0.07 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	3.77 ± 0.08 ^{Ba}	3.98 ± 0.02 ^{Ca}	3.71 ± 0.03 ^{Bb}	3.64 ± 0.02 ^{Aa}
Productividad máxima (g ELA /kg*h)	Polen	0.25 ± 0.09 ^{Ca}	0.05 ± 0.01 ^{Aa}	0.25 ± 0.03 ^{Ca}	0.12 ± 0.02 ^{Ba}
	Polen:agua 2:1	0.58 ± 0.17 ^{BCb}	0.28 ± 0.05 ^{Ab}	0.62 ± 0.06 ^{Cb}	0.36 ± 0.09 ^{ABb}
	Polen:agua 1:1	0.52 ± 0.09 ^{Bb}	0.08 ± 0.02 ^{Aa}	0.79 ± 0.06 ^{Cc}	0.65 ± 0.05 ^{Bc}
Rendimiento (g ELA/kg)	Polen	6.10 ± 2.13 ^{Ca}	1.09 ± 0.28 ^{Aa}	6.10 ± 0.64 ^{Ca}	2.89 ± 0.55 ^{Ba}
	Polen:agua 2:1	13.92 ± 4.17 ^{BCb}	6.61 ± 1.28 ^{Ac}	14.85 ± 1.44 ^{Cb}	8.55 ± 2.21 ^{ABb}
	Polen:agua 1:1	12.40 ± 2.19 ^{Bb}	1.95 ± 0.46 ^{Ab}	18.99 ± 1.41 ^{Cc}	15.61 ± 1.16 ^{Bc}

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre cultivos para cada análisis dentro de un mismo sustrato.

Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada análisis y cada cultivo.

ELA: Equivalentes de ácido láctico.

Rendimiento = (Acidez producida * Peso molecular ácido láctico [90 g/mol]) / 1000.

Productividad máxima = rendimiento/tiempo máxima acidez producida

Los cultivos con las diferentes relaciones de sustrato alcanzaron valores de células a las 72 h de proceso que oscilan entre 5.3 y 9.0 \log_{10} (UFC/g). En general, las BAL ATCC tuvieron un mayor crecimiento con la relación polen-agua 1:1, sin embargo, eso no se vio reflejado en la producción de ácido, a diferencia de los cultivos comerciales en los que se observa un alto crecimiento y una mayor producción de ácido. Los tratamientos con sustratos de polen y polen agua 2:1 mostraron una baja producción de acidez y una reducción del número final de microorganismos viables. Esto refleja el hecho que la fermentación de polen requiere una cierta cantidad de agua para mejorar las condiciones

de viabilidad de la cepa empleada, ya que esto favorece el consumo de glúcidos, lo cual concuerda con lo mencionado por Vamanu (Vamanu *et al.*, 2006). En contraste, las fermentaciones con Yomix® y *L. acidophilus* sólo alcanzaron conteos de células viables máximo de $6.5 \log_{10}(\text{UFC/g})$, al final del proceso. Fuenmayor encontró que después de 24 horas la viabilidad celular del cultivo *L. acidophilus* empieza a descender (Fuenmayor, 2009). Adicionalmente, los resultados de células viables para las levaduras fueron altamente contrastantes entre el cultivo comercial y el ATCC, sin encontrarse diferencias significativas entre las diferentes relaciones de sustrato empleadas ($p > 0.05$), con valores máximos de 7.82 ± 0.07 y $3.61 \pm 0.47 \log_{10}(\text{UFC/g})$, respectivamente.

La mayor acidez producida fue encontrada para los cultivos Choozit® y *L. plantarum* cuando se empleó el sustrato polen:agua 1:1. La producción de acidez fue variable, siendo baja para *L. acidophilus* entre 12 y 73 meq/kg, y alta para Choozit® entre 67 y 211 meq/kg. El hecho que el cultivo Choozit® haya presentado un mayor crecimiento y producción de ácido comparado con el cultivo Yomix®, indica que existe una mayor sinergia entre la combinación de microorganismos presentes en el primer cultivo. Esto permite un crecimiento más acelerado en un mismo lapso de tiempo, lo que indica una adaptación más rápida al medio. La diferencia entre ambos cultivos es la inclusión de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. lactis en Choozit®. Este microorganismo entonces ejercería un efecto positivo sobre la fermentación. La ssp. lactis puede ser distinguida fenotípicamente de la ssp. bulgaricus por su más extensa capacidad de metabolizar carbohidratos, incluyendo aquellos de origen vegetal como maltosa, manosa, sacarosa y trehalosa (Kafsi *et al.*, 2014).

La diferencia en la cantidad de biomasa generada por las dos bacterias ATCC *L. plantarum* y *L. acidophilus* se debe principalmente a la ruta metabólica seguida: *L. acidophilus* es una bacteria homofermentativa, que utiliza preferentemente 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 hexosa-monofosfato (Hexose Monophosphate Shunt - HMS) en la cual utilizan hexosas pero también pueden utilizar pentosas (Nielsen *et al.*, 2003). Al tener una mayor disponibilidad de nutrientes, *L. plantarum* tiene más posibilidades de aumentar su biomasa realizando el bioproceso de forma más efectiva y aprovechando mejor los nutrientes (Salazar, 2014). Igualmente, es un microorganismo que puede tolerar valores de pH inferiores a los de la mayoría de bacterias, por lo que su tiempo de supervivencia en el sustrato es mayor. Esta tendencia ya ha sido encontrada en ensilajes de productos vegetales tales como el maíz, que posee diferentes fuentes de carbono complejas (Ortiz, 2007).

Por otra parte, los valores de pH oscilaron entre 3.57 y 4.01 encontrándose una ligera reducción con respecto al polen fresco (4.16), pero similar al pan de abejas (3.90). La baja variabilidad del pH refleja que este es un indicador poco adecuado para el seguimiento de una reacción de este tipo debido a la alta complejidad de la composición del sustrato que involucra una gran diversidad de especies químicas como sales minerales y orgánicas,

ácidos orgánicos, etc., que además de sufrir cambios debido al metabolismo bacteriano, son capaces de generar equilibrios químicos que conllevan a la formación de *buffers* que imposibilitan correlacionar directamente la lectura de pH con el aumento de la concentración de ácidos en el medio (Fuenmayor, 2009).

Finalmente, en este estudio se realizó el cálculo de la productividad máxima y el rendimiento. La productividad máxima (expresada como g equivalentes de ácido láctico producido por kg de materia seca de sustrato por hora) fue de 0.79 ± 0.06 g ELA/kg*h para el cultivo Choozit® con una relación polen:agua 1:1 el valor obtenido más alto para todas las combinaciones de sustrato y cultivos empleados. De manera contraria, la productividad máxima para la fermentación con *L. acidophilus* fue de 0.28 ± 0.05 g ELA/kg*h, presentando los resultados más bajos entre todas las BAL utilizadas.

3.3.3.1.1.4. Efecto de la fermentación sobre el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Los resultados de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de la fermentación con BAL son mostrados en la Tabla 3-3. En lo que respecta al contenido de compuestos fenólicos, los pólenes fermentados con *L. plantarum* y *L. acidophilus* no presentaron diferencias significativas entre los tres sustratos empleados. En caso contrario, los productos fermentados con los cultivos comerciales Choozit® y Yomix®, mostraron un contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos cuando se empleó la relación polen:agua 1:1. En particular, el valor más alto fue encontrado para el polen fermentado con Choozit (20.13 ± 0.80 mg EAG/g). Sin embargo, una prueba t-student demuestra que el valor de compuestos fenólicos en el polen fermentado es estadísticamente menor al del polen tratado térmicamente (23.65 ± 0.65 mg EAG/g) ($p < 0,05$); a pesar de esto, de forma global se alcanza un aumento en el contenido de este compuesto activo si es comparado con el polen fresco (14.96 ± 2.11 mg EAG/g). Esto indica que el rompimiento de la exina facilita la salida de compuestos bioactivos con alta capacidad antiradicalaria, que al quedar expuestos a condiciones medioambientales comunes tales como oxígeno o luz, son fácilmente degradados.

Por otra parte, los flavonoides totales mostraron un mayor valor en los pólenes fermentados con cultivos comerciales; el contenido para Choozit® y Yomix® osciló entre 3.00 y 3.93 mg EQ/g, no siendo significativamente diferentes para los distintos tratamientos, con excepción de la fermentación con Choozit® con relación polen:agua 1:1 que alcanzó el mayor valor (3.93 ± 0.06 mg EQ/g). En lo que respecta a las fermentaciones con cepas ATCC, el polen fermentado con *L. plantarum* en una relación 1:1 también fue el que mostró el contenido de flavonoides significativamente más alto (3.23 ± 0.05 mg EQ/g). Los pólenes fermentados con *L. acidophilus* tienen los valores más bajos, entre 2.11 y 2.57 mg EQ/g. El contenido de flavonoides totales de los pólenes fermentados con Choozit® y *L. plantarum* en una relación 1:1 no son estadísticamente diferentes a los reportados para polen fresco (4.99 ± 1.79 mg EQ/g) ($p = 0.27$ y $p = 0.54$,

respectivamente) y pan de abejas (3.73 ± 0.40 mg EQ/g) ($p=0.36$ y $p=0.17$, respectivamente), sin embargo si son estadísticamente inferiores al polen tratado térmicamente (5.49 ± 0.59 mg EQ/g) ($p<0.05$).

Tabla 3-3. Contenido bioactivo y actividad antioxidante de los productos fermentados

Análisis	Sustrato	Cultivo			
		Choozit	Yomix	<i>L. plantarum</i>	<i>L. acidophilus</i>
Fenoles totales (mg EGA/g)	Polen estéril	19.32 ± 0.25^{Db}	13.55 ± 0.18^{Aa}	13.48 ± 0.39^{Aa}	13.25 ± 3.72^{Aa}
	Polen:agua 1:1	20.13 ± 0.80^{Cb}	16.52 ± 0.66^{Bb}	13.18 ± 0.15^{Aa}	12.69 ± 0.64^{Aa}
	Polen:agua 2:1	16.78 ± 0.22^{Ba}	12.99 ± 0.52^{Aa}	12.76 ± 0.40^{Aa}	13.46 ± 1.05^{Aa}
Flavonoides totales (mg EQ/g)	Polen estéril	3.53 ± 0.42^{Cab}	3.43 ± 0.90^{BCa}	2.47 ± 0.29^{Ba}	2.11 ± 0.04^{Aa}
	Polen:agua 1:1	3.93 ± 0.06^{Cb}	3.07 ± 0.40^{Ba}	3.23 ± 0.05^{Bb}	2.52 ± 0.10^{Ab}
	Polen:agua 2:1	3.23 ± 0.05^{Ba}	3.06 ± 0.36^{Ba}	2.54 ± 0.04^{Aa}	2.57 ± 0.06^{Ab}
FRAP (μ mol TROLOX/g)	Polen estéril	49.07 ± 2.46^{Cb}	34.4 ± 1.73^{Ba}	36.30 ± 4.85^{ABab}	31.49 ± 0.45^{Ab}
	Polen:agua 1:1	52.77 ± 1.97^{Cb}	34.05 ± 1.27^{Aa}	38.22 ± 2.67^{Bb}	38.48 ± 1.40^{Bc}
	Polen:agua 2:1	42.60 ± 2.14^{Ca}	33.32 ± 1.62^{Ba}	33.01 ± 1.23^{Ba}	24.81 ± 2.16^{Aa}
TEAC (μ mol TROLOX/g)	Polen estéril	93.68 ± 2.00^{Da}	77.26 ± 2.67^{Ca}	63.51 ± 5.10^{Ba}	59.14 ± 7.44^{Aa}
	Polen:agua 1:1	110.22 ± 3.81^{Cb}	70.44 ± 1.29^{Ba}	58.18 ± 6.66^{Aa}	48.31 ± 4.58^{Aa}
	Polen:agua 2:1	95.68 ± 3.31^{Ca}	76.89 ± 1.64^{Ba}	50.81 ± 10.53^{Aa}	61.81 ± 10.03^{Aa}
Digestibilidad (g/100 g proteína)	Polen estéril	76.3 ± 2.5^{Aa}	85.3 ± 8.5^{Aa}	81.2 ± 8.3^{Aa}	78.2 ± 6.3^{Aa}
	Polen:agua 1:1	86.3 ± 9.2^{Aa}	84.0 ± 8.3^{Aa}	87.1 ± 10.4^{Aa}	86.2 ± 2.9^{Aa}
	Polen:agua 2:1	79.5 ± 9.4^{Aa}	84.3 ± 7.5^{Aa}	78.8 ± 8.4^{Aa}	81.0 ± 9.5^{Aa}

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre cultivos para cada análisis dentro de un mismo sustrato.

Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada análisis y cada cultivo.

Los resultados de actividad antioxidante tanto por ABTS como FRAP muestran que la capacidad antiradicalaria de los productos obtenidos tienden a ser similares entre tratamientos. En lo que respecta a FRAP los mayores valores fueron obtenidos para los productos fermentados con Choozit® con polen únicamente y la relación polen:agua 1:1 (49.07 ± 2.46 y 52.77 ± 1.97 μ mol TROLOX/g); esta actividad fue significativamente superior a lo encontrado para las demás cepas, cuyos valores oscilaron entre 24.81 y 38.48 μ mol TROLOX/g ($p<0.05$). No obstante, existe una tendencia a encontrar valores superiores de actividad antioxidante en los productos fermentados tanto con polen como con la relación polen:agua 1:1 sin importar el cultivo empleado. Por otra parte, los

resultados de ABTS no mostraron diferencias significativas entre tratamientos para cada una de las cepas empleadas, con excepción de Choozit® para el tratamiento polen:agua 1:1 ($110.22 \pm 3.81 \mu\text{mol TROLOX/g}$) ($p>0.05$). Sin embargo, diferencias significativas si fueron alcanzadas en la comparación entre cepas conservando la siguiente tendencia Choozit > Yomix > *L. plantarum* > *L. acidophilus* ($p<0.05$).

Considerando la fermentación con Choozit® del sustrato polen:agua 1:1, se encontró que el valor de las capacidades antioxidantes FRAP y ABTS son significativamente mayores que para el pan de abejas ($30.78 \pm 14.76 \mu\text{mol TROLOX/g}$ y $42.70 \pm 25.56 \mu\text{mol TROLOX/g}$, respectivamente) ($p<0.05$, en ambos casos). No siempre la actividad antioxidante está relacionada de forma directamente proporcional con el contenido de polifenoles, esto es debido a que no sólo dichos compuestos aportan en la actividad antioxidante, los carotenoides, vitaminas, aminoácidos y otros metabolitos secundarios también ejercen un efecto considerable en la capacidad antirradicalaria global (Märghitaş *et al.*, 2009).

Finalmente, los resultados de digestibilidad son estadísticamente iguales sin importar el tratamiento y el cultivo empleado, los cuales oscilaron entre 76.3 y 86.3 g/100 g proteína ($p>0.05$). Así mismo, pruebas *t-student* realizadas comparando el valor de digestibilidad del polen estéril con los pólenes fermentados no presentaron diferencias significativas en ningún caso ($p>0.05$). En el caso de pan de abejas y Choozit con relación polen:agua 2:1 no presentaron diferencias significativas ($p>0.05$), mientras que para los demás tratamientos los valores de digestibilidad fueron significativamente mayores ($p<0.05$). Para el polen fresco, no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en el contenido de digestibilidad con los tratamientos empleando Choozit, *L. plantarum* y *L. acidophilus* cuando se emplearon polen o polen:agua en relación 2:1, mientras que sí fue significativamente mayor ($p<0.05$) en los productos fermentados con estas mismas cepas con un sustrato polen:agua 1:1. En este caso se puede inferir, como ya se había discutido para otros parámetros fisicoquímicos, que el contenido de agua influenciaría la habilidad de las cepas para realizar sus procesos metabólicos.

En síntesis, los resultados de DSC evidencian que hubo una modificación estructural luego del proceso de fermentación empleando BAL, de las cuales, los cultivos comerciales Choozit y Yomix presentaron los valores de entalpía más altos. Sin embargo, las microfotografías obtenidas por SEM dejan claro que esta modificación estructural fue leve y no ocasionó un rompimiento de la exina. Adicionalmente, y partiendo de la misma suposición hecha para la hidrólisis enzimática, el tratamiento térmico pudo haber favorecido la fisura de la exina en algunas partes del grano, con lo cual los microorganismos tuvieron acceso al interior del mismo. Pero, los resultados de compuestos bioactivos, aminoácidos, digestibilidad y actividad antioxidante hacen pensar que, a diferencia de la hidrólisis, las BAL no sólo no lograron una liberación de aminoácidos y compuestos bioactivos en la misma proporción sino que una parte de estos compuestos fueron utilizados por los propios microorganismos para su supervivencia, lo cual explicaría el hecho que los niveles de estas variables fueran inferiores en comparación al polen estéril. A pesar de esto, el cultivo Choozit® con un sustrato

polen:agua 1:1 fue el que presentó los mejores resultados entre todas las cepas empleadas tanto en el seguimiento de la fermentación a través de la producción de acidez como en el conteo de células viables, y de igual manera en el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Por las razones que fueron discutidas previamente en el numeral 3.3.3.3.1., se puede inferir que los microorganismos presentes en este cultivo: *Lactobacillus Bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* sub. *lactis* y *Streptococcus thermophilus* se adaptaron mejor al sustrato.

3.3.3.1.2. Fermentación con levaduras

3.3.3.1.2.1. Efecto de la fermentación sobre la estructura del grano de polen

Calorimetría Diferencial de Barrido

En la Figura 3-20 se presentan los resultados de DSC a las muestras fermentadas con levaduras. Nuevamente, con los productos fermentados se obtienen mayores valores de entalpía en comparación al polen estéril y al pan de abejas. El mayor valor de entalpía fue encontrado para la levadura comercial (ver Tabla 3-4). El pico de temperatura en el que el flujo de calor fue máximo se encontró a 139°C y 156°C, para la levadura ATCC y comercial, respectivamente. Una comparación de los valores de entalpía con los obtenidos para los productos fermentados con BAL, muestra que las mayores entalpías son logradas por las BAL comerciales, en particular Choozit®.

Los resultados encontrados reflejan que en términos de modificación de la estructura del polen, un proceso de esterilización y fermentación controlada da mejores resultados si es comparado al pan de abejas. Esto puede ser debido a que la esterilización hace una degradación inicial del polen, lo cual facilitarían la acción fermentativa de los microorganismos quienes continuarían con este proceso de degradación; en contraste, en la colmena la ausencia de un tratamiento térmico inicial hace que el trabajo de modificación de la estructura del polen recaiga sobre la acción que puedan realizar los microorganismos, lo que limita el nivel de degradación de la esporopolenina.

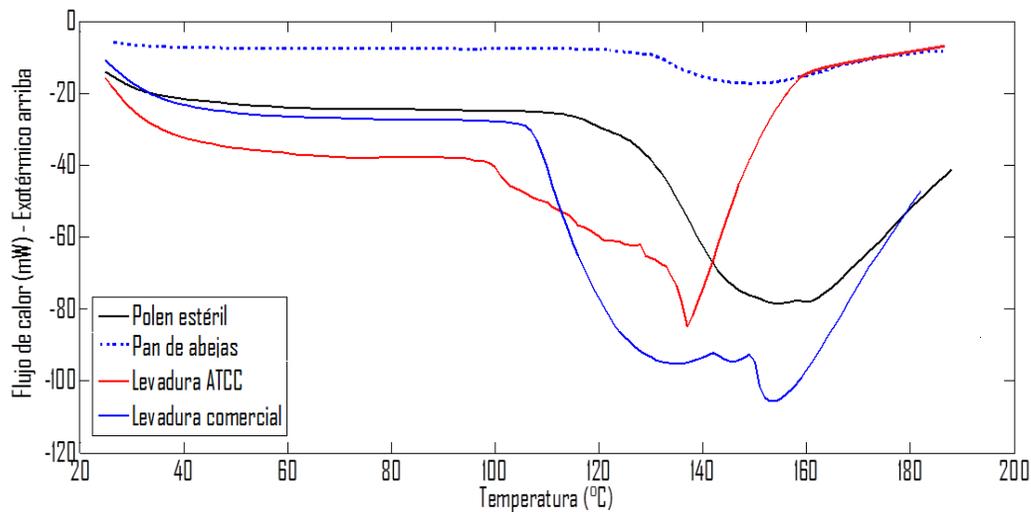


Figura 3-20. DSC de polen estéril y polen fermentado con levaduras

Tabla 3-4. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con levaduras

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen estéril	155	192.5
Pan de abejas	150	50.2
Levadura ATCC	139	165.9
Levadura comercial	156	300.2

Microscopía electrónica de barrido

Las Figuras 3-21 y 3-22 muestran microfotografías SEM tomadas a productos fermentados con *S. cerevisiae* comercial y *S. cerevisiae* ATCC, respectivamente, en una relación polen:agua 1:1. Los resultados son coherentes con lo observado en DSC, en donde se observó que estas cepas no tuvieron un efecto considerable en la modificación estructural del grano, sin embargo, se destaca que los valores de entalpía de la levadura comercial es similar al obtenido con la fermentación con Yomix®.

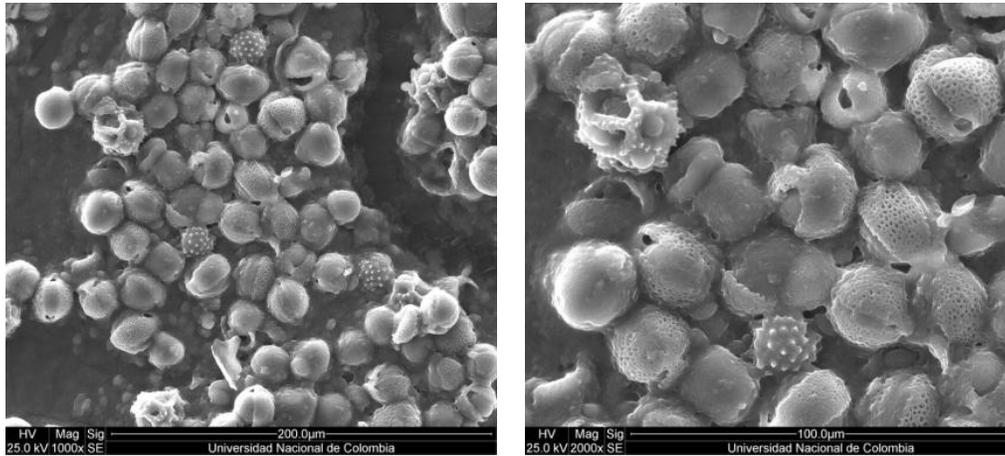


Figura 3-21. Microfotografías SEM para polen fermentado con *S. cerevisiae* comercial. Magnitud 1000X y 2000X.

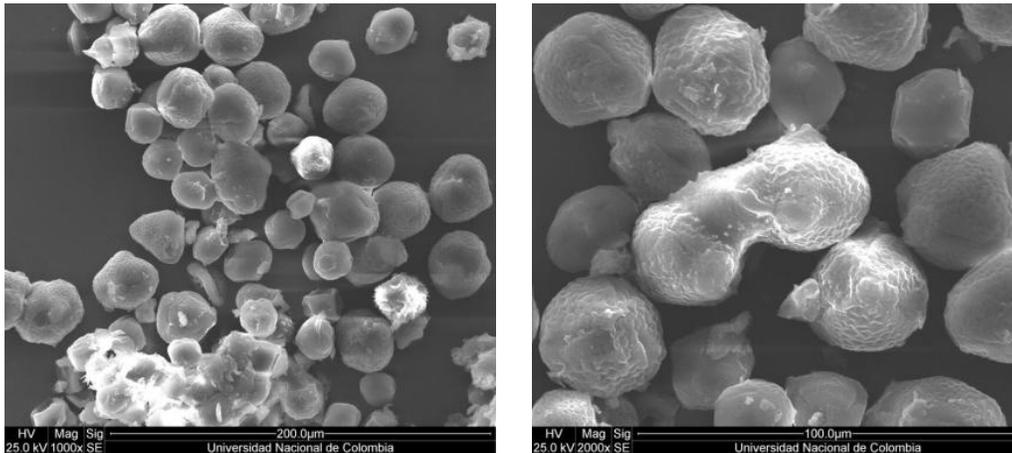


Figura 3-22. Microfotografías SEM para polen fermentado con *S. cerevisiae* ATCC. Magnitud 1000X y 2000X.

3.3.3.1.2.2. Seguimiento de la fermentación con levaduras

En el caso de los cultivos comerciales y ATCC (ver Figura 3-23), las fermentaciones realizadas sobre el sustrato polen:agua 2:1 tuvieron los mayores producciones de acidez. Dependiendo de la matriz, en la fermentación con levaduras se generan algunos ácidos orgánicos tales como ácido succínico y acético (Roldán-Marín *et al.*, 2009; Mendes-Ferreira *et al.*, 2010; Acosta, 2012). Así mismo, la población de levaduras viables se mantuvo en valores entre 7 y 8 \log_{10} (UFC/g), nuevamente se observó que el contenido de agua guarda una relación con tendencia a favorecer los distintos procesos metabólicos de la célula.

En contraste, en la fermentación realizada con la levadura ATCC la población disminuyó drásticamente hasta alcanzar valores entre 3 y 4 \log_{10} (UFC/g) (ver Figura 3-24), a pesar que la producción de acidez se encontró en valores similares a la fermentación realizada con el cultivo comercial. Se podría inferir, entonces, que las cepas ATCC no lograron adaptarse al sustrato. A pesar de ser una misma especie, es claro que se tratan de dos variedades diferentes de *S. cerevisiae*; los cultivos comerciales han sido desarrollados para que tengan una mayor adaptabilidad fisiológica a diferentes tipos de sustratos y condiciones adversas (Galvagno and Cerrutti, 2004), así las diferentes casas matrices logran diversificar su utilidad y aplicabilidad industrial.

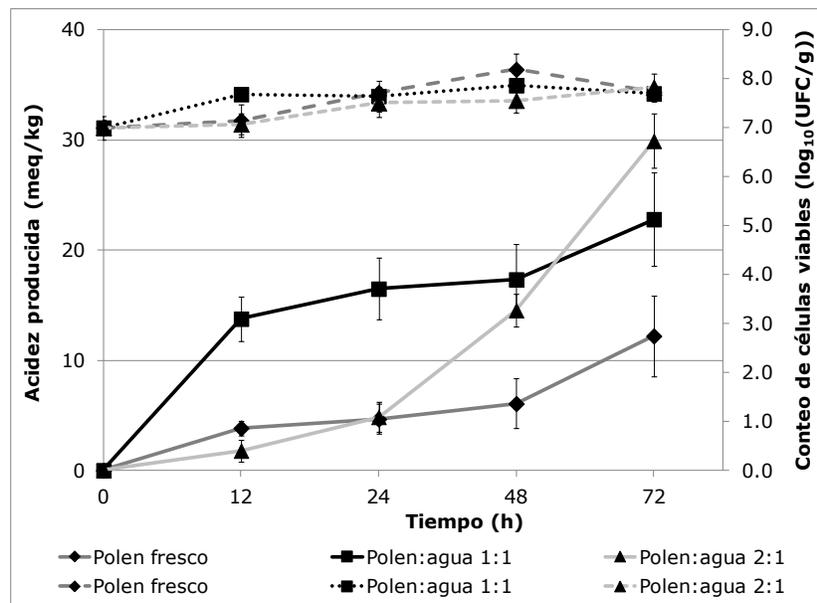


Figura 3-23. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con *S. cerevisiae* comercial

Líneas continuas: acidez producida. Líneas punteadas: Conteo células viables

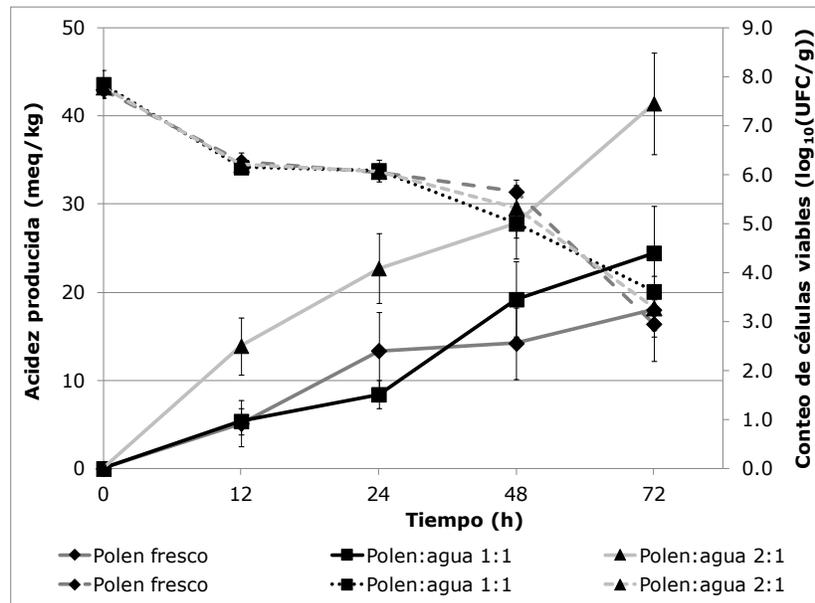


Figura 3-24. Seguimiento de la fermentación para los sustratos fermentados con *S. cerevisiae* ATCC

Líneas continuas: acidez producida. Líneas punteadas: Conteo células viables

3.3.3.1.2.2. Resultados de la fermentación

En la Tabla 3-5 se presentan los resultados de la fermentación de cada cultivo de levaduras a las tres relaciones polen:agua investigadas.

Es posible establecer que la levadura comercial alcanzó conteos de células viables significativamente más altos al final de la fermentación (ver Tabla 3-5), en comparación a la cepa ATCC. Esto podría entenderse como que el cultivo comercial se adaptó de una mejor forma al sustrato en comparación que su especie similar ATCC. En lo referente a los tres tipos de sustrato empleados, no se encontraron diferencias significativas ni en el caso de la levadura comercial ni con la ATCC.

En contraste, una mayor producción de acidez es lograda por la levadura ATCC, en particular cuando se empleó una relación polen agua 2:1. A diferencia de la fermentación con BAL, aparentemente las levaduras requieren de un menor contenido de agua para mantenerse viables y favorecer una producción de acidez en el bioproceso. Así mismo, la fermentación con levadura ATCC y una relación polen-agua 2:1 presentó la mayor reducción en el pH. Para los pólenes fermentados con levaduras se hicieron pruebas mediante cromatografía para la determinación de etanol o ácido acético, sin embargo, no se observaron contenidos cuantificables de estos compuestos, como se muestra en la Figura 3-25, en los que no se observan picos a los tiempos de retención 18.9 min y 12.8 min, a los que eluyen el etanol y ácido acético, respectivamente.

Tabla 3-5. Resultados de fermentación con levaduras

Análisis	Sustrato	<i>S. cerevisiae</i> comercial	<i>S. cerevisiae</i> ATCC
Células viables log ₁₀ (UFC/g)	Polen	7.72 ± 0.07 ^{Ba}	2.95 ± 0.26 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	7.82 ± 0.07 ^{Ba}	3.28 ± 0.55 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	7.70 ± 0.32 ^{Ba}	3.61 ± 0.47 ^{Aa}
Acidez producida (meq/kg)	Polen	12.19 ± 2.46 ^{Aa}	18.02 ± 5.73 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	29.90 ± 3.67 ^{Ab}	41.44 ± 5.78 ^{Bb}
	Polen:agua 1:1	22.79 ± 4.24 ^{Ab}	24.47 ± 5.32 ^{Aa}
pH	Polen	4.07 ± 0.04 ^{Aa}	4.31 ± 0.02 ^{Bb}
	Polen:agua 2:1	4.06 ± 0.08 ^{Ba}	3.90 ± 0.05 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	4.07 ± 0.11 ^{Aa}	4.32 ± 0.05 ^{Bb}
Productividad máxima (g ELA /kg*h)	Polen	0.42 ± 0.09 ^{Aa}	0.34 ± 0.02 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	0.36 ± 0.04 ^{Aa}	0.33 ± 0.05 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	0.42 ± 0.10 ^{Aa}	0.32 ± 0.04 ^{Ba}
Rendimiento (g ELA/kg)	Polen	10.04 ± 2.04 ^{Aa}	8.13 ± 0.50 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	8.63 ± 1.00 ^{Aa}	7.86 ± 1.13 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	10.00 ± 2.32 ^{Aa}	7.70 ± 0.94 ^{Aa}

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre cultivos para cada análisis dentro de un mismo sustrato.

Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada análisis y cada cultivo.

ELA: Equivalentes de ácido láctico.

Rendimiento = (Acidez producida * Peso molecular ácido láctico [90 g/mol])/ 1000.

Productividad máxima = rendimiento/tiempo máxima acidez producida

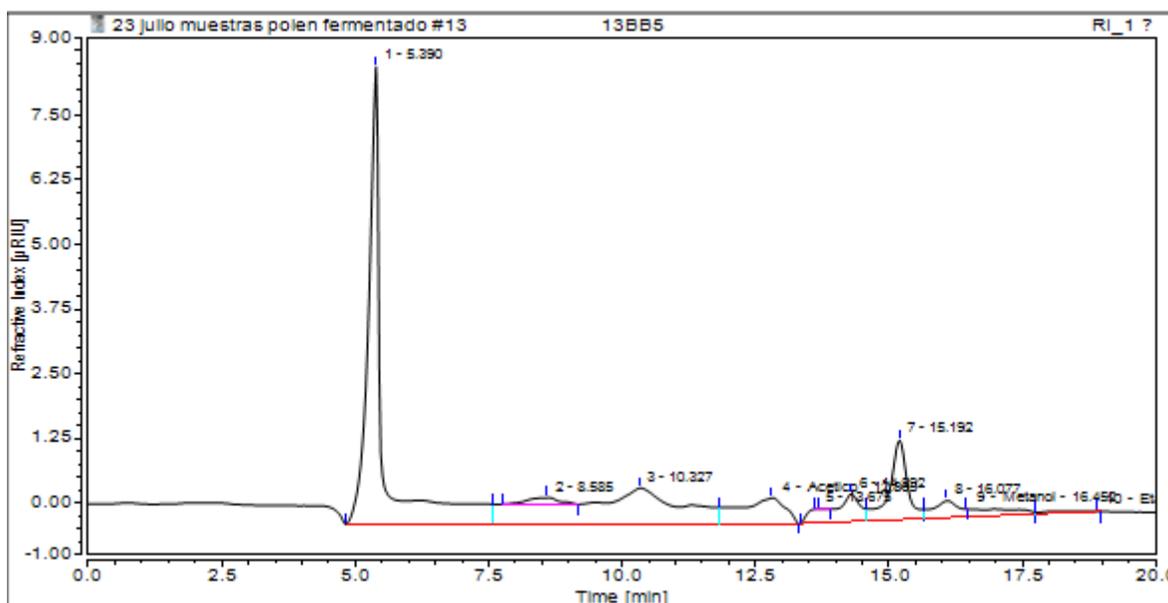


Figura 3-25. Cromatograma obtenido para la determinación y cuantificación de etanol y/o ácido acético en polen fermentado con levaduras.

Finalmente, tanto las productividades como los rendimientos no presentaron diferencias significativas entre la levadura comercial y ATCC. Sin embargo, si se compara con los resultados de BAL, la fermentación con *L. acidophilus* tuvo comparativamente una menor productividad.

Haciendo una síntesis de los resultados, el análisis estructural de los productos fermentados mostró que los cultivos comerciales fueron mejores con respecto a las cepas ATCC. Los resultados de viabilidad y rendimiento de la fermentación muestran que en efecto las fermentaciones con Choozit y Yomix son las mejores, así como la fermentación realizada con *L. plantarum*, en este último caso, aparentemente esta BAL tuvo una rápida adaptación al medio, lo que le permitió desarrollarse y mantenerse viable en concentraciones superiores a 10^8 UFC/g luego de 72 h. Con base en los resultados de fermentación, para las BAL una relación polen:agua 1:1 se presenta como la mejor opción en términos de viabilidad y rendimiento, mientras que para las levaduras, la cepa comercial mostró una mejor adaptación al sustrato que la ATCC. Consecuentemente, los mejores resultados en términos de composición bioactiva y actividad antioxidante se encontraron para los cultivos comerciales de BAL Choozit y Yomix, sin embargo, comparativamente, los resultados de hidrólisis con proteasas presentaron mayores valores sobre estas mismas variables.

3.3.3.1.2.3. Efecto de la fermentación sobre el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante

Los resultados de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de la fermentación con BAL son mostrados en la Tabla 3-6. Los resultados de compuestos fenólicos mostraron una diferencia significativamente mayor en favor de los productos fermentados con la levadura comercial en los tres sustratos evaluados. En particular, esta levadura presentó un mejor contenido de compuestos fenólicos cuando se empleó un sustrato polen-agua 1:1. A pesar de esto, todos los resultados son significativamente menores en comparación al polen estéril (23.65 ± 0.65 mg EAG/g) ($p < 0.05$). En comparación con el contenido de fenoles totales del polen fresco (14.96 ± 2.11 mg EAG/g) no hay diferencias significativas ($P > 0.05$). Finalmente, una comparación de los valores de fenoles entre los productos fermentados con BAL y levaduras hace evidente que los resultados de estas últimas son significativamente menores a las encontradas para la fermentación con Choozit ($p < 0.05$).

Los resultados de flavonoides totales mostraron diferencias significativas entre los dos tipos de levaduras únicamente cuando se empleó polen estéril como sustrato, siendo mayor cuando se utilizó *S. cerevisiae* comercial. Igualmente, esta condición arrojó un resultado que no es significativamente diferente al encontrado para pan de abejas (3.73 ± 0.40 mg EQ/g) ($p > 0.05$) pero sí es inferior al de polen estéril (5.49 ± 0.59 mg EQ/g) ($p < 0.05$). Así mismo, una comparación con las fermentaciones de polen empleando BAL, muestra que solamente el tratamiento realizado con Choozit en relación polen:agua 1:1, es significativamente mayor (3.93 ± 0.06 mg EQ/g) ($p < 0.05$).

Tabla 3-6. Contenido bioactivo y actividad antioxidante de los productos fermentados

Análisis	Sustrato	Cultivo	
		<i>S. cerevisiae</i> comercial	<i>S. cerevisiae</i> ATCC
Fenoles totales (mg EGA/g)	Polen estéril	12.96 ± 0.32 ^{Bab}	10.93 ± 0.93 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	13.80 ± 0.94 ^{Bb}	10.49 ± 0.58 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	12.31 ± 0.38 ^{Ba}	11.15 ± 0.75 ^{Aa}
Flavonoides totales (mg EQ/g)	Polen estéril	3.27 ± 0.17 ^{Ba}	2.56 ± 0.33 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	3.00 ± 0.34 ^{Aa}	2.94 ± 0.19 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	3.05 ± 0.21 ^{Aa}	2.99 ± 0.22 ^{Aa}
FRAP (μmol TROLOX/g)	Polen estéril	30.75 ± 3.27 ^{Aa}	39.18 ± 2.11 ^{Bb}
	Polen:agua 1:1	31.31 ± 1.25 ^{Aa}	45.90 ± 1.54 ^{Bc}
	Polen:agua 2:1	30.16 ± 2.01 ^{Aa}	31.16 ± 1.74 ^{Aa}
TEAC (μmol TROLOX/g)	Polen estéril	45.23 ± 3.28 ^{Aa}	47.10 ± 8.22 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	38.66 ± 5.66 ^{Aa}	39.02 ± 5.28 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	44.12 ± 8.23 ^{Aa}	49.93 ± 9.54 ^{Aa}
Digestibilidad (g/100 g proteína)	Polen estéril	80.1 ± 8.2 ^{Aa}	82.4 ± 10.1 ^{Aa}
	Polen:agua 1:1	87.8 ± 9.2 ^{Aa}	80.4 ± 3.9 ^{Aa}
	Polen:agua 2:1	80.4 ± 10.5 ^{Aa}	83.4 ± 8.4 ^{Aa}

Distintas letras mayúsculas indican diferencias significativas entre cultivos para cada análisis dentro de un mismo sustrato.

Distintas letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para cada análisis y cada cultivo.

En lo que respecta a la actividad antioxidante, los resultados por TEAC no mostraron diferencias significativas ni entre tipos de cultivo ni entre las relaciones polen-agua empleadas. En contraste, por FRAP fueron encontradas diferencias significativas entre los cultivos, siendo mayores para *S. cerevisiae* ATCC tanto para los tratamientos con polen estéril y polen-agua 1:1, siendo este último sustrato el que mayor actividad antioxidante presentó. En adición, este mismo tratamiento tiene una actividad antioxidante significativamente mayor en comparación con los productos fermentados con BAL ($p < 0.05$), con excepción de los pólenes fermentados con Choozit con polen estéril y polen-agua 1:1.

Finalmente, los resultados de digestibilidad no presentaron diferencias significativas entre cultivos y tipos de sustrato, tal como había ocurrido con las fermentaciones con BAL. Pruebas *t-student* realizadas comparando el valor de digestibilidad del polen estéril con los pólenes fermentados con levaduras no presentaron diferencias significativas en ningún caso ($p > 0.05$).

Recapitulando, los resultados de DSC muestran una notoria diferencia en el valor de entalpía entre el polen fermentado con la levadura ATCC y la comercial, siendo mayor en

este último caso cuando se empleó un sustrato polen:agua 1:1. Esto indicaría, entonces, que la levadura comercial tuvo una mejor adaptación al sustrato, lo cual es evidente a partir de la comparación del conteo de células viables, lo que consecuentemente ocasionó que esta fermentación lograra un contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante mayor que la fermentación con ATCC. No obstante, estos mismos resultados son significativamente menores que los encontrados con la fermentación con Choozit®. Una hipótesis similar a la descrita para BAL puede ser definida para las levaduras, en cuanto a su ingreso al interior del grano y consumo de los nutrientes para su mantenimiento, ya que también presentaron un nivel inferior en las variables medidas de composición con respecto al polen estéril.

3.3.3.1.3. Análisis global de datos y selección del mejor tratamiento

Inicialmente se muestra un Análisis de Componentes Principales a través del *score plot* y *loading plot* de la Figura 3-26 y Figura 3-27, respectivamente. A través de este análisis es posible establecer que los dos primeros componentes principales explican cerca del 67% de la varianza total de los datos, mostrando que los pólenes fermentados con el cultivo Choozit® (puntos 1, 2 y 3 de la Figura 3-26) presentaron los valores más altos de compuestos fenólicos y flavonoides, así como un recuento mayor de células viables y actividad antioxidante; en concordancia, también tuvieron una alta productividad y rendimiento, de igual manera presentaron los valores de pH más bajos de todos los tratamientos. Una tendencia similar, aunque con valores más bajos que para Choozit®, se puede observar para los productos fermentados con Yomix (puntos 4, 5 y 6 de la Figura 3-26), aunque en este caso, la fermentación con un sustrato polen:agua 2:1 presentó valores más bajos de productividad, rendimiento y digestibilidad en comparación a los tratamientos mencionados.

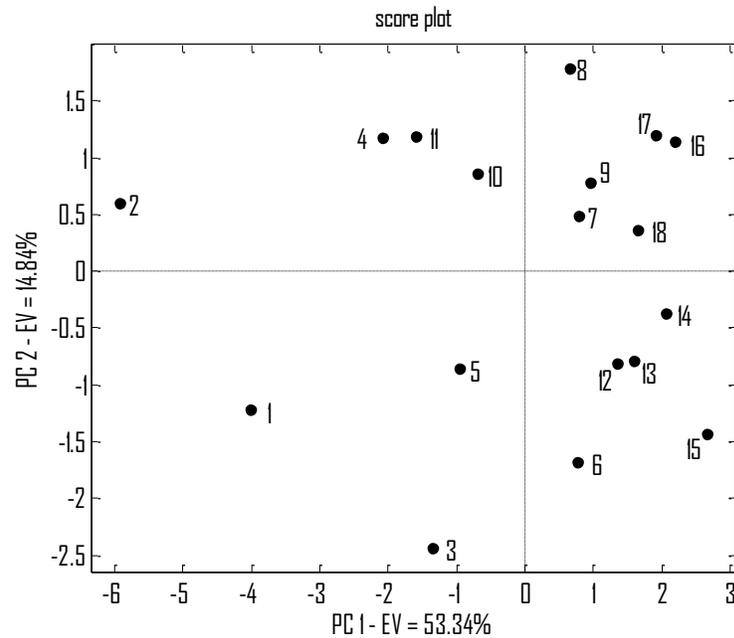


Figura 3-26. *Score plot* obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados: 1. Choozit (Polen), 2. Choozit (Polen:agua 1:1), 3. Choozit (Polen:agua 2:1), 4. Yomix (Polen), 5. Yomix (Polen:agua 1:1), 6. Yomix (Polen:agua 2:1), 7. *S. cerevisiae* comercial (Polen), 8. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 1:1), 9. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 2:1), 10. *L. plantarum* (Polen), 11. *L. plantarum* (Polen:agua 1:1), 12. *L. plantarum* (Polen:agua 2:1), 13. *L. acidophilus* (Polen), 14. *L. acidophilus* (Polen:agua 1:1), 15. *L. acidophilus* (Polen:agua 2:1), 16. *S. cerevisiae* ATCC (Polen), 17. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 1:1), 18. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 2:1).

Por otra parte, se puede observar un agrupamiento de las muestras de *S. cerevisiae* comercial (puntos 7, 8 y 9 de la Figura 3-26), y *S. cerevisiae* ATCC (puntos 4, 5 y 6 de la Figura 3-26), en el primer cuadrante del *score plot*. Esto indica que, a pesar de encontrarse diferencias en algunos de los resultados de las variables medidas para ambos tratamientos, un análisis global de los datos muestra que ambos cultivos ejercieron un efecto similar sobre la matriz de polen. En particular, los pólenes fermentados con *S. cerevisiae* mostraron los valores más altos de pH, y así mismo, los valores más bajos de fenoles totales y actividad antioxidante TEAC, en comparación con el resto de fermentaciones.

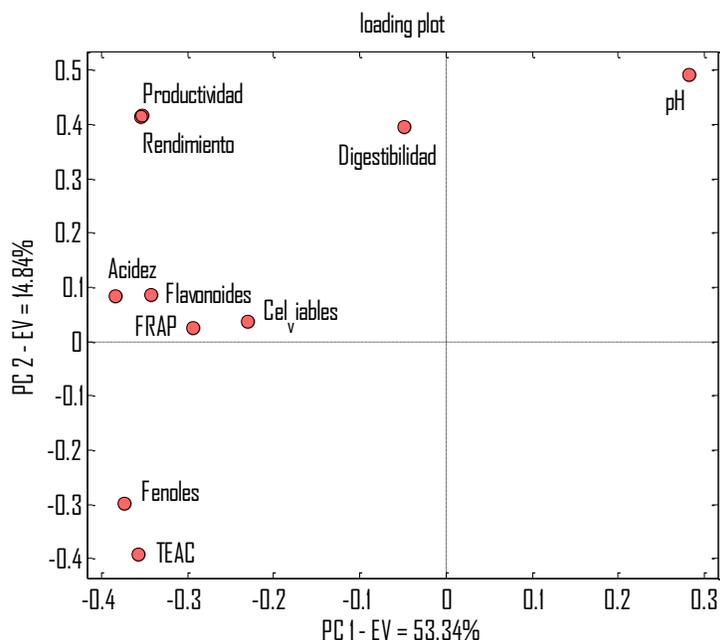


Figura 3-27. Loading plot obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados.

En lo que respecta a *L. plantarum* (puntos 10, 11 y 12 de la Figura 3-26) es posible observar que la distribución de los puntos de forma cercana al origen de la gráfica, muestra que a pesar de haberse obtenido resultados satisfactorios en el análisis de compuestos bioactivos y actividad antioxidante, el efecto global es menor que el obtenido cuando se realiza una fermentación con BAL comerciales, ya sea Choozit o Yomix, cuyos puntos están a una distancia mayor del origen, lo cual es un indicador que sus resultados tuvieron un efecto más notorio sobre las variables medidas. En el caso de *L. acidophilus* (puntos 13, 14 y 15 de la Figura 3-26), puede observarse que las muestras se ubican en el cuarto cuadrante del *score plot*, por lo que se puede establecer de manera general que como se observó en el análisis previo de los datos, ésta fermentación tuvo valores bajos para digestibilidad, rendimiento y productividad; de igual manera, en comparación a los demás tratamientos, la acidez producida, el conteo de células viables, el contenido de flavonoides y la actividad antioxidante FRAP fueron menores.

Finalmente, una evaluación de los resultados de cada uno de los sustratos empleados en las fermentaciones (polen, polen:agua 1:1 y polen:agua 2:1) mostró que no es posible establecer una tendencia de los datos ni realizar una generalización con relación al efecto de la variación del sustrato respecto a la respuesta obtenida en las variables estudiadas, con lo cual, el estudio de este efecto es dependiente de cada tipo de cultivo empleado.

Adicionalmente, un nuevo Análisis de Componentes Principales fue realizado, esta vez incluyendo solamente los resultados del análisis de compuestos bioactivos (fenoles

totales y flavonoides), actividad antioxidante (FRAP y TEAC) y parámetros fisicoquímicos (pH y digestibilidad) y haciendo una comparación con los valores reportados para estas variables con polen fresco, pan de abejas y polen estéril. Éste análisis es presentado en la Figura 3-28 y Figura 3-29. Los resultados muestran como tanto el polen fresco como el esterilizado poseen los valores más altos de flavonoides y FRAP (ver Figura 3-29), mientras la digestibilidad tiende a presentar un nivel más bajo, en comparación a los pólenes fermentados. En lo que respecta al pan de abejas, si bien los valores de compuestos bioactivos y actividad antioxidante son menores que lo encontrado para el polen fresco y estéril, su ubicación en el *score plot* (punto 2 de la Figura 3-28) permite inferir que este producto se asemeja a los pólenes fermentados, en lo que respecta a las variables reportadas en este análisis.

A pesar de encontrar una alta agrupación de datos en el segundo y tercer cuadrante del *score plot* (ver Figura 3-28), es importante destacar los resultados de las fermentaciones realizadas con *L. plantarum* (puntos 13, 14 y 15 de la Figura 3-28), Yomix® (puntos 7, 8 y 9 de la Figura 3-28; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y Choozit® (puntos 4, 5 y 6 de la Figura 3-28). De todos los tratamientos realizados, estos cultivos mostraron los mejores resultados para digestibilidad, actividad antioxidante TEAC y contenido de fenoles totales. En particular, es posible sugerir que las fermentaciones realizadas con Choozit® mostraron un equilibrio en los resultados obtenidos en las variables medidas, ya que a diferencia del polen fresco o estéril los productos fermentados con este cultivo tienen una mayor digestibilidad y su contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante no se vio afectada con la misma intensidad en comparación a los demás tratamientos.

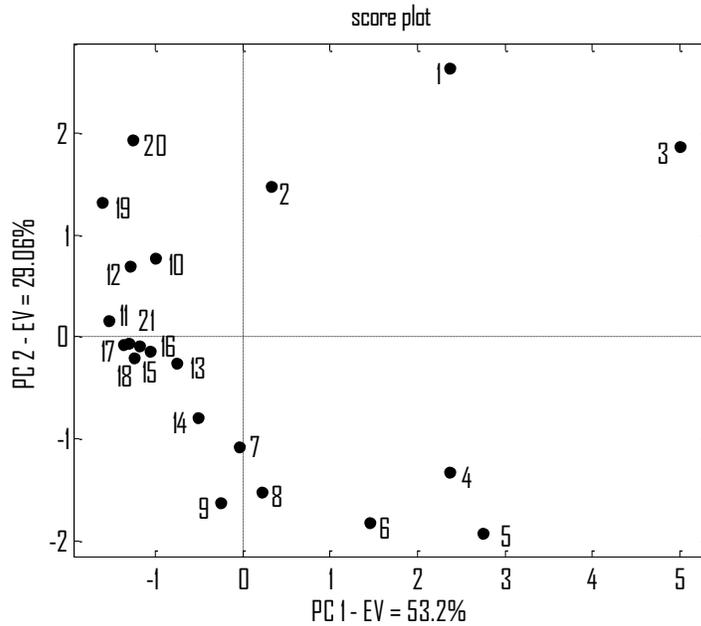


Figura 3-28. Score plot obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados, polen, pan de abejas y polen estéril. 1. Polen fresco, 2. Pan de abejas, 3. Polen estéril, 4. Choozit (Polen), 5. Choozit (Polen:agua 1:1), 6. Choozit (Polen:agua 2:1), 7. Yomix (Polen), 8. Yomix (Polen:agua 1:1), 9. Yomix (Polen:agua 2:1), 10. *S. cerevisiae* comercial (Polen), 11. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 1:1), 12. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 2:1), 13. *L. plantarum* (Polen), 14. *L. plantarum* (Polen:agua 1:1), 15. *L. plantarum* (Polen:agua 2:1), 16. *L. acidophilus* (Polen), 17. *L. acidophilus* (Polen:agua 1:1), 18. *L. acidophilus* (Polen:agua 2:1), 19. *S. cerevisiae* ATCC (Polen), 20. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 1:1), 21. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 2:1).

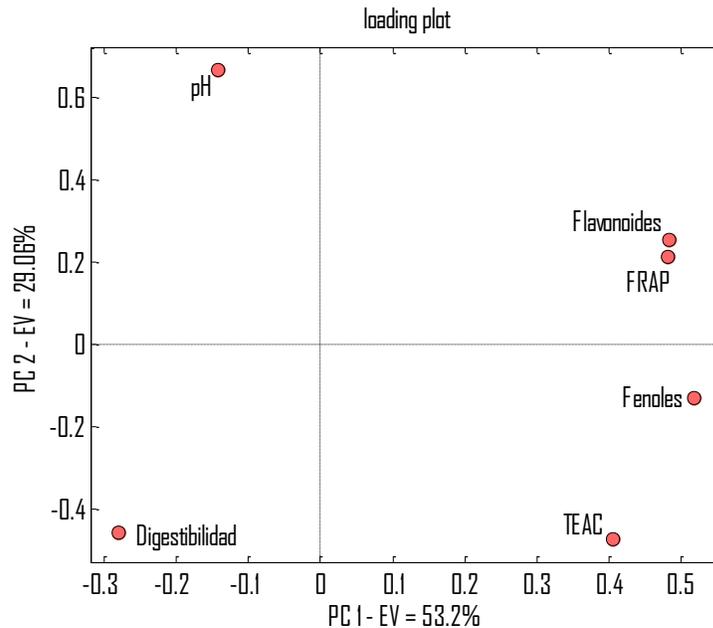


Figura 3-29. Loading plot obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados, polen, pan de abejas y polen estéril

En lo que respecta a la selección de la fermentación con mejores efectos sobre las variables medidas en este trabajo, se obtuvieron las funciones de conveniencia y utilidad, cuyos resultados se presentan en la Tabla 3-7 y Figura 3-30. A partir de estos modelos pudo definirse que el mejor tratamiento fue el realizado con un cultivo Choozit® con una relación de sustrato polen:agua 1:1. Además se destacan, a partir de los resultados obtenidos en el cálculo de las funciones de utilidad y conveniencia, los tratamientos con Choozit® con una relación de sustrato polen:agua 2:1, Yomix con solo polen como sustrato, así como las fermentaciones realizadas con *L. plantarum* o Yomix® una relación de sustrato polen:agua 1:1. La fermentación de Choozit® con solo polen como sustrato presentó un valor de utilidad alto, sin embargo la conveniencia arrojó valores de cero, ocasionado por los bajos valores de acidez producida y rendimiento en comparación a los otros tratamientos realizados con este mismo cultivo.

Tabla 3-7. Resultados de las funciones de conveniencia y utilidad para las fermentaciones realizadas con los cultivos comerciales y ATCC

	Sustrato	Conveniencia	Utilidad
Yomix	Polen	0.380	0.606
	polen:agua 1:1	0.387	0.512
	polen:agua 2:1	0.118	0.380
<i>L. acidophilus</i>	Polen	0.000	0.053
	polen:agua 1:1	0.038	0.271
	polen:agua 2:1	0.000	0.054
<i>L. plantarum</i>	Polen	0.122	0.271
	polen:agua 1:1	0.303	0.580
	polen:agua 2:1	0.025	0.081
<i>S. cerevisiae</i> ATCC	Polen	0.000	0.150
	polen:agua 1:1	0.000	0.218
	polen:agua 2:1	0.032	0.211
Choozit®	Polen	0.000	0.837
	polen:agua 1:1	0.995	0.995
	polen:agua 2:1	0.308	0.640
<i>S. cerevisiae</i> comercial	Polen	0.040	0.221
	polen:agua 1:1	0.000	0.337
	polen:agua 2:1	0.032	0.199

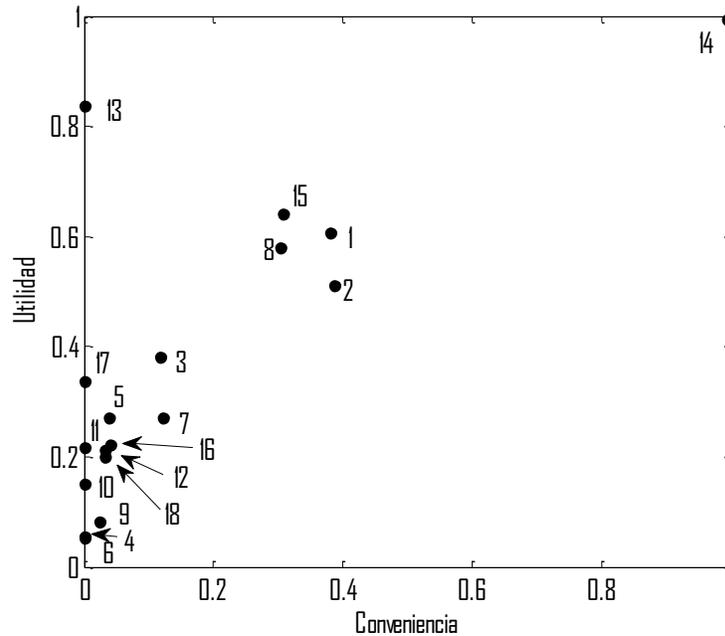


Figura 3-30. Diagrama de utilidad en función de conveniencia para las fermentaciones realizadas con los cultivos comerciales y ATCC. 1. Yomix (Polen), 2. Yomix (Polen:agua 1:1), 3.

Yomix (Polen:agua 2:1), 4. *L. acidophilus* (Polen), 5. *L. acidophilus* (Polen:agua 1:1), 6. *L. acidophilus* (Polen:agua 2:1), 7. *L. plantarum* (Polen), 8. *L. plantarum* (Polen:agua 1:1), 9. *L. plantarum* (Polen:agua 2:1), 10. *S. cerevisiae* ATCC (Polen), 11. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 1:1), 12. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 2:1), 13. Choozit (Polen), 14. Choozit (Polen:agua 1:1), 15. Choozit (Polen:agua 2:1), 16. *S. cerevisiae* comercial (Polen), 17. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 1:1), 18. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 2:1).

3.3.3.2. Evaluación de fermentaciones realizadas con mezclas de cultivos

Con base en los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos de fermentación de polen, se planteó la realización de nuevos ensayos esta vez combinando cultivos de BAL con *S. cerevisiae* con el fin de evaluar el efecto de una fermentación conjunta entre levaduras y bacterias sobre las características nutricionales, bioactivas y estructurales del polen apícola. En este trabajo, se evaluaron diferentes tiempos de inclusión del cultivo de BAL, con el propósito de simular la fermentación ocurrida en la colmena, de acuerdo a lo descrito en el numeral 1.4.1 en el que se mencionó que durante el proceso de obtención de pan de abejas las levaduras actúan sobre el sustrato de manera inicial que luego es colonizado por BAL para continuar con el bioproceso hasta la obtención del pan de abejas. En este caso, la fermentación siempre se inició con la inoculación de *S. cerevisiae* y posteriormente con la inoculación del cultivo de BAL luego de cuatro diferentes tiempos (0 h, 12 h, 24 h y 48 h) para así establecer si el tiempo influye sobre las características previamente mencionadas en el producto final.

3.3.3.2.1. Efecto sobre la estructura del polen

Calorimetría Diferencial de Barrido

En la Figura 3-31 se presenta el resultado de DSC de los pólenes fermentados con la mezcla de cepas ATCC con levaduras y la inclusión de BAL a diferentes tiempos. La figura muestra el pico endotérmico encontrado en rangos de temperatura que oscilan entre 138°C y 147°C (ver Tabla 3-8), con una entalpía máxima en el tratamiento en el tiempo de inclusión de BAL de 0 h, es decir cuando se inocularon ambos microorganismos al mismo tiempo. Esto permite inferir que dentro de las condiciones evaluadas de mezcla de BAL y levadura ATCC, la mayor degradación del polen ocurre cuando desde el inicio del bioproceso se inoculan los dos microorganismos. Este tiempo, de hecho, presentó un mayor valor de entalpía que la fermentación realizada con Choozit, lo cual permite inferir que los cultivos ATCC podrían ser más útiles para la fermentación de polen cuando son puestos en mezcla de microorganismos que solos.

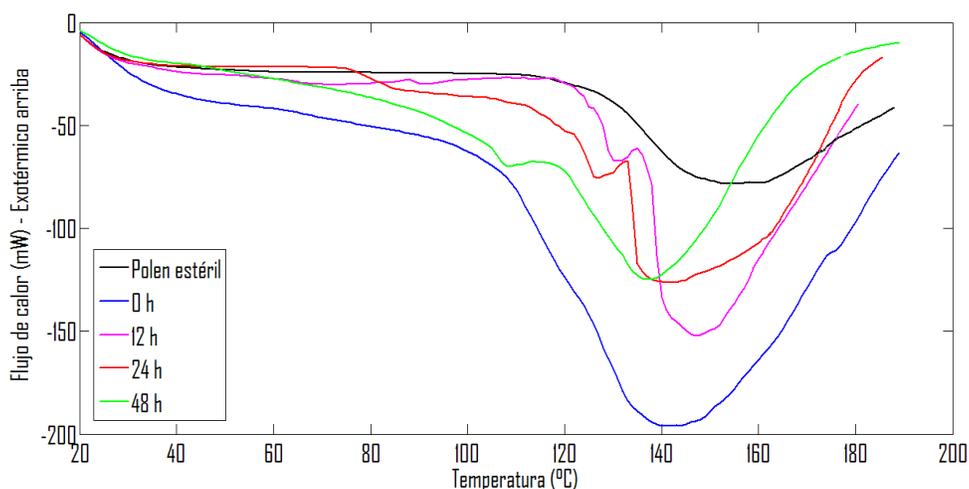


Figura 3-31. DSC de polen estéril y fermentaciones con cepas ATCC *L. plantarum* y *S. cerevisiae*

Tabla 3-8. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con las cepas ATCC *L. plantarum* y *S. cerevisiae*

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen estéril	155	192.5
0 h	143	585.8
12 h	147	320.2
24 h	142	315.8
48 h	138	300.6

En lo que respecta a la fermentación de polen con mezclas de cultivos comerciales, los resultados de DSC son mostrados en la Figura 3-32. El rango de temperaturas en los cuales se encontró el pico de máximo flujo de calor estuvo entre 153°C y 159°C. Al igual que en lo ocurrido con las cepas ATCC, el tiempo de inclusión de 0 h presentó el mayor valor de entalpía (ver Tabla 3-9) para la fermentación combinada con Choozit® y *S. cerevisiae*. Sin embargo, este valor es inferior al encontrado para la fermentación con Choozit® o la realizada con la mezcla de microorganismos ATCC. Esto podría indicar que en el caso de las cepas ATCC, la combinación de diferentes especies genera unas condiciones favorables para que ambas sobrevivan y se desarrollen en este medio, contrario a lo que ocurre cuando son mezclas de cultivos comerciales, ya que cada uno de ellos ya está listo para ser usado y de los cuales ya se sabe que no requieren otro tipo de microorganismo adicional para adaptarse y desarrollarse en el sustrato.

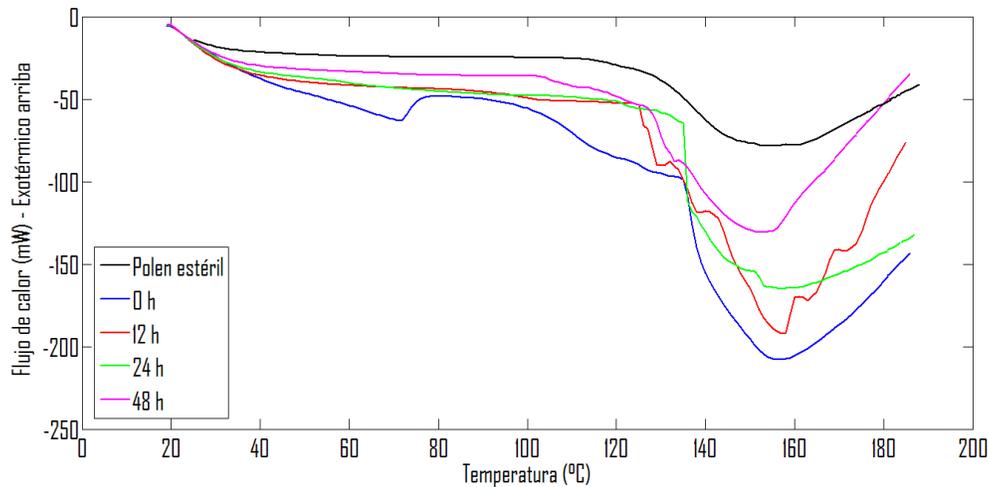


Figura 3-32. DSC de polen estéril y fermentaciones con cepas Choozit y *S. cerevisiae* comercial

Tabla 3-9. Resultados de DSC para polen estéril y fermentado con las cepas Choozit y *S. cerevisiae* comercial

Producto	Temperatura del pico (°C)	Integración del pico (Entalpía (J/g))
Polen estéril	155	192.5
0 h	156	360.4
12 h	159	357.2
24 h	155	304.1
48 h	153	229.4

Microscopía electrónica de barrido

Por otra parte, la evaluación del efecto de la fermentación empleando una combinación de levadura y BAL por SEM es presentado en las Figuras 3-33 a 3-40. Los resultados observados son similares a los mencionados en el numeral 4.3.5 para las fermentaciones con cultivos individuales. Se observa el mantenimiento de la estructura del polen, tal y como fue observado en las figuras de polen estéril. El análisis conjunto de las microfotografías SEM con respecto a los datos de entalpía por DSC, muestran que no hay un efecto considerable por la mezcla de cultivos sobre la estructura del polen, y de hecho, solamente la mezcla de cultivos *L. plantarum* y *S. cerevisiae* ATCC con la inclusión de la BAL desde el inicio de la fermentación, tuvo un valor de entalpía mayor que el mejor tratamiento individual, Choozit®.

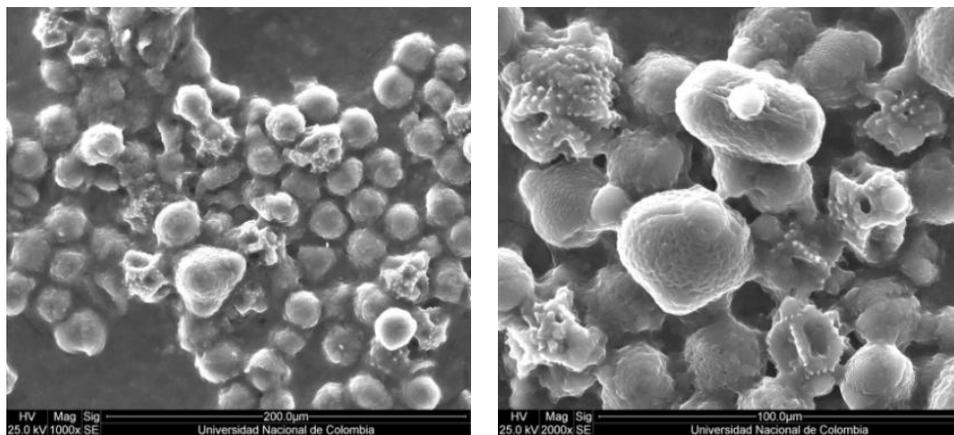


Figura 3-33. Microfotografías SEM para polen fermentado con un cultivo mixto Choozit® y *S. cerevisiae* comercial. Magnitud 1000X y 2000X.

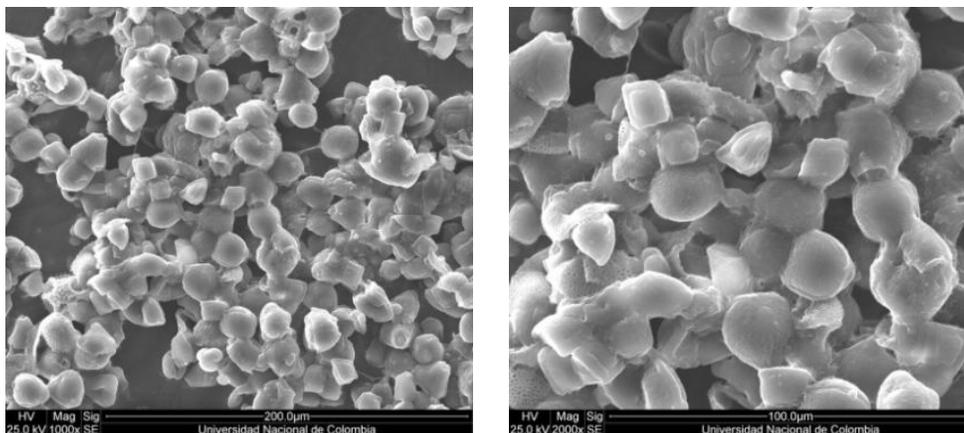


Figura 3-34. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con *S. cerevisiae* comercial y luego de 12 h con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.

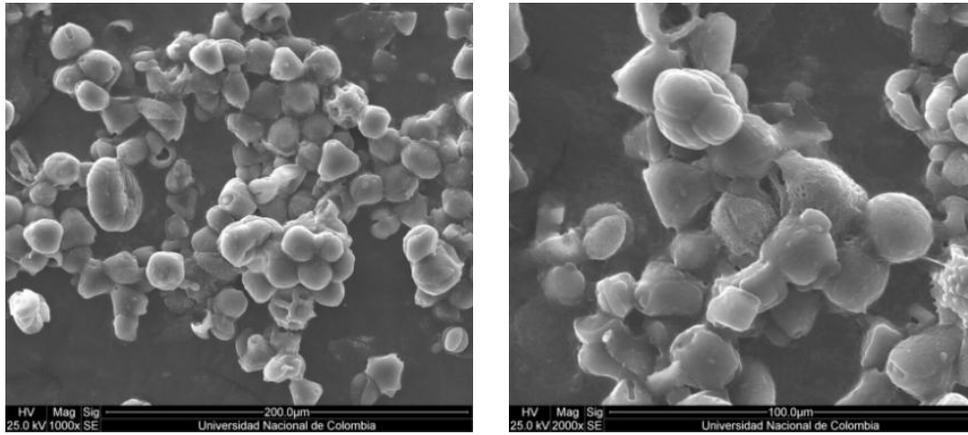


Figura 3-35. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con *S. cerevisiae* comercial y luego de 24 h con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.

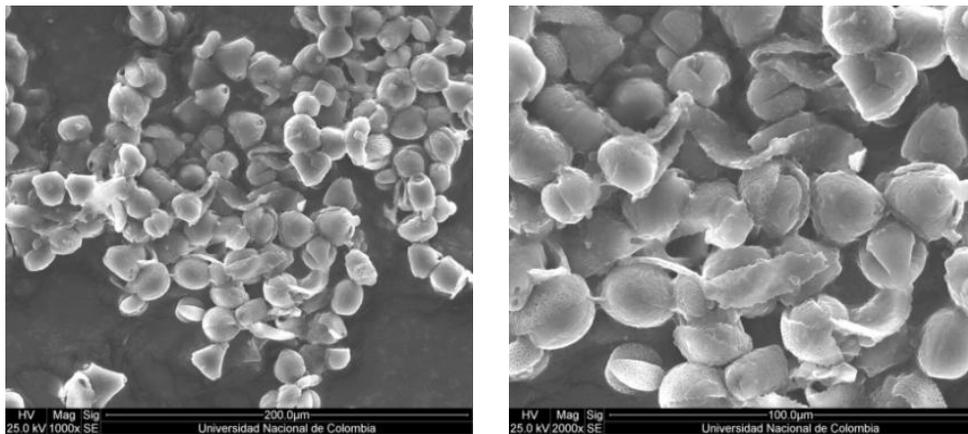


Figura 3-36. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con *S. cerevisiae* comercial y luego de 48 h con Choozit®. Magnitud 1000X y 2000X.

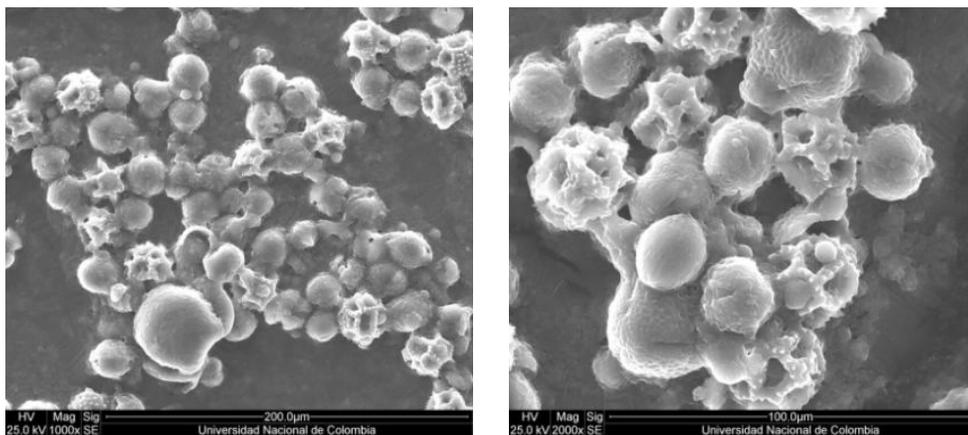


Figura 3-37. Microfotografías SEM para polen fermentado con un cultivo mixto *L. plantarum* y *S. cerevisiae* ATCC. Magnitud 1000X y 2000X.

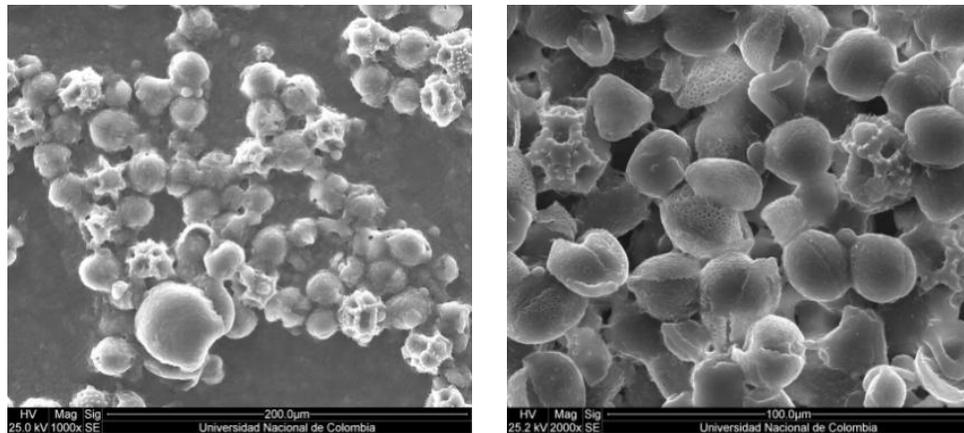


Figura 3-38. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con *S. cerevisiae* ATCC y luego de 12 h con *L. plantarum*. Magnitud 1000X y 2000X.

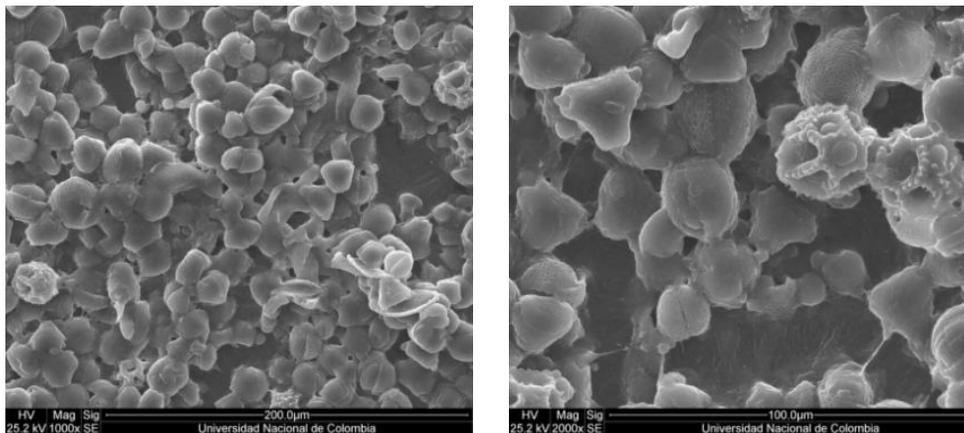


Figura 3-39. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con *S. cerevisiae* ATCC y luego de 24 h con *L. plantarum*. Magnitud 1000X y 2000X.

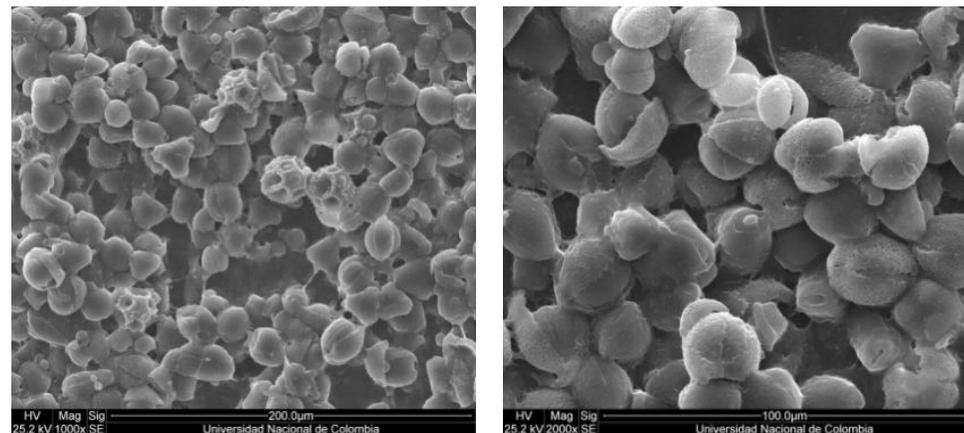


Figura 3-40. Microfotografías SEM para polen fermentado, inoculado inicialmente con *S. cerevisiae* ATCC y luego de 48 h con *L. plantarum*. Magnitud 1000X y 2000X.

3.3.3.2.2. Resultados de la fermentación

De acuerdo a los resultados encontrados en el numeral 4.3.4, se realizaron los ensayos de fermentación bajo las mejores condiciones encontradas a partir de los modelos de utilidad y conveniencia tanto para los cultivos comerciales como ATCC. Es así, que la mezcla de cultivos ATCC fue realizada empleando *L. plantarum* y *S. cerevisiae* con una relación de polen:agua 1:1, mientras la mezcla de cultivos comerciales fue hecha utilizando Choozit y *S. cerevisiae* con una relación de polen:agua 1:1. Los resultados del conteo de células viables y parámetros fisicoquímicos son mostrados en la Tabla 3-10 para cultivos comerciales y ATCC, respectivamente.

Tabla 3-10. Resultados de conteo de células viables y demás parámetros fisicoquímicos de la fermentación de polen con mezcla de cultivos comerciales a diferentes intervalos de tiempo.

Análisis	Cultivo comercial			
	<i>S.cerevisiae</i> Choozit® Inoculación BAL = 0h	<i>S.cerevisiae</i> Choozit® Inoculación BAL = 12h	<i>S.cerevisiae</i> Choozit® Inoculación BAL = 24h	<i>S.cerevisiae</i> Choozit® Inoculación BAL = 48h
Acidez producida (meq/kg)	99.92 ± 8.05 ^c	50.23 ± 4.21 ^b	24.22 ± 7.31 ^a	18.84 ± 3.72 ^a
pH	3.71 ± 0.09 ^a	3.82 ± 0.09 ^{ab}	3.96 ± 0.05 ^b	3.88 ± 0.07 ^b
Productividad máxima (g ELA/kg*h)	0.38 ± 0.03 ^c	0.19 ± 0.02 ^b	0.07 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.03 ^a
Rendimiento (g ELA/kg)	8.99 ± 0.72 ^c	4.52 ± 0.38 ^b	1.69 ± 0.33 ^a	2.18 ± 0.66 ^a
Fenoles totales (mg EGA/g)	19.56 ± 1.25 ^{ab}	21.60 ± 0.87 ^b	20.90 ± 0.71 ^b	18.11 ± 1.24 ^a
Flavonoides totales (mg EQ/g)	3.44 ± 0.24 ^a	3.19 ± 0.35 ^a	3.29 ± 0.25 ^a	3.26 ± 0.22 ^a
FRAP (μmol TROLOX/g)	33.22 ± 2.41 ^{ab}	33.66 ± 1.82 ^{ab}	36.14 ± 1.80 ^b	30.62 ± 2.50 ^a
TEAC (μmol TROLOX/g)	54.02 ± 4.28 ^a	60.39 ± 4.11 ^a	56.82 ± 7.97 ^a	54.42 ± 6.04 ^a
Digestibilidad (g/100 g proteína)	77.7 ± 4.3 ^a	74.2 ± 6.3 ^a	85.0 ± 8.1 ^a	74.0 ± 5.3 ^a

En lo que respecta a las fermentaciones realizadas con los cultivos comerciales, la producción de acidez al final de la fermentación (72 h) mostró diferencias significativas entre los diferentes tiempos de inoculación de BAL ($p < 0.05$), siendo el más alto a 0 h, es

decir, cuando se inocularon al tiempo. Además esta condición mostró la mayor productividad y rendimiento en comparación a los demás tiempos.

En el caso de las fermentaciones realizadas mediante la mezcla de cepas de *S. cerevisiae* y *L. plantarum* se encontró una reducción significativa de la acidez producida a medida que se incrementó el tiempo de inoculación de la bacteria, sin embargo, el valor más alto fue obtenido cuando se inocularon simultáneamente ambos microorganismos (138.54 ± 10.47 meq/kg), el cual no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) a la acidez producida en la fermentación con *L. plantarum* (137.72 ± 24.30 meq/kg), con lo cual puede inferirse que es suficiente realizar una fermentación con la BAL sin necesidad de realizar una mezcla con la levadura. Análisis de varianza realizados sobre el rendimiento y la productividad, mostraron que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el resultado obtenido con la combinación de microorganismos y la fermentación realizada con *L. plantarum*.

3.3.3.2.3. Efecto sobre las características fisicoquímicas y bioactivas

Por otra parte, la comparación del contenido de fenoles totales y digestibilidad muestra que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) para la mezcla de levadura y BAL comerciales con respecto a las fermentaciones individuales de Choozit y *S. cerevisiae* (ver Tabla 3-11). En el caso del contenido de flavonoides totales, una diferencia significativamente mayor ($p < 0.05$) fue encontrada para Choozit (3.93 ± 0.06 mg EQ/g), al igual que la actividad antioxidante por FRAP (52.77 ± 1.97 μ mol Trolox/g) y TEAC (110.22 ± 3.81 μ mol Trolox/g). A partir de esto, es posible inferir que una mezcla de cultivos comerciales entre levaduras y BAL no favorecería la fermentación al no haber una diferencia notoria entre los diferentes tiempos de inoculación de las bacterias.

En contraste, el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides no arrojaron mayores diferencias entre los tiempos de fermentación, al igual que en la actividad antioxidante FRAP y TEAC, así como en los valores de digestibilidad.

En lo referente al contenido de compuestos fenólicos se observó que los valores oscilaron entre 18.50 y 21.20 mg EGA/g, siendo el más alto el obtenido a las 24 h de inclusión de *L. plantarum*. Una comparación con los tratamientos de fermentación individuales de *L. plantarum* y *S. cerevisiae* (ver Tabla 3-3), muestra que los resultados obtenidos con la combinación de ambos cultivos incrementó de manera significativa ($p < 0.05$) el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante TEAC. En contraste, los valores de flavonoides totales mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$) en comparación a la fermentación con *L. plantarum* (3.23 ± 0.05 mg EQ/g), al igual que la actividad antioxidante FRAP con respecto al bioproceso con *S. cerevisiae* (45.90 ± 1.54 μ mol Trolox/g). Por otra parte, los valores de digestibilidad no presentaron diferencias con respecto a los tratamientos de fermentación con las cepas individuales ($p > 0.05$).

Tanto los resultados de DSC como el análisis fisicoquímico muestran que los mejores resultados son obtenidos para la mezcla de cultivos ATCC *L. plantarum* y *S. cerevisiae*. A pesar de ello, no existe una evidencia concluyente que permita inferir que la mezcla de cultivos ATCC tenga un efecto significativamente diferente que al realizar este proceso con los cultivos individuales.

Tabla 3-11. Resultados de conteo de células viables y demás parámetros fisicoquímicos de la fermentación de polen con mezcla de cultivos ATCC a diferentes intervalos de tiempo.

Análisis	Cultivo ATCC			
	<i>S.cerevisiae</i> <i>L. plantarum</i> Inoculación BAL = 0h	<i>S.cerevisiae</i> <i>L. plantarum</i> Inoculación BAL = 12h	<i>S.cerevisiae</i> <i>L. plantarum</i> Inoculación BAL = 24h	<i>S.cerevisiae</i> <i>L. plantarum</i> Inoculación BAL = 48h
Acidez producida (meq/kg)	138.54 ± 10.47 ^d	110.44 ± 7.51 ^c	69.72 ± 8.26 ^b	44.64 ± 7.29 ^a
pH	3.92 ± 0.01 ^a	3.91 ± 0.07 ^a	3.93 ± 0.07 ^a	3.76 ± 0.15 ^a
Productividad máxima (g ELA/kg*h)	0.52 ± 0.08 ^d	0.41 ± 0.02 ^c	0.26 ± 0.03 ^b	0.17 ± 0.03 ^a
Rendimiento (g ELA/kg)	12.47 ± 1.84 ^c	9.94 ± 1.58 ^c	6.27 ± 0.74 ^b	4.02 ± 0.66 ^a
Fenoles totales (mg EGA/g)	18.50 ± 0.31 ^a	19.87 ± 0.37 ^b	21.20 ± 0.81 ^c	19.43 ± 0.45 ^{ab}
Flavonoides totales (mg EQ/g)	2.94 ± 0.18 ^{ab}	2.81 ± 0.10 ^a	3.05 ± 0.15 ^{ab}	3.04 ± 0.04 ^b
FRAP (μmol Trolox/g)	22.16 ± 3.77 ^a	32.22 ± 3.58 ^b	36.74 ± 5.24 ^b	18.83 ± 5.34 ^a
TEAC (μmol Trolox/g)	54.66 ± 2.23 ^b	64.52 ± 3.47 ^c	67.34 ± 2.40 ^c	48.81 ± 2.50 ^a
Digestibilidad (g/100 g proteína)	80.3 ± 1.5 ^a	82.0 ± 4.1 ^a	82.2 ± 5.2 ^a	83.1 ± 4.6 ^a

3.3.3.2.4. Análisis global de datos

Finalmente, un análisis global de los nuevos datos fue realizado mediante un Análisis de Componentes Principales. En este análisis también se incluyeron los resultados de las fermentaciones seleccionadas de *S. cerevisiae* comercial y ATCC, *L. plantarum* y Choozit, los cuales son mostrados mediante el *score plot* y *loading plot* en la Figura 3-41 y Figura 3-42. Un estudio de las figuras permite inferir que las fermentaciones realizadas con la combinación de *S. cerevisiae* y Choozit (puntos 1 al 4 de la Figura 3-41) presentan valores reducidos en el rendimiento, productividad y actividad antioxidante FRAP, en comparación a los demás tratamientos individuales. En el caso de las fermentaciones

realizadas con las cepas ATCC (puntos 5 al 8 de la Figura 3-41), la cercanía de las muestras al origen de la gráfica permite inferir que estos tratamientos no presentan mayor influencia sobre las variables medidas, y que como se discutió previamente, sus valores no permiten inferir que éste sea un tratamiento adecuado para la fermentación de polen.

La ubicación de los puntos de las fermentaciones individuales realizadas con *L. plantarum* (punto 9), *S. cerevisiae* ATCC (punto 10), Choozit® (punto 11) y *S. cerevisiae* comercial en el *score plot* (ver Figura 3-41) y su relación con respecto a las variables ubicadas en el mismo cuadrante en el *loading plot* (ver Figura 3-42) permiten establecer que estos tratamientos tuvieron mayores valores en las variables de rendimiento, viabilidad de las células, actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos y flavonoides; esto particularmente se presenta con mayor incidencia en las fermentaciones con *L. plantarum* y Choozit®.

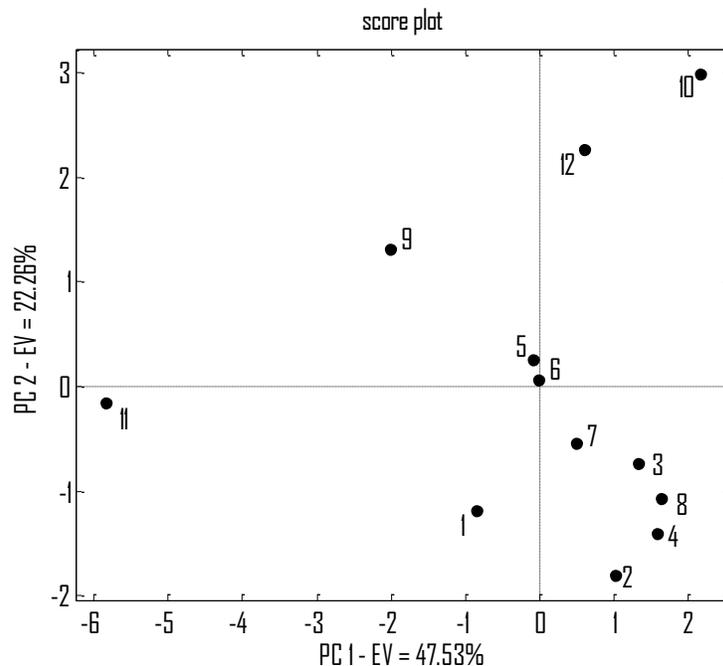


Figura 3-41. *Score plot* obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total, realizadas con un sustrato polen:agua 1:1.

1. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (0 h), 2. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (12 h), 3. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (24 h), 4. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (48 h), 5. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L. plantarum* (0 h), 6. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L. plantarum* (12 h), 7. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L. plantarum* (24 h), 8. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L. plantarum* (48 h), 9. *L. plantarum* (Polen:agua 1:1), 10. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 1:1), 11. Choozit (Polen:agua 1:1), 12. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 1:1).

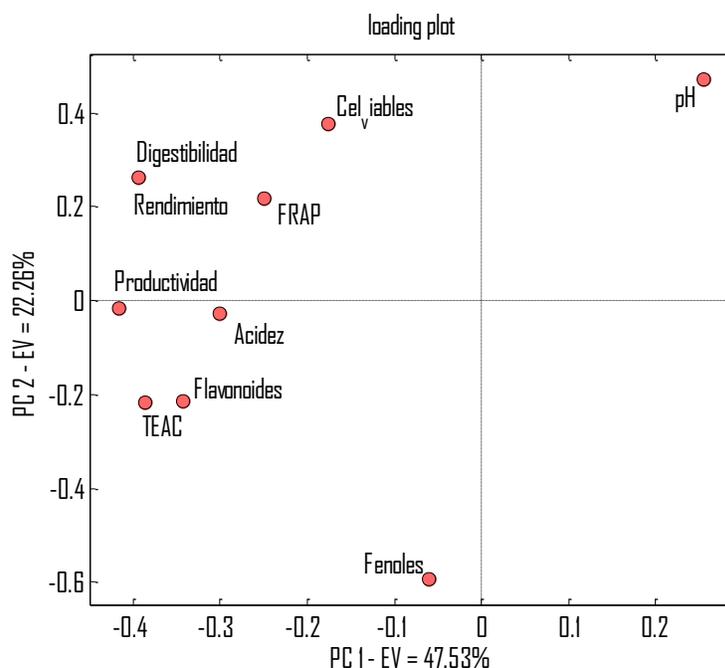


Figura 3-42. *Loading plot* obtenido mediante PCA de diferentes variables medidas a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total.

Así mismo, un Análisis de Componentes Principales fue realizado sobre las variables fisicoquímicas, bioactivas y actividad antioxidante de las muestras fermentadas y se compararon sus resultados con el polen fresco, polen estéril y pan de abejas. La Figura 3-43 y Figura 3-44 presentan el *score plot* y *loading plot* obtenido luego de realizado este análisis. En total, los dos primeros componentes principales explican cerca del 75% de la varianza total de datos, en el que se puede definir que el primer componente principal ejerce una influencia relativamente alta sobre la distribución de las muestras y su relación con las variables analizadas. En particular, los altos valores de compuestos bioactivos y actividad antioxidante del polen estéril (punto 15), hacen que los productos fermentados se ubiquen en la parte opuesta a esta muestra a lo largo del componente principal 1. La dispersión de las muestras a lo largo del componente principal 2 se debe en gran parte a los valores reportados en el contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante TEAC y pH.

Los productos fermentados con *S. cerevisiae* comercial (punto 12) y ATCC (punto 10) y el pan de abejas, son los que muestran un valor de pH mayor que los demás, pudiéndose inferir que el pan de abejas tiene un comportamiento similar a los productos fermentados con levaduras, al menos en lo que respecta al contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Nuevamente, la fermentación realizada con Choozit® (punto 11), muestra un comportamiento diferente a los demás productos, en particular por los valores reportados de compuestos fenólicos y actividad antioxidante TEAC.

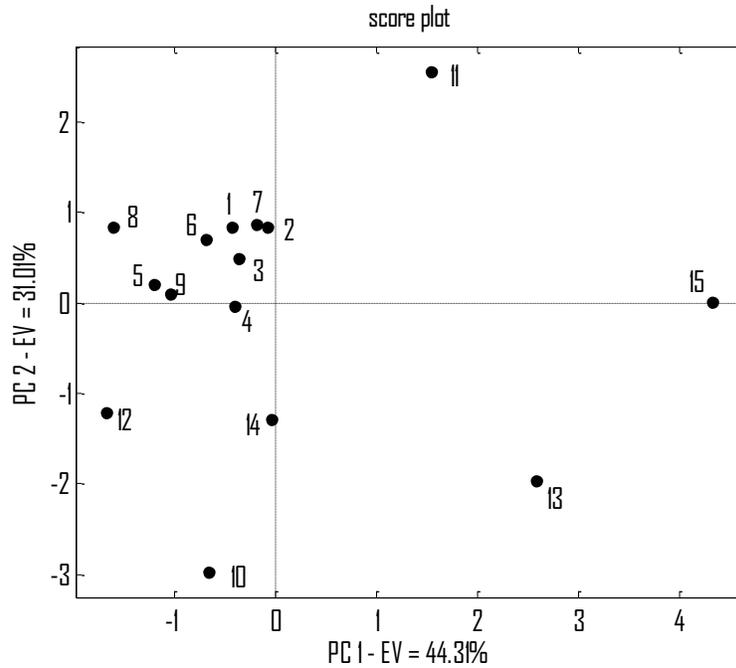


Figura 3-43. *Score plot* obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total, realizadas con un sustrato polen:agua 1:1.

1. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (0 h), 2. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (12 h), 3. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (24 h), 4. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (48 h), 5. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (0 h), 6. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (12 h), 7. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (24 h), 8. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (48 h), 9. *L. plantarum* (Polen:agua 1:1), 10. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 1:1), 11. Choozit (Polen:agua 1:1), 12. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 1:1), 13. Polen fresco, 14. Pan de abejas, 15. Polen estéril

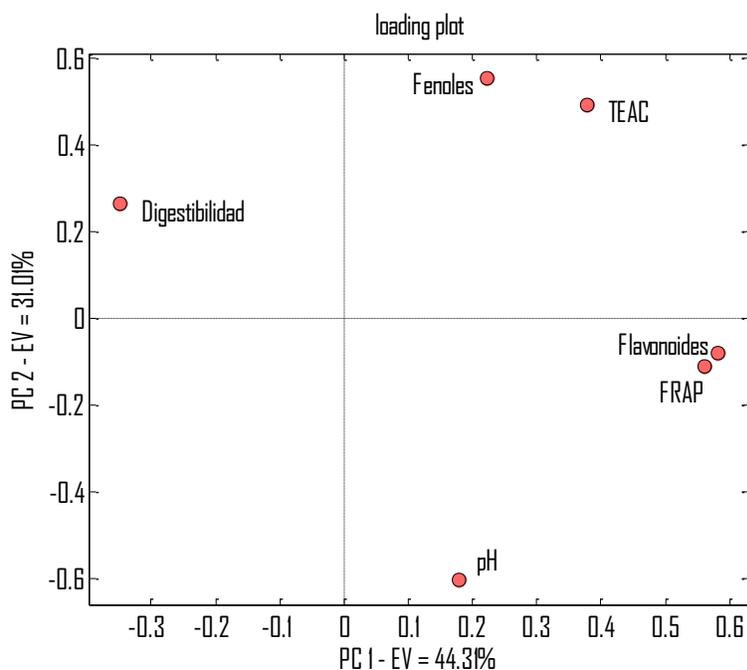


Figura 3-44. *Loading plot* obtenido mediante PCA de los compuestos bioactivos medidos a los productos fermentados empleando mezclas de las cepas seleccionadas con el método de ordenación total.

La definición de nuevos modelos de utilidad y conveniencia, esta vez incluyendo los resultados de las combinaciones de cultivos entre levaduras y BAL, mostraron nuevamente como el tratamiento más efectivo fue el realizado con Choozit® (ver Tabla 3-12 y Figura 3-45). Otros tratamientos que mostraron valores de utilidad y conveniencia aceptables fueron la fermentación con *L. plantarum* (Polen:agua 1:1) y las mezclas *S. cerevisiae* comercial - Choozit (tiempo de inoculación BAL: 0 h), y *S. cerevisiae* ATCC - *L. plantarum* (tiempo de inoculación BAL: 24 h). Claramente, no sólo en términos de composición o modificación estructural es útil el empleo de un cultivo comercial para la fermentación de polen; en términos económicos y de practicidad es más conveniente realizar las fermentaciones con un cultivo estándar y que viene listo para ser empleado en el bioproceso. Los resultados acá presentados muestran la versatilidad del cultivo Choozit®, que a pesar de estar destinado para la industria láctea, demuestra la habilidad de las BAL para adaptarse al nuevo sustrato y a las condiciones de fermentación ensayadas.

Tabla 3-12. Resultados de las funciones de conveniencia y utilidad para las fermentaciones seleccionadas

Condiciones		Conveniencia	Utilidad
Mezcla Choozit® - <i>S. cerevisiae</i> comercial	0 h	0.179	0.433
	12 h	0.050	0.267
	24 h	0.000	0.464
	48 h	0.000	0.279
Mezcla <i>L. plantarum</i> - <i>S. cerevisiae</i> ATCC	0 h	0.059	0.353
	12 h	0.000	0.387
	24 h	0.173	0.407
	48 h	0.000	0.317
<i>L. plantarum</i>		0.230	0.517
<i>S. cerevisiae</i> ATCC		0.000	0.187
Choozit®	polen:agua 1:1	0.997	0.997
<i>S. cerevisiae</i> comercial		0.000	0.279

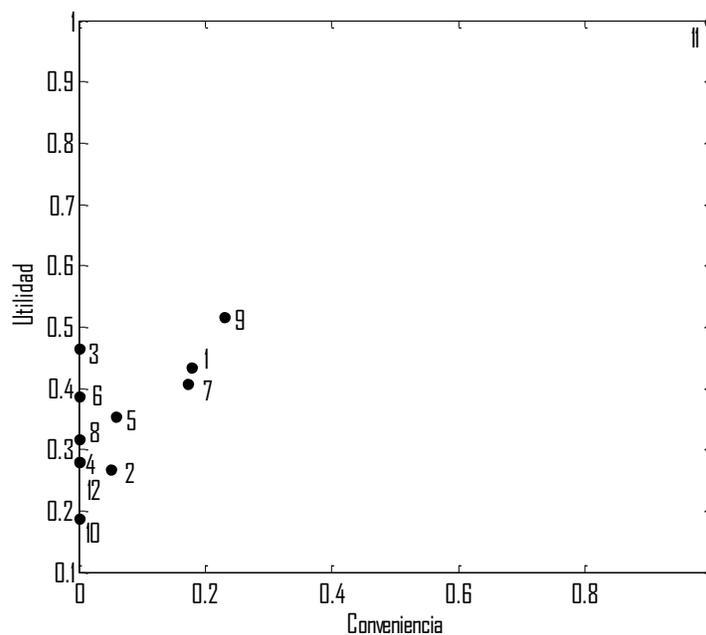


Figura 3-45. Diagrama de utilidad en función de conveniencia para las fermentaciones seleccionadas.

1. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (0 h), 2. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (12 h), 3. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (24 h), 4. Mezcla *S. cerevisiae* comercial - Choozit (48 h), 5. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (0 h), 6. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (12 h), 7. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (24 h), 8. Mezcla *S. cerevisiae* ATCC - *L.plantarum* (48 h), 9. *L. plantarum* (Polen:agua 1:1), 10. *S. cerevisiae* ATCC (Polen:agua 1:1), 11. Choozit (Polen:agua 1:1), 12. *S. cerevisiae* comercial (Polen:agua 1:1).

3.3.3.3. Efecto en el contenido de aminoácidos del polen con respecto al tratamiento térmico y la fermentación

Un perfil de aminoácidos fue realizado sobre las muestras de polen fresco, polen estéril y los pólenes fermentados que mejores resultados obtuvieron a partir de los modelos de utilidad y conveniencia realizados y comentados previamente. Este perfil es presentado en la Tabla 3-13, con los pólenes fermentados mediante Choozit®, *L. plantarum* y una mezcla *S. cerevisiae* - Choozit®. En particular, los resultados muestran que el polen fermentado con Choozit® presenta valores similares al polen fresco para el aminoácido esencial valina y los no esenciales: ácido aspártico, ácido glutámico, serina, alanina y tirosina, mientras que ligeramente mayores en los aminoácidos esenciales arginina, treonina, isoleucina, leucina y fenil alanina y el no esencial glicina, así como una reducción en los aminoácidos esenciales histidina, lisina y el no esencial prolina. Es decir, luego de la fermentación se incrementaron o mantuvieron los niveles de seis aminoácidos esenciales y se redujeron dos de ellos. La reducción de algunos aminoácidos, en particular prolina y lisina, es coherente a lo reportado en literatura la cual reporta que estos compuestos influyen fuertemente en el metabolismo de las BAL (Fernández and Zúñiga, 2006), mientras que el incremento de otros aminoácidos puede explicarse considerando la acción de enzimas proteolíticas que también son consecuencia de las actividades metabólicas de estos microorganismos (Kunji *et al.*, 1996).

Tabla 3-13. Perfil de aminoácidos en muestras de polen fresco, estéril y fermentado.

Aminoácido	Polen fresco mg/g	Polen estéril (15 min) mg/g	Polen fermentado (Choozit®)	Polen fermentado (<i>L. plantarum</i>)	Polen fermentado (<i>S. cerevisiae</i> - Choozit (0h))
Asp	2.54	2.49	2.55	2.18	2.17
Glu	2.93	2.89	2.98	2.60	2.15
Ser	1.41	1.36	1.45	1.43	1.23
His	0.58	0.41	0.43	0.32	0.30
Gly	1.25	1.25	1.31	1.11	0.93
Thr	1.19	1.19	1.26	1.09	1.07
Arg	1.75	1.41	1.42	1.42	1.42
Ala	1.48	1.43	1.49	1.17	1.27
Tyr	0.81	0.78	0.84	0.76	0.65
Val	1.14	1.24	1.15	0.92	1.01
Phe	1.16	1.21	1.24	1.07	0.89
Ile	1.05	1.09	1.13	0.98	0.91
Leu	1.88	1.87	1.94	1.74	1.62
Lys	1.61	0.94	1.29	1.12	1.26
Pro	2.38	1.35	1.78	1.66	1.57
Gln	ND	ND	ND	ND	ND

De igual manera, una comparación de los pólenes fermentados muestra una reducción considerable del contenido de aminoácidos cuando se emplea *L. plantarum* o la mezcla *S.*

cerevisiae - Choozit® con respecto al producto procesado con Choozit®, con la excepción de arginina, lo cual confirma que de todos los tratamientos realizados, el empleo de Choozit® se presenta como la mejor opción.

3.4. Conclusiones

Seis diferentes enzimas comerciales fueron empleadas para preparar un producto hidrolizado enzimático a partir de polen. En términos generales se encontró una tendencia hacia la obtención de mayores valores para compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Mayores contenidos de proteína (entre 13 y 18%), compuestos fenólicos (entre 83 y 106%) y flavonoides (entre 85 y 96%), así como actividad antioxidante por TEAC (entre 55 y 65%) y FRAP (entre 64 y 68%) fueron alcanzados cuando se usaron Protamex o Neutrased para elaborar productos hidrolizados, en comparación al polen fresco. En el caso de digestibilidad, la estadística no mostró diferencias significativas, sin embargo, valores hasta 29% más altos con respecto al polen fresco fueron obtenidos con ensayos de hidrólisis realizados con Neutrased. De manera similar, un análisis por DSC mostró que los tratamientos con mayor influencia en la estructura del polen fueron encontrados para las hidrólisis llevadas a cabo con proteasas, en particular Protamex.

En adición a la modificación estructural, los resultados visualizados a través de microscopía y las figuras de flujo de calor complementados con los niveles alcanzados en las variables de compuestos bioactivos y actividad antioxidante, posibilitan llegar a la conclusión que esta alteración de la estructura del polen favoreció la liberación de compuestos con características funcionales, ocasionando que al momento de ser cuantificados por los métodos *in vitro* utilizados en este estudio se encontraran niveles superiores a los descritos para el producto fresco.

Los resultados de todas las variables medidas no presentaron una tendencia que permita definir que la relación enzima sustrato influya de manera determinante en las características bioactivas medidas en este trabajo. Solamente en casos específicos, como por ejemplo en las proteasas, el contenido proteína y actividad antioxidante FRAP para Neutrased y de flavonoides totales para Protamex presentaron una diferencia significativa para las dos relaciones enzima sustrato utilizadas. Es claro que no es posible hacer generalizaciones sobre la cantidad de enzima a utilizar y que de acuerdo a las características de cada una de las enzimas deben definirse las relaciones adecuadas a adicionar sobre el sustrato.

Las funciones de utilidad y conveniencia para la hidrólisis enzimática han mostrado que Neutrased y Protamex, fueron las enzimas más efectivas de acuerdo a sus mayores valores de compuestos bioactivos, y de igual manera, se pudo concluir que utilizar una relación enzima sustrato 5 g / 100 g es efectiva para obtener polen con mayores indicadores bioactivos, medidos *in vitro*. Los otros tipos de enzimas probadas no tuvieron resultados satisfactorios. Es posible establecer que un proceso global (tratamiento térmico

y enzimático) es efectivo para obtener un producto con características bioactivas incrementadas.

El análisis del perfil de aminoácidos presentó incrementos notorios en todos los aminoácidos esenciales para los tratamientos con Neutrase y Protamex, mientras que en los no esenciales se observó que los valores encontrados fueron similares o ligeramente mayores en el caso de Prolina comparado con el polen estéril, pero inferior al encontrado originalmente en el polen fresco. Estos perfiles evidencian la habilidad de las enzimas en modificar las estructuras de proteínas presentes en el polen con la consecuente liberación de aminoácidos. Además, esto también es un indicador útil para explicar parcialmente el incremento en la actividad antioxidante hasta valores del doble con respecto a lo encontrado en el polen fresco, debido a la capacidad anti-radicalaria exhibida y documentada a través de bibliografía de los aminoácidos.

Por otra parte, la comparación entre el polen apícola y el pan de abejas recolectado en el Altiplano Cundiboyacense mostró que las diferencias más evidentes entre estos dos productos, dentro de las variables medidas en este estudio, fueron ocasionadas por una mayor acidez y menor pH en el pan de abejas. La caracterización bioactiva de ambos productos mostró que no existen diferencias significativas en el contenido de flavonoides y fenoles totales, así como en la actividad antioxidante tanto TEAC como FRAP. La digestibilidad medida *in vitro* para ambos productos estuvo en valores cercanos al 65%, lo cual contrasta los resultados de diferentes investigaciones que hacen mención a un mayor nivel de este parámetro para el pan de abejas.

Se realizaron diferentes ensayos de fermentación empleando para ello bacterias acidolácticas y levaduras, tanto comerciales como ATCC. Dentro de los cultivos empleados, la cepa pura de *L. plantarum* y el cultivo comercial Choozit® tuvieron los mejores resultados, en particular cuando un sustrato polen:agua 1:1 fue empleado. Estos cultivos mostraron una mayor producción de acidez y un contenido de células viables por encima de $8 \log_{10}$ (UFC/g). La inclusión de bacterias acidolácticas permitió la obtención de un producto fermentado, en los que a pesar de verse reducidos los valores de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos y flavonoides con respecto al polen estéril, siguen siendo mayores que en el polen fresco y pan de abejas. Esto es un indicador que la fermentación inducida con BAL no es similar al proceso natural al ocurrido en la colmena, no obstante, se obtiene un producto con características bioactivas mejoradas con respecto al pan de abejas.

Micrografías SEM fueron tomadas a los productos fermentados, en las cuales no se evidencia una diferencia estructural entre los pólenes fermentados y el estéril. Sin embargo, el análisis por DSC de las muestras permitió evidenciar una mayor entalpía en los productos fermentados con cultivos comerciales respecto al pan de abejas y polen estéril, en el rango de temperaturas entre 120 y 180°C. Previamente, se había observado una notable diferencia en las entalpías entre el polen fresco y estéril, no obstante, los niveles observados para los productos fermentados, en particular para las BAL fueron aún mayores, lo que permite inferir que una nueva modificación en la estructura del polen fue

lograda como consecuencia de la acción metabólica de los microorganismos. No obstante, esta modificación no fue superior a la hallada con el empleo de proteasas.

La obtención de modelos de utilidad y conveniencia permitió seleccionar el proceso con un cultivo Choozit®, con un sustrato polen:agua 1:1 como el mejor tratamiento entre los realizados específicamente en fermentación, con valores de 0.995 en ambos casos. A pesar que tanto el análisis univariado como multivariado mostró similitudes entre Choozit®, Yomix® y *L. plantarum*, una evaluación global de todas las variables a través de dos modelos matemáticos demostró que la fermentación con Choozit® es casi dos veces más útil y conveniente que los demás tratamientos, basado en las características fisicoquímicas y bioactivas analizadas. En adición el empleo de cultivos comerciales es, en términos prácticos, una forma sencilla de realizar la fermentación de polen, ya que son cepas que están listas para ser empleadas y poseen la habilidad de adaptarse a casi cualquier sustrato que favorezca su crecimiento, a pesar de ser desarrolladas en su mayoría para la industria láctea.

Además de las fermentaciones realizadas con cultivos comerciales y ATCC, se llevaron a cabo ensayos con la mezcla de levaduras y BAL, evaluando también diferentes tiempos de inclusión del cultivo de BAL. Los resultados no mostraron efectos significativos en lo referente a la variación de compuestos bioactivos o actividad antioxidante, ni tampoco se observaron resultados satisfactorios en el crecimiento de células viables o producción de acidez. En comparación, las fermentaciones realizadas con los cultivos individuales mostraron mejores resultados en particular en el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides totales y conteo de células viables al final del proceso.

Finalmente, un análisis del perfil de aminoácidos fue hecho con la fermentación Choozit®, *L. plantarum* y un tratamiento combinado Choozit®-*S. cerevisiae*. De estos, la fermentación con Choozit® mostró incrementos en algunos aminoácidos esenciales tales como arginina, treonina, isoleucina, leucina y fenil alanina y reducción en histidina y lisina, en comparación con el polen fresco. La variación en el contenido de aminoácidos es propio del metabolismo de las BAL que requieren de ciertos aminoácidos para su mantenimiento y, a su vez, producen enzimas proteolíticas que favorecen el rompimiento de cadenas de proteínas, incrementando el contenido de otros aminoácidos, que fue lo observado en este caso para el polen fermentado.

Un análisis de los tratamientos enzimáticos y de fermentación permite establecer, con base en los resultados obtenidos, que el proceso de transformación de polen a realizar sea una hidrólisis enzimática con Protamex en relación enzima/sustrato 5 g/100g, que obtuvo mejores indicadores bioactivos que la fermentación con Choozit.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1. Conclusiones

- El polen fresco recolectado del Altiplano Cundiboyacense presentó un contenido de compuestos nutricionales y bioactivos en una mejor proporción que la mayoría de pólenes reportados en bibliografía, lo que lo convierte en un producto con alto potencial para ser empleado como alimento para humanos. No obstante, el bajo valor de digestibilidad y la precaria calidad microbiológica demostraron la necesidad de emplear procesos de transformación que mejoren las condiciones de disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos, y a su vez, minimicen el riesgo por presencia de microorganismos alteradores o patógenos.
- El tratamiento por altas presiones hidrostáticas se presenta como una alternativa a futuro para el procesamiento de polen. Los ensayos realizados mediante la inclusión de hasta 8% (p/v) de polen en un néctar de piña mostraron un incremento en todos los compuestos bioactivos, incluyendo carotenoides, así como una elevación en la actividad antioxidante del producto. Además, un tratamiento cercano a 400 MPa y 15 min mostró que es capaz de reducir hasta en 5 unidades logarítmicas la presencia de microorganismos patógenos y alteradores.
- Los resultados del Análisis Termogravimétrico (TGA) en los productos tratados térmicamente, evidenciaron que ocurren dos pérdidas de masa considerables, la primera a temperaturas cercanas a los 50°C ocasionado por la evaporación de agua libre, y la segunda a temperaturas cercanas a los 180°C debido a la pérdida de compuestos volátiles. El análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) mostró a su vez un pico endotérmico desde temperaturas de 120°C, lo que la bibliografía asocia a una descomposición de la exina en hidrocarburos, lo cual se relaciona con la pérdida de masa encontrada por TGA. Los valores de entalpía obtenidos para cada tratamiento evidenciaron que tanto la temperatura en secado como el tiempo en la esterilización afectan progresivamente la estructura de exina, sin embargo, las imágenes SEM tomadas a los pólenes tratados térmicamente demostraron que la modificación estructural fue parcial.

- Los tratamientos térmicos de secado y esterilización mejoraron significativamente los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides, teniendo una consecuencia directa con la actividad antioxidante del polen. En el caso del secado, el tratamiento a 60°C fue el de mejor resultados, mientras que la esterilización a 15 min mejora las características bioactivas del polen. En contraste, hubo una reducción de aproximadamente el 50% en el contenido de carotenoides luego de los tratamientos térmicos, con respecto al polen fresco. No obstante se observó que luego de esta pérdida, sin importar la temperatura empleada o el tiempo sometido en autoclave, el nivel de carotenoides se mantuvo estable sin reducciones significativas en su valor. Considerando que la esporopolenina es una molécula que constituida en parte por compuestos fenólicos y carotenoides, el incremento de estas sustancias podría estar relacionado con una degradación de la estructura y una consecuente liberación de los componentes bioactivos.
- En lo referente a los tratamientos combinados, los resultados mostraron un mejor efecto en los compuestos bioactivos y actividad antioxidante cuando primero se hizo una esterilización y luego un secado. Bajo estas condiciones, los productos tratados en autoclave durante 15 minutos a cualquier temperatura presentaron una elevación en el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y actividad antioxidante a niveles similares a los presentados en los tratamientos independientes de esterilización o secado. En adición, los resultados microbiológicos mostraron una reducción notoria en la carga microbiana del producto. La evaluación del flujo de calor por DSC evidenció que los tratamientos con mayor tiempo de esterilización fueron los que más degradaron la esporopolenina, basado en sus valores de entalpía.
- En contraste, el tratamiento secado-esterilización no presentó diferencias significativas en su composición con respecto al polen fresco, con excepción de la reducción en el contenido de carotenoides. Tanto las imágenes por SEM como los resultados obtenidos por DSC sugieren que no hubo una alteración notoria en la estructura. Los resultados de compuestos bioactivos, digestibilidad y actividad antioxidante no tuvieron diferencias significativas con respecto al polen fresco, mientras que los resultados microbiológicos sugieren que reducir el contenido de agua libre en el polen implica que la esterilización requiera de mayor tiempo para garantizar su efectividad en la eliminación de la carga microbiológica indeseable, dado que solamente con tratamientos por 15 min fue posible lograr resultados satisfactorios.
- Con base en modelos de utilidad y conveniencia, se estableció que el mejor tratamiento térmico fue la esterilización por 15 min, el cual favoreció una mejora global entre los compuestos fenólicos y flavonoides y la actividad antioxidante, y a su vez eliminando toda la carga microbiológica presente.
- Considerando una comercialización directa del polen el secado a 60°C es la técnica más conveniente para la eliminación de humedad presente en el grano. Este

tratamiento es admisible para el almacenamiento y comercialización de polen, ya que garantiza que la carga microbiológica se encuentre por debajo de los valores de referencia. No obstante, es importante establecer el tiempo de vida útil del producto seco, definiendo el periodo durante el cual se puede garantizar que ésta carga microbiológica permanece en niveles aceptables.

- Los ensayos de fermentación de polen demostraron que los cultivos comerciales Choozit® y Yomix® obtuvieron los mejores resultados en términos de conteo de células viables y acidez producida al final del bioproceso. En lo que respecta al contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante se observó que los niveles fueron significativamente mayores a los reportados para el polen fresco, no obstante se encontró una reducción de los mismos en comparación al polen tratado térmicamente. Entre todas las relaciones polen:agua utilizadas como sustrato, se determinó que la relación 1:1 fue la que mejor resultado global presentó, demostrando que la fermentación mejora con la presencia de agua. Con base en lo anterior, el polen fermentado se presenta como una opción interesante para la formulación de productos con características probióticas.
- Los resultados de DSC presentaron un incremento notorio en la entalpía en los pólenes fermentados en comparación al polen estéril, sugiriendo que los microorganismos pudieron haber realizado una nueva modificación en la estructura del polen. En ese orden de ideas, la fermentación en sí ayudó en la liberación de compuestos que aún estaban contenidos en el grano de polen y favoreció reacciones de proteólisis. Como se demuestra con la fermentación con Choozit®, luego de la fermentación hubo incrementos en algunos aminoácidos esenciales tales como arginina, treonina, isoleucina, leucina y fenil alanina. No obstante, los valores de compuestos fenólicos y actividad antioxidante tuvieron una reducción significativa en comparación al polen estéril, lo cual podría estar relacionado al consumo de estos componentes por parte de los microorganismos para su metabolismo.
- Los tratamientos de hidrólisis enzimática en polen demostraron que los mejores productos obtenidos fueron aquellos tratados con las proteasas Protamex® y Neutrase®. Los valores de entalpía obtenidos para las enzimas, mostraron que el tratamiento con Protamex® fue 5 veces mayor que el obtenido para polen estéril, lo cual es un indicador que esta enzima modificó notablemente la esporopolenina. En consecuencia, los niveles de compuestos bioactivos y actividad antioxidante fueron superiores tanto al polen fresco como al polen tratado térmicamente; así mismo, los resultados de digestibilidad tuvieron un incremento notorio que no había sido encontrado con el empleo de los tratamientos físicos ni con la fermentación. A partir de los modelos de conveniencia y utilidad se pudo concluir que de las dos relaciones enzima sustrato evaluadas, la mejor fue 5 g / 100 g.
- El perfil de aminoácidos para los productos hidrolizados con Neutrase y Protamex presentó incrementos notorios en todos los aminoácidos esenciales, evidenciando la

habilidad de las enzimas en modificar las estructuras de proteínas presentes en el polen con la consecuente liberación de aminoácidos. Esta liberación también explica el incremento en la actividad antioxidante del polen hidrolizado.

- A partir de los resultados obtenidos, es posible establecer que un tratamiento de esterilización y posterior hidrólisis de polen, se presenta como la mejor opción para transformar el polen en un producto con características nutricionales y bioactivas mejoradas, a partir de la evaluación de estas propiedades a nivel *in vitro*. Como estrategia de diversificación del polen para el acceso y comercialización en nuevos mercados, un producto hidrolizado podría ofrecerse para consumo directo o como materia prima para su inclusión en otros alimentos.

4.2. Recomendaciones

- Con base en los resultados obtenidos, sería interesante poder realizar análisis *in vivo* tanto de la disponibilidad como de absorción de compuestos nutricionales y bioactivos en seres humanos. De esta forma se podría complementar la información presentada en este trabajo.
- Profundizar la investigación en lo referente al empleo de cultivos comerciales para la fermentación de polen. En particular, evaluar otro tipo de condiciones de fermentación, tales como temperatura, mezclas de microorganismos y cantidad de inóculo inicial, con el fin de encontrar las condiciones más adecuadas de proceso. También sería interesante evaluar el efecto de iniciar la fermentación reduciendo el contenido de acidez del polen fresco, con el fin de analizar si el rendimiento y la productividad del bioproceso mejoran.
- En el caso de la hidrólisis enzimática, las futuras investigaciones deberían dirigirse a la evaluación de diferentes tipos de proteasas para analizar su efecto sobre las características estructurales y bioactivas del polen. Además sería interesante evaluar nuevas relaciones enzima sustrato para establecer el contenido óptimo de enzima a adicionar. Este trabajo se presenta como uno de los primeros en su clase en los que se plantea la hidrólisis de polen apícola colombiano como tratamiento para la mejora de factores nutricionales y bioactivos, por lo tanto serviría como punto de partida para que en futuros trabajos se evalúe el grado de hidrólisis del bioproceso y así mismo se pueda realizar un estudio cinético.
- Para los productos fermentados es recomendable establecer la vida útil del producto, garantizar la viabilidad de los microorganismos en condiciones de almacenamiento que aseguren la condición probiótica del producto fermentado. Evidentemente, debido a la poca información disponible, este trabajo se presenta como punto de partida para la realización de más investigaciones que permitan definir con mayor claridad los diferentes fenómenos que ocurren a lo largo de estos bioprocesos como pueden ser encontrar las condiciones óptimas del proceso, así como evaluar el efecto del tratamiento sobre diversos compuestos bioactivos que también son de interés en el polen como lo podrían ser las vitaminas, por ejemplo.
- Evaluar el potencial del producto para su empleo como alimento directo o para su inclusión en otros productos como ingrediente. Esta evaluación debería realizarse basada en costos de producción y aceptación sensorial por parte de los consumidores. Un análisis del mercado permitiría definir el potencial de crecimiento de la producción de polen en la región. Estas estrategias complementarias deben estar encaminadas al incremento de la competitividad de la cadena de las abejas y la apicultura en Colombia, considerando que la cría y manejo de abejas es una actividad

articulada con el medio ambiente y que dadas las condiciones de productividad de Colombia podría mejorar las condiciones y la calidad de la alimentación humana.

A. Anexo: Socialización de resultados

Artículos

1. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Serrato-Bermúdez J. Bee-Pollen Structure Modification by Physical and Biotechnological Processing: Influence on the Availability of Nutrients and Bioactive Compounds. *Chemical Engineering Transactions*. 43:79-84. 2015.
2. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Serrato-Bermúdez J. Chemical, Nutritional and Bioactive Characterization of Colombian Bee-bread. *Chemical Engineering Transactions*. 43:175-180. 2015.
3. **Zuluaga-Domínguez C.**, Serrato-Bermúdez J., Quicazán M. Valorization alternatives of Colombian bee-pollen for its use as food resource: a structured review. *Vitae*. 21(3):237-247. 2014.
4. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Evaluación de Características Bioactivas y Estructurales en Polen Apícola y Pan de Abejas. *Revista Facultad Nacional De Agronomía*. 67(S2):588-590. 2014.
5. Salazar C., **Zuluaga-Domínguez C.**, Díaz-Moreno C. Evaluación con Nariz Electrónica de la Fermentación en Fase Sólida de *Lactobacillus plantarum* sobre Polen Apícola. *Revista Facultad Nacional De Agronomía*. 67(S2):900-902. 2014.
6. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Relación entre Compuestos Bioactivos y Actividad Antioxidante de Polen Apícola Empleando Análisis de Correlación Canónica. *Revista Facultad Nacional De Agronomía*. 67(S2):655-656. 2014.
7. Castro-Mercado, L., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Contenido Proteico y Digestibilidad Aparente de Polen Apícola y Pan de Abejas del Altiplano Cundiboyacense. *Revista Facultad Nacional De Agronomía*. 67(S2):807-809. 2014.

8. Fuenmayor-Bobadilla C., **Zuluaga-Domínguez C.**, Díaz-Moreno C., Quicazán M., Cosío M., Maninno S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Revista Mvz Córdoba*. 19(1):4003-4014. 2014.
9. Díaz-Moreno C., **Zuluaga-Domínguez C.**, Morales C., Quicazán M. Determinación de fibra dietaria en polen apícola colombiano. *Vitae*. 19(S1):454-456. 2012.

Memorias en eventos científicos

1. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Serrato-Bermúdez J. Valoración de la calidad microbiológica de polen apícola sometido a diferentes procesos térmicos. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID. ISSN: 2390-0148, Volumen 2. Manizales, Colombia. Octubre 21-23 de 2015.
2. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Serrato-Bermúdez J. Evaluación del efecto de tratamientos térmicos sobre las características bioactivas y estructurales de polen apícola. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID. ISSN: 2390-0148, Volumen 2. Manizales, Colombia. Octubre 21-23 de 2015.
3. Castro-Mercado, L., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., de Paula C., Pastrana Y. Evaluación de la capacidad antioxidante de polen apícola, pan de abejas, productos hidrolizados y fermentados. Simposio Agroalimentario Universidad De Córdoba. ISSN: 2248-6178. Montería, Colombia. Octubre 7-10 de 2014.
4. Durán-Jiménez A., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Rectificación de las prácticas de cosecha y deshidratación en el beneficio del polen apícola en Colombia. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID. ISSN: 2390-0148. Bogotá D.C., Colombia. Septiembre 5-9 de 2014.
5. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Serrato-Bermúdez J. Influencia de tratamientos térmicos sobre el contenido de flavonoides totales y actividad antioxidante en polen apícola. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID. ISSN: 2390-0148. Bogotá D.C., Colombia. Septiembre 5-9 de 2014.
6. **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Serrato-Bermúdez J. Efecto de la inclusión de nutrientes sobre la fermentación de polen apícola utilizando bacterias ácido - lácticas. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID. ISSN: 2390-0148. Bogotá D.C., Colombia. Septiembre 5-9 de 2014.
7. Castro-Mercado, L., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Pastrana Y., de Paula C. Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y

- Desarrollo ENID. ISSN: 2390-0148. Bogotá D.C., Colombia. Septiembre 5-9 de 2014.
8. Salazar C., Díaz-Moreno C., **Zuluaga-Domínguez C.**, Gutiérrez C. Evaluación de diferentes tratamientos térmicos en polen apícola como sustrato para una fermentación. Memorias Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA 9. ISBN: 978-84-9048-168-4. Valencia, España. Enero 13-16 de 2014.
 9. **Zuluaga-Domínguez C.**, Durán-Jiménez A., Quicazán M. Caracterización del color de polen apícola colombiano mediante análisis de imágenes y estadística multivariada. Memorias Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos - CIBIA 9. ISBN: 978-84-9048-168-4. Valencia, España. Enero 13-16 de 2014.
 10. Gutiérrez M., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Evaluación de diferentes opciones de fermentación en fase sólida de polen apícola con bacterias ácido-lácticas, para su empleo como fuente nutricional. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. ISBN: 978-958-761-740-5. Medellín, Colombia. Diciembre 4-6 de 2013.
 11. Segura M., Salazar C., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Estimación del deterioro nutricional de polen apícola sometido a deshidratación y tratamientos térmicos higienizantes. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. ISBN: 978-958-761-740-5. Medellín, Colombia. Diciembre 4-6 de 2013.
 12. **Zuluaga-Domínguez C.**, Serrato-Bermúdez J., Quicazán M. Valorización del polen apícola como alimento mediante el desarrollo de procesos físicos y biotecnológicos. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. ISBN: 978-958-761-740-5. Medellín, Colombia. Diciembre 4-6 de 2013.
 13. Durán-Jiménez A., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Evaluación de las alternativas actuales de secado de polen apícola del altiplano Cundiboyacense. Memorias Seminario Internacional Secado de Productos Agrícolas. ISBN: 978-958-761-342-1. Bogotá D.C., Colombia. Octubre 24-26 de 2012.
 14. Fuenmayor-Bobadilla C., Díaz-Moreno C., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Solid state fermentation of bee-collected pollen induced by lactic-acid starter cultures with probiotic bacteria. II International Symposium on Bee Products. ISBN: 987-972-745-140-1. Braganza, Portugal. Septiembre 9-12 de 2012.
 15. Quicazán M., Fuenmayor-Bobadilla C., Díaz-Moreno C., **Zuluaga-Domínguez C.** A contribution to the establishment of bromatological reference values for Colombian pollen in the context of Latin American Regulations. II International Symposium on

Bee Products. ISBN: 987-972-745-140-1. Braganza, Portugal. Septiembre 9-12 de 2012.

16. **Zuluaga-Domínguez C.**, Durán-Jiménez A., Díaz-Moreno C., Quicazán M. Estrategias para la implementación de Buenas Prácticas en la cadena productiva de polen apícola en Colombia. Memorias Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. ISBN 978-958-761-308-7. Bogotá D.C., Colombia. Agosto 29-31 de 2012.

Ponencias orales

1. Avances en la valoración del polen mediante el desarrollo de procesos físicos y biotecnológicos. En: Escuela internacional: Investigación y desarrollo en productos de las abejas: oportunidad de progreso social, ambiental y económico para Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia. Noviembre 4-13 de 2015.
2. Structural disruption and bioactive effect on bee-pollen treated by proteolytic enzymes. En: 44th Apimondia. Daejeon, Corea del Sur. Septiembre 15-20 de 2015.
3. Bee-Pollen Structure Modification by Physical and Biotechnological Processing: Influence on the Availability of Nutrients and Bioactive Compounds. En: International Conference on Chemical & Process Engineering. Milán, Italia. Mayo 20-22 de 2015.
4. Chemical, Nutritional and Bioactive Characterization of Colombian Bee-bread. En: International Conference on Chemical & Process Engineering. Milán, Italia. Mayo 20-22 de 2015.
5. Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales. En: Seminario Alimentación y Nutrición para el Futuro: Integración entre investigación, educación e industria. Universidad Nacional de Colombia - Instituto Italo-latinoamericano IILA. Bogotá D.C., Colombia. Octubre 9-10 de 2014.
6. Relación entre Compuestos Bioactivos y Actividad Antioxidante de Polen Apícola Empleando Análisis de Correlación Canónica. En: II Congreso ciencia y tecnología de alimentos - IICTA. Medellín, Colombia. Mayo 28-30 de 2014.
7. Evaluación de Características Bioactivas y Estructurales en Polen Apícola y Pan de Abejas. En: Seminario sobre calidad y generación de valor en productos de las

- abejas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. Mayo 28-30 de 2014.
8. Valoración del polen apícola mediante la aplicación de procesos físicos y biotecnológicos. En: Seminario sobre calidad y generación de valor en productos de las abejas. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia. Mayo 28-30 de 2014.
 9. A scanning electron microscope approach to describe bee-pollen structure modification due to thermal processes. En: 43rd. Apimondia. Kiev, Ucrania. Septiembre 29-Octubre 4 de 2013.
 10. Bee-bread of Colombian stingless bees and *Apis mellifera*: nutritional characteristics and physicochemical quality indicators. En: 43rd. Apimondia. Kiev, Ucrania. Septiembre 29-Octubre 4 de 2013.
 11. Effect of heat treatment upon the structure and thermoanalytical properties of bee-pollen used as a food supplement. En: 9th European Congress of Chemical Engineering. La Haya, Holanda. Abril 21-25 de 2013.

Póster

1. Castro-Mercado, L., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M., Pastrana Y., de Paula C. Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. En: Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo ENID. Bogotá D.C., Colombia. Septiembre 5-9 de 2014.
2. **Zuluaga-Domínguez C.**, Serrato-Bermúdez J., Quicazán M. Aplicación de procesos físicos y biotecnológicos como estrategia para la mejora nutricional y bioactiva de polen apícola. En: Coloquio Doctoral de la Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Julio 1 de 2014.
3. Durán-Jiménez A., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Granulometric classification as tool for pollen quality improving. En: 43rd. Apimondia. Kiev, Ucrania. Septiembre 29-Octubre 4 de 2013.
4. Gutiérrez M., **Zuluaga-Domínguez C.**, Quicazán M. Evaluación de diferentes opciones de fermentación en fase sólida de polen apícola con bacterias ácido-lácticas, para su empleo como fuente nutricional. En: Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. Medellín, Colombia. Diciembre 4-6 de 2013.

Manuscritos sometidos a evaluación

1. **Zuluaga-Domínguez C.**, Martínez A., Fernández J., López-Baldó J., Quiles A., Rodrigo D. Effect of High Pressure Processing on Carotenoid and Phenolic Compunds, Antioxidant Capacity and microbial counts of bee-pollen paste and bee-pollen based beverage. Sometido a evaluación en: Journal of Food Engineering.
2. **Zuluaga-Domínguez C.**, Serrato-Bermúdez J., Quicazán M. Effect of thermal treatments on physical-chemical, bioactive and microbiological characteristics of bee-pollen. Sometido a evaluación en: Apidologie.
3. **Zuluaga-Domínguez C.**, Serrato-Bermúdez J., Quicazán M. Bioactive and antioxidant characteristics of a food product based on bee-pollen and lactic acid bacteria. Sometido a evaluación en: Brazilian Journal of Food Technology.
4. **Zuluaga-Domínguez C.**, Serrato-Bermúdez J., Quicazán M. Effects of enzymatic hydrolysis on bioactive composition and antioxidant activity of bee-pollen by using commercial enzymes. Sometido a evaluación en: Revista MVZ Córdoba.

B. Anexo: Perfil de aminoácidos y ácidos grasos del polen tratado térmicamente

Metodología

Perfil de ácidos grasos

La composición de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases, según el método AOAC 969.33 (AOAC, 2005). Este servicio fue prestado por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Los extractos fueron obtenidos mediante el uso de éter de petróleo como solvente y se sometieron a derivatización con metóxido de sodio hasta obtener una emulsión. Los ésteres metílicos producidos fueron medidos mediante cromatografía en un sistema Agilent 7890A con una columna OSGE BPX 70 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). La temperatura del inyector se fijó en 210°C, la del detector fue 220° C y la de la columna se mantuvo a 180°C. El caudal del gas portador (He) fue de 1 a 1.5 mL/min. La identificación y cuantificación de ácidos grasos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención con los estándares que se inyectaron el mismo día.

Aminoácidos

La determinación y cuantificación de aminoácidos fue hecha de acuerdo al método AOAC 994.12 alternativa III, método de hidrólisis ácida (AOAC, 2005). Este servicio fue prestado por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. Aproximadamente 1 g de muestra fue pesada, y luego del procedimiento establecido en la AOAC, la solución obtenida fue llevada a un volumen de 100 mL y diluida en una relación 5/25. La solución final fue inyectada en un HPLC Agilent 1100, usando una columna Zorbax Eclipse-AAA (Agilent Technologies, USA).

Resultados

Perfil de aminoácidos de polen tratado térmicamente

El perfil de aminoácidos del polen fresco y tratado a 60°C aparece en la Tabla B-1, con valores expresados en mg/g de polen. Quince aminoácidos fueron cuantificados, siendo los más abundantes prolina y ácido glutámico. Una comparación del perfil de aminoácidos muestra que los niveles de muchos de los aminoácidos individuales son similares antes y después de los procesos de secado. No obstante, se encontró una reducción en histidina (19%), arginina (19%), lisina (32%) y prolina (34%). De estos, histidina, arginina y lisina son aminoácidos esenciales de carácter básico.

Por otra parte, una comparación de resultados con el polen fresco permite establecer, que al igual que en el secado, el tratamiento en autoclave provocó una disminución en los aminoácidos histidina, arginina, lisina y prolina, sin embargo, en este tratamiento la disminución de estos aminoácidos fue mayor que en secado.

Tabla B-1. Contenido de aminoácidos en polen fresco y seco.

Aminoácido	Polen fresco mg/g	Polen seco (60°C) mg/g	Polen estéril (15 min) mg/g
Asp	2.54	2.53	2.49
Glu	2.93	3.04	2.89
Ser	1.41	1.40	1.36
His	0.58	0.47	0.41
Gly	1.25	1.25	1.25
Thr	1.19	1.20	1.19
Arg	1.75	1.41	1.41
Ala	1.48	1.46	1.43
Tyr	0.81	0.78	0.78
Val	1.14	1.14	1.24
Phe	1.16	1.17	1.21
Ile	1.05	1.03	1.09
Leu	1.88	1.86	1.87
Lys	1.61	1.10	0.94
Pro	2.38	1.57	1.35
Gln	ND	ND	ND

N.D. No detectable

Perfil de ácidos grasos del polen tratado térmicamente

Finalmente, el análisis cromatográfico cuantificó siete ácidos grasos en las muestras, de los cuales el láurico, palmítico, linoleico y α -linolénico están en una cantidad mayor al 2%

de los ácidos grasos totales. Las composiciones porcentuales de ácidos grasos en las muestras estudiadas, así como la proporción entre ácidos grasos insaturados/saturados se muestran en la Tabla B-2.

Tabla B-2. Contenido de ácidos grasos en polen fresco y polen seco.

Ácido graso	Número lipídico	Polen fresco g / 100 g	Polen seco (40°C) g / 100 g	Polen seco (50°C) g / 100 g	Polen seco (60°C) g / 100 g
Laúrico	12:0	3.83	3.50	3.73	3.67
Mirístico	14:0	0.61	0.75	0.54	0.67
Palmítico	16:0	7.61	7.50	7.16	7.27
Esteárico	18:0	0.97	0.83	0.75	0.88
Total saturados		13.02	12.58	12.18	12.49
Oléico	18:1	1.49	1.80	1.93	2.07
Linoléico	18:2	5.21	3.64	4.29	3.87
Linolénico	18:3	17.96	18.23	15.18	15.90
Total insaturados		24.66	23.67	21.40	21.84
Relación insaturado/saturado		1.89	1.88	1.76	1.75

Dentro de los ácidos grasos cuantificados se puede establecer que el polen apícola de la región de estudio contiene en orden decreciente los ácidos α -linolénico, palmítico, linoléico, láurico, oléico, esteárico y mirístico. Con respecto a la proporción entre ácidos grasos insaturados y saturados, se encontró que el polen tiene una relación insaturados/saturados mayor a 1, como ha sido reportado por diversos autores para pólenes de diversos orígenes (Loper *et al.*, 1980; Bonvehi *et al.*, 1986; Serra-Bonvehi and Jordá, 1997). De acuerdo a los valores obtenidos, se observan ligeras reducciones de los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico con el aumento de la temperatura de secado, mientras que en los insaturados hay un incremento de ácido oléico. También es posible definir la reducción en el contenido total de ácidos grasos saturados e insaturados en comparación con el polen fresco, sin embargo, no es posible establecer si la temperatura ejerce un efecto considerable sobre esta reducción.

Según Markowicz *et al.* (Markowicz *et al.*, 2004), los ácidos grasos insaturados del polen son susceptibles a la oxidación por acción de las enzimas hidrolíticas encontradas en las secreciones salivares de la abeja, así como por el efecto térmico y la exposición al oxígeno al momento de manipular el producto. Como consecuencia de esta oxidación, la relación de ácidos grasos insaturados/saturados va disminuyendo. Dicha relación se puede interpretar como un indicador de calidad y se puede afirmar entonces, que el polen de la región estudiada se caracteriza por una contribución importante de ácidos grasos insaturados, los cuales se componen principalmente de los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6. Debido a este aporte y a la presencia de compuestos como el ácido láurico y mirístico, al polen se le confieren propiedades antibacteriales y fungicidas (Manning, 2006).

Por otra parte, los resultados del perfil de ácidos grasos para cada tratamiento en autoclave son presentados en la Tabla B-3. Se observa la disminución progresiva del contenido de los ácidos palmítico y esteárico, al igual que el valor total de ácidos grasos saturados pasando de 13.02 g/100 g en el polen fresco hasta 7.26 g/100 g en el polen tratado en autoclave durante 15 minutos. En proporción, la reducción de los ácidos grasos saturados alcanzó valores de hasta 30% para ácido láurico, 20% para ácido mirístico, 53% para ácido palmítico y 44% para ácido esteárico. Un efecto similar ocurrió para los ácidos grasos insaturados, en particular los ácidos linoléico y linolénico que se redujeron hasta en un 30% y 45%, respectivamente. Como se mencionó anteriormente, el efecto térmico promueve una oxidación de los ácidos grasos insaturados y como consecuencia de esta oxidación, la relación de ácidos grasos insaturados/saturados va disminuyendo.

Tabla B-3. Contenido de ácidos grasos en polen fresco y tratado en autoclave.

Ácido graso	Número lipídico	Polen fresco g / 100 g	Polen estéril (5 min) g / 100 g	Polen estéril (10 min) g / 100 g	Polen estéril (15 min) g / 100 g
Laúrico	12:0	3.83	3.02	3.44	2.69
Mirístico	14:0	0.61	0.59	0.68	0.49
Palmítico	16:0	7.61	5.06	3.90	3.54
Esteárico	18:0	0.97	0.71	0.72	0.54
Total saturados		13.02	9.38	8.74	7.26
Oléico	18:1	1.49	1.64	1.78	1.55
Linoléico	18:2	5.21	4.20	4.09	3.66
Linolénico	18:3	17.96	13.18	10.72	9.86
Total insaturados		24.66	19.02	16.59	15.07
Relación insaturado/saturado		1.89	2.03	1.90	2.08

C. Anexo: Fichas técnicas cultivos microbiológicos

CULTURES DIVISION
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 1 / 3

Valid from: August 31, 2011

DANISCO

First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 206875-8.0EN

Material no. 50574

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU

CHOOZIT™ Cheese Cultures

Description

Freeze-dried concentrated lactic starter for the direct vat inoculation of milk and milk bases.

Usage levels

Product	Dose
Fermented milk	20 DCU / 100 l of vat milk
Reblochon type	5 - 8 DCU / 100 l of vat milk
Specialties soft cheese, semi-hard cheese	5 - 8 DCU / 100 l of vat milk

Temperature: 42 °C

The quantities of inoculation indicated should be considered as guidelines. Supplement cultures may be required depending on technology, fat content and product properties desired.

We do not accept any liability in case of undue application.

Directions for use

Store at temperature < 4 °C in dry atmosphere. When stored at negative temperature, keep the sachet at room temperature for 30 to 60 minutes before opening. If not, the performance of the culture is affected. Prolonged exposure at room temperature will reduce performances. Check before use that the culture is in powder form. Add directly to the manufacturing milk as soon as the agitation blades of the vat are covered with milk. Avoid foam and air introduction in the milk.

Important recommendations:

If the product has formed a solid mass, it should be discarded. To keep bacteriophage contamination under control, ensure plant and equipments are cleaned and disinfected with appropriate products at regular intervals to limit bacteriophage concentration level. Avoid any system that brings back part of end products to the beginning of the processing line in order to limit phage propagation.

We do not accept any liability in case of undue application.

Composition

Streptococcus thermophilus
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus
Carrier:
Sucrose
Maltodextrins

Properties

- Freeze dried form facilitates the storage and handling of cultures.
- CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU is a blend of selected strains for direct vat inoculation of manufacturing milk, they have been carefully chosen and combined to answer your specific needs in term of acidification, texture and taste.
- CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU gives quick acidification to pH 4.70 - 4.60 and then, a slower acidification to reach lower pH. This characteristic allows a good pH control for a constant optimised quality product.

Physical/chemical specifications

Quantitative/Activity standard

Test medium:
Sterilised reconstituted milk (10% solids)
Heated 20 min at 110 °C. Standardised to pH 6.60

Temperature:	42 °C
Inoculation rate:	20 DCU / 100 l
Delta pH:	1.00
Time to reach the delta pH:	<= 3 hours

CULTURES DIVISION
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 2 / 3

Valid from: August 31, 2011



PRODUCT DESCRIPTION - PD 206875-8.0EN

Material no. 50574

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU

CHOOZIT™ Cheese Cultures

Microbiological specifications

Microbiological quality control - standard values and methods

Non-lactic acid bacteria	< 500 CFU/g
Enterobacteriaceae	< 10 CFU/g
Yeasts and Moulds	< 10 CFU/g
Enterococci	< 100 CFU/g
Clostridia Spores	< 10 CFU/g
Coagulase-positive staphylococci	< 10 CFU/g

Kosher status

KOSHER O-U-D

Halal status

certified by Halal Food Council of Europe (HFCE)

Allergens

Listeria monocytogenes	neg. / 25 g
Salmonella spp.	neg. / 25 g

Analytical methods available upon request

Storage

18 months from date of production at <= 4 °C

Packaging

Sachets made with three layers of material (polyethylene, aluminium, polyester).

Quantity

Selling unit: 1 carton containing 50 sachets.

Purity and legal status

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU complies with all EU food legislations.

Other local regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food may vary from country to country.

Safety and handling

SDS is available on request.

Below table indicates the presence of the following allergens and products thereof:

Yes	No	Allergens	Description of components
	X	wheat	
	X	other cereals containing gluten	
	X	crustacean shellfish	
	X	eggs	
	X	fish	
	X	peanuts	
	X	soybeans	
	X	milk (including lactose)	
	X	nuts	
	X	celery	
	X	mustard	
	X	sesame seeds	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	
	X	lupin	
	X	molluscs	

Local regulation has always to be consulted as allergen labelling requirements may vary from country to country.

Additional information

ISO 9001 certified
ISO 22000 certified
FSSC 22000 certified

CULTURES DIVISION
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 3 / 3

Valid from: August 31, 2011



PRODUCT DESCRIPTION - PD 206875-8.0EN

Material no. 50574

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU
CHOOZIT™ Cheese Cultures

GMO status

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU does not consist of, nor contains, nor is produced from genetically modified organisms according to the definitions of Regulation (EC) 1829/2003 and Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

Danisco Cultures
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 1 / 3

DANISCO

First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 205687-7.5EN

Material no. 11389063

YO-MIX™ 215 LYO 100 DCU

YO-MIX™ Yogurt Cultures

Description

Freeze-dried culture for direct inoculation of process milk

Defined, thermophilic multiple-species culture

Usage levels

Product	Dose
set yoghurt	15 - 60 DCU / 100 l
stirred yoghurt	10 - 50 DCU / 100 l
drinking yoghurt	10 - 50 DCU / 100 l

The quantities of inoculation indicated should be considered as

guidelines. Supplement cultures may be required depending on technology, fat content and product properties desired.

We do not accept any liability in case of undue application.

Directions for use

Disinfect opening area with ethanol (approx. 70 %) before opening package. Cut open and add culture to process milk under aseptic conditions. It has to be considered that the whole content of the pouch has to be applied per propagation in order to assure constant product quality.

Composition

Streptococcus thermophilus
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis
Lactobacillus acidophilus
Bifidobacterium lactis

Properties

Mild acidifying polysaccharide forming culture containing bifidobacteria. It forms predominantly L(+) type lactic acid. YO-MIX™ 215 LYO 100 DCU produces strong viscosity and thus very creamy final products.

YO-MIX™ 215 LYO 100 DCU is particularly suitable for production of set and stirred mild yoghurt.

Physical/chemical specifications

Direct inoculation:

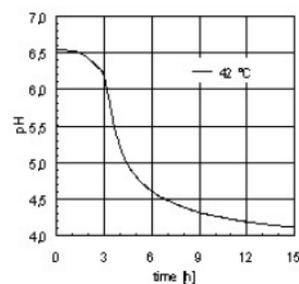
Test medium:
reconstituted skim milk with 9 % of dry matter
heated at 95 ± 3 °C for 30 min

Fermentation:

inoculation amount: 1 pouch / 1,000 l
inoculation and incubation temperature: 38 °C

pH after 10 h ≤ 4.65

Standard acidification curve



Danisco Cultures
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 2 / 3



First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 205687-7.5EN

Material no. 11389063

YO-MIX™ 215 LYO 100 DCU

YO-MIX™ Yogurt Cultures

Microbiological specifications

Microbiological quality control - standard values and methods [UM-]

Examination of culture:

Cell count

streptococci >= 5.0E+09 / g [UM-015]
lactobacilli >= 1.0E+09 / g [UM-009]
bifidobacteria >= 6.0E+09 / g [UM-006]

non-lactic acid bacteria < 100 / g [UM-030]
enterobacteriaceae < 1 / g [UM-031]
yeasts and moulds < 10 / g [UM-017]
enterococci < 10 / g [UM-033]
Staphylococcus aureus < 1 / g [UM-034]
Bacillus cereus* < 10 / g [UM-041]
salmonellae* neg. / 25 g [UM-038]
listeria* neg. / 25 g [UM-039]

* not necessarily examined for each lot, but ensured by HACCP system as well as by plant and personnel hygiene.

Storage

12 months from date of production at <= -18 °C

Packaging

PE, PET, Al laminated foil

Purity and legal status

YO-MIX™ 215 LYO 100 DCU meets the specification laid down by the EU legislation.

Label food regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation

regarding its use in food may vary from country to country.

Safety and handling

MSDS is available on request.

Kosher status

Dairy Kosher

Allergens

Below table indicates the presence of the following allergens and products thereof:

Yes	No	Allergens	Description of components
	X	cereals containing gluten	
	X	crustacean shellfish	
	X	eggs	
	X	fish	
	X	peanuts	
	X	soybeans	
X		milk (including lactose)	
	X	nuts	
	X	celery	
	X	mustard	
	X	sesame seeds	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	

Additional information

The values indicated in this document correspond to results from standardized laboratory tests. They should be considered as guidelines. In practice, other values are expected depending on the type of product and technology. Due to advances in technology and continuous product improvement it may be necessary to change standard values in the future.

Danisco Cultures
cultures@danisco.com
www.danisco.com

Page 3 / 3



First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 205687-7.5EN

Material no. 11389063

YO-MIX™ 215 LYO 100 DCU

YO-MIX™ Yogurt Cultures

GMO status

YO-MIX™ 215 LYO 100 DCU does not consist of, nor contains, nor is produced from genetically modified organisms according to the definitions of Regulation (EC) 1829/2003 and Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

For the raw materials having the potential of being produced from genetically modified organisms, we have obtained written information from our suppliers stating that the raw materials are not produced from genetically modified organisms according to the definitions of the above mentioned EC Regulations.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Saccharomyces cerevisiae Catalog Number: 0699 Lot Number: 639-SS Reference Number: ATCC® 9387™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFU per Pellet Passage from Reference: 4</p>	<p>Expiration Date: 2013/10 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 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> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="margin-right: 20px;">  </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. It is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 20px;">  <p>TESTING CERT #2655.01</p> </div> <div> <p>(1) 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: <i>Lactobacillus acidophilus</i> Catalog Number: 0243 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: 2011/5/14</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> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(*) 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> </div> </div> <div style="display: flex; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> </div> <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: 0294 Lot Number: 294-29 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. Stanoch 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 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; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="292 619 438 672"> </div> <div data-bbox="519 609 1304 651"> <p>© The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics Inc. Licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="292 693 462 808"> <p>TESTING CERT #2655.01</p> </div> <div data-bbox="519 682 812 714"> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> </div>	

D. Anexo: Fichas técnicas de las enzimas empleadas

SAFETY DATA SHEET



Revision date: 09/22/2011

Version No: 2

1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product Name	Alcalase® 2.4 L FG
Chemical Name	Enzyme preparation
Declared activity	Protease (Subtilisin)
Use of the substance/preparation	Novozymes' enzyme preparations are biocatalysts used in a variety of industrial processes within food manufacturing
Contact Manufacturer	Novozymes North America, Inc. 77 Perry Chapel Church Rd., Box 576 Franklinton, NC 27525 E-mail: SafetyDataSheet@novozymes.com www.novozymes.com
Information Telephone Number	1-919-494-3000, 8 am - 4:30 pm EST M-F
Emergency Telephone Number	1-800-424-9300 (Chemtrec) 24 hours every day

Alcalase® 2.4 L FG

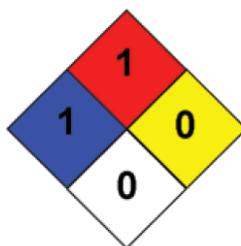
Revision date: 09/22/2011



2. HAZARDS IDENTIFICATION

See Section 4 for first aid

1	Health
1	Flammability
0	Reactivity
X	Protective Equipment



OSHA Regulatory Status This material is covered under the OSHA Hazard Communication Standard (29 CFR 1910.1200)

Physico-chemical properties The data available do not support any physical or chemical hazard

Environmental Effects The data available do not support any environmental hazard

Human health effects Repeated inhalation of enzyme dust or aerosols resulting from improper handling may induce sensitization and may cause allergic type 1 reactions in sensitized individuals
Mild skin irritation
Mild eye irritation

Effects of overexposure See Section 4

See Section 11 for additional Toxicological information

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Hazardous Components

Chemical Name	CAS-No	EC No.	IUB No.	Weight %**
Protease (Subtilisin)	9014-01-1	232-752-2	3.4.21.62	10 - 20

** : Enzymes are defined as enzyme concentrate (dry matter basis)

4. FIRST AID MEASURES

In case of unintended overexposure, the following measures apply

Inhalation

www.novozymes.com

Page 2 / 7

Product Name
Alcalase 2.4 L FG

Alcalase® 2.4 L FG

Revision date: 09/22/2011



Effects May cause allergic respiratory reaction
Symptoms Shortness of breath, wheezing and coughing
 The effect of inhalation may be delayed
First Aid Remove person to fresh air. If signs/symptoms continue, get medical attention
 Show this safety data sheet to the doctor in attendance

Skin Contact

Effects May cause slight irritation.
Symptoms Slight irritation.
First Aid Remove and wash contaminated clothing before re-use. Wash off immediately with plenty of water. If symptoms persist, call a doctor. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.

Eye Contact

Effects May cause slight irritation.
Symptoms Slight irritation
First Aid Hold eye open and rinse slowly and gently with water for 15-20 min. Remove contact lenses, if present, after the first five minutes, then continue rinsing eye. If symptoms persist, call a doctor. Show this safety data sheet to the doctor in attendance

Ingestion

Effects Ingestion may cause gastrointestinal irritation, nausea, vomiting and diarrhea.
Symptoms Irritation
First Aid Rinse mouth with water and drink plenty of water. If symptoms persist, call a doctor. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.

5. FIRE-FIGHTING MEASURES

Flammable Properties	Slightly flammable according to HMIS criteria
Suitable Extinguishing Media	Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide
Unsuitable Extinguishing Media	None
Hazardous Combustion Products	None
Specific Hazards Arising from the Chemical	May cause allergic respiratory reaction
Protective Equipment and Precautions for Firefighters	Self-contained breathing apparatus and standard turn-out apparel

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Personal Precautions	For personal protection see section 8
Environmental Precautions	No special environmental precautions required
Methods for cleaning up	Avoid formation of dust and aerosols

Alcalase® 2.4 L FG

Revision date: 09/22/2011



Spilled preparation should be removed immediately to avoid formation of dust from dried preparation. Take up by mechanical means preferably by a vacuum cleaner equipped with a HEPA (High Efficiency Particulate Air) filter. Flush remainder carefully with plenty of water. Avoid splashing, high pressure washing or compressed air cleaning to avoid formation of aerosols. Ensure sufficient ventilation. Wash contaminated clothing.

For personal protection see section 8

7. HANDLING AND STORAGE

Handling	Avoid formation of dust and aerosols Ensure adequate ventilation Liquid enzyme preparations are dustfree preparations. However, inappropriate handling may cause formation of dust or aerosols.
Storage	Keep tightly closed in a dry and cool place. Temperature 0-10°C (32°F-50°F)

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

Chemical Name	ACGIH TLV
Protease (Subtilisin)	Ceiling: 0.00006 mg/m ³ Ceiling (as crystalline active enzyme, listed under Subtilisins)

Occupational exposure controls

Engineering Controls	Ensure adequate ventilation, especially in confined areas Maintain good conditions of industrial hygiene. Some processes may require enclosures, local exhaust ventilation, or other engineering controls to control airborne levels. Additional handling and healthy/safety information is available upon request
-----------------------------	---

Personal Protective Equipment

Respiratory Protection	In case of insufficient ventilation wear suitable respiratory equipment that meets HEPA/P100 specifications
Eye Protection	Safety glasses with side-shields
Skin Protection	Long sleeved clothing
Hand Protection	Protective gloves of e.g. nitrile rubber or neoprene (thickness > 0.3 mm) according to EN 374-3. Expected breakthrough time: > 4 hours. The recommendation is a qualified estimate based on the knowledge of the components in the mixture

General Hygiene Considerations Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practices

Environmental exposure controls Local authorities should be advised if significant spillages cannot be contained

Alcalase® 2.4 L FG

Revision date: 09/22/2011



9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Information on basic physical and chemical properties

Physical State	Liquid
Color	Brown
Odor	Slight fermentation odor
Density (g/ml)	1.17
pH	Not relevant
Solubility	Active component is readily soluble in application-relevant solutions at all levels of concentration, temperature and pH which may occur in normal usage

Other information No information available

10. STABILITY AND REACTIVITY

Reactivity	Not relevant
Chemical stability	Stable under recommended storage conditions
Possibility of Hazardous Reactions	None under normal processing
Conditions to Avoid	None
Incompatible materials	None
Hazardous Decomposition Products	None

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Information on toxicological effects

Chemical Name	Acute oral toxicity	Respiratory sensitization	Genetic toxicity	Skin corrosion/irritation	Serious eye damage/eye irritation
Protease (Subtilisin)	LD50: 1800 mg/kg bw (OECD TG 401)	Sensitizer (Human experience)	No indication of mutagenic effects (OECD TG 471, 473, 476)	Slightly irritating (OECD TG 404)	Slightly irritating (OECD TG 405)

Chemical Name	Acute inhalation toxicity	Specific target organ toxicity – single exposure
Protease (Subtilisin)	Exposure based waiving	Irritating, respiratory tract (ACGIH 2001)

12. ECOLOGICAL INFORMATION

Toxicity

Chemical Name	Daphnia, acute	Algae, acute	Fish, acute

Alcalase® 2.4 L FG

Revision date: 09/22/2011



Chemical Name	Daphnia, acute	Algae, acute	Fish, acute
Protease (Subtilisin)	EC50 (48 hours): 586 µg aep/l (OECD TG 202)	ErC50 (72 hours): 830 µg aep/l (OECD TG 201)	LC50 (96 hours): 8.2 mg aep/l (OECD TG 203)

Persistence/Degradability

Chemical Name	Persistence and degradability	Partition coefficient (n-octanol/water)	Bioaccumulative Potential
Protease (Subtilisin)	Readily biodegradable (OECD TG 301B)	LogPow: <0	Does not bioaccumulate

Mobility in soil Not relevant

Other adverse effects No information available

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Waste Disposal Method Dispose of in accordance with local regulations

Contaminated Packaging Dispose of wastes in an approved waste disposal facility

14. TRANSPORT INFORMATION**Transport Regulations**

No dangerous goods according to transport regulations
No special precautions required

Transport hazard class(es) not applicable

Packing group not applicable

Environmental hazards not applicable

15. REGULATORY INFORMATION

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes given by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemical Codex (FCC).

USA, Federal Regulations

TSCA Inventory The active ingredient and all components of the enzyme preparation are listed on the TSCA inventory

SARA 313

Section 313 of Title III of the Superfund Amendments and Reauthorization Act of 1986 (SARA). This product does not contain any chemicals which are subject to the reporting requirements of the Act and 40 CFR Part 372.

SARA 311/312 Hazardous Categorization

Acute Health Hazard	No
Chronic Health Hazard	No
Fire Hazard	No

www.novozymes.com

Page 6 / 7

Product Name
Alcalase 2.4 L FG

Ficha de Datos del Producto



1 de 2

Válido a partir del 2012-03-19

Neutrase® 1.5 MG

En este producto, la actividad enzimática clave es proporcionada por metalo endoproteasa que hidroliza enlaces peptídicos internos

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Enzima Declarada	proteasa (neutra)
Actividad declarada	1,5 AU-N/g
Color	Marrón claro
Forma física	Granulado
Propiedades	Fluido libre
<i>El color puede variar de lote a lote, sin que la intensidad del color sea indicativa de la actividad enzimática.</i>	

ESPECIFICACIÓN DEL PRODUCTO

	Límite Mínimo	Límite Máximo	Unidad
Proteolytic unit AU-N	1,5		/g
Cuenta Total en Placa	-	50000	/g
Bacteria coliforme	-	30	/g
E. coli	No detectado		/25 g
Salmonella	No detectado		/25 g
Metales pesados		Máx 30	mg/kg
Plomo		Máx 5	mg/kg
Arsénico		Máx 3	mg/kg
Cadmio		Máx 0.5	mg/kg
Mercurio		Máx 0.5	mg/kg

El método analítico de determinación enzimática está disponible en el Centro de atención al cliente o a través de nuestro representante comercial.

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Aprox. % (p/p)
Cloruro de sodio, CAS no. 7647-14-5	90
Proteasa (neutra), CAS no. 9080-56-2*	9
Agua, CAS no. 7732-18-5	1

*Definida como la conc. enzimática (base de materia seca)

INFORMACIÓN SOBRE ALÉRGENOS

Alérgeno	Sustancia contenida ¹	Alérgeno	Sustancia contenida ¹
Carne vacuna	no	Lactosa	no
Zanahoria	no	Leguminosas	no
Apio	no	Altramuz	no
Cereales con gluten ²	no	Leche	no
Carne de pollo	no	Moluscos	no
Cacao	no	Mostaza	no
Cilantro	no	Nueces ³	no
Choclo/maíz	no	Mani	no
Crustáceos	no	Carne porcina	no
Huevo	no	Sésamo	no
Pescado	no	Soja	no
Glutamato	no	Dióxido de sulfuro/sulfitos, más de 10 mg por kg o l	no

¹Definición de sustancias según la LeDa/ALBA y las Directivas EU 2000/13/EC y 2007/68/EC, en su forma enmendada

²es decir, trigo, centeno, cebada, avena, pieles, kamut

³es decir, almendra, avellana, nuez, anacardo, nuez pacana, nuez de Brasil, pistacho, macadamia y nuez de Queensland

VALORES NUTRICIONALES

El producto tiene un valor nutricional típico de aproximadamente 153 kJ/100 g enzimas.

• Proteína	9 g/100 g
• Ceniza	90 g/100 g
- Sodio	(35.10 g/100 g)
• Humedad	1 g/100 g

ORGANISMOS DE PRODUCCIÓN

Organismo de producción: *Bacillus amyloliquefaciens*

Producido mediante fermentación sumergida de un microorganismo. Se separa la proteína enzimática del organismo de producción y se purifica.

Neutrase® 1.5 MG

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Temperatura de almacenamiento: 0-25 °C (32-77 °F)

El embalaje debe mantenerse intacto, seco y lejos de la luz solar. Siga las recomendaciones y utilice el producto antes de la fecha de consumo preferente para evitar la necesidad de una dosis mayor.

Utilizar preferentemente antes de: Encontrará la fecha de consumo preferente en el certificado de análisis o en la etiqueta del producto.

El producto proporciona un rendimiento óptimo si se almacena según las recomendaciones y se utiliza dentro de los 24 meses siguientes a la fecha de producción.

Novozymes garantiza la entrega al menos 6 meses antes de la fecha de consumo preferente.

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD Y MANEJO

Las enzimas son proteínas. La inhalación de polvo o aerosoles puede inducir sensibilización y provocar reacciones alérgicas en personas sensibilizadas. Algunas enzimas pueden irritar la piel, ojos y membranas mucosas cuando el contacto es prolongado. Consulte el Manual de Seguridad o MSDS para obtener más información sobre la manipulación segura del producto y los derrames.

CUMPLIMIENTO DE NORMAS

El producto cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas de grado alimenticio dadas por la Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) y por Food Chemical Codex (FCC).

Los certificados Halal y Kosher están disponibles en el Centro de atención al cliente o por medio de su representante de ventas.

CERTIFICACIONES

Novozymes suscribe al Pacto Mundial de las Naciones Unidas y la Convención de las Naciones Unidas sobre la diversidad biológica y los informes sobre el rendimiento de la sostenibilidad a través de la iniciativa Global Reporting Initiative (GRI). Vea todos nuestros compromisos en www.novozymes.com.



SEGURIDAD ALIMENTARIA

Novozymes ha llevado a cabo un análisis de peligros y preparó un plan de análisis de riesgo y puntos críticos de control (en inglés HACCP) que describe los puntos de control fundamentales (en inglés, CCP). El plan de HACCP tiene el apoyo de un programa completo como requisito previo, implementado en las prácticas de buenas prácticas de fabricación (en inglés, GMP) de Novozymes.

El producto es elaborado según el plan de HACCP de Novozymes, las prácticas de GMP y los requisitos adicionales controlados por el sistema de gestión de calidad de Novozymes.

El producto cumple con los requisitos de pureza recomendados por el comité JECFA de la FAO/OMS y los requisitos de pureza recomendados por la FCC con respecto a las micotoxinas. El producto cumple con la legislación de la UE con respecto a los pesticidas.

El producto es producido bajo certificación FSSC 22000.



Novozymes Latin America Ltda.
Rua professor Francisco Ribero 683
CEP 83707-660 - Araucária - Paraná
Brazil

Tel. +55 41 641 1000
Fax +55 41 643 1443

Para más informaciones, o direcciones de nuestras oficinas, visite: www.novozymes.com

La legislación, las reglamentaciones y los derechos de terceros podrían impedir que los clientes importasen, utilizaran, procesasen o revendiesen los productos que se describen en el presente documento en determinadas formas. Sin otro contrato por escrito entre el cliente y Novozymes para ese efecto, este documento no constituye una declaración o garantía de ningún tipo y se encuentra sujeto a cambio sin previo aviso.



Suberase®

Valid From

2008-11-07

Características del producto:

Enzima Declarada	Lacasa
Actividad declarada	10500 PCU/ml
Color	Marrón El color puede variar de lote a lote, sin que la intensidad del color sea indicativa de la actividad enzimática.
Forma física	Líquido
Estabilizantes	D-Glucosa Ácido láctico Sorbitol
Conservadores	Sorbato de potasio Benzoato de sodio
Olor	Ligero olor a fermentación.
Solubilidad	El compuesto activo es fácilmente soluble en agua en todas las concentraciones de uso normal. Los compuestos de estandarización pueden causar turbidez en la solución.
Organismo de producción	Aspergillus oryzae
Método de producción	Producido mediante fermentación sumergida de un microorganismo genéticamente modificado. La proteína enzimática, la cual no está genéticamente modificada, se separa del organismo de producción y se purifica.

Especificación del producto:

	Límite Mínimo	Límite Máximo	Unidad
Laccase Units PCU	10500		/ml
Densidad aproximada (g/ml)	1,12		g/ml
Cuenta Total en Placa	-	50000	/g
Bacteria coliforme	-	30	/g
E.coli enteropatógeno	Ninguno detectado		/25 g
Salmonella	Ninguno detectado		/25 g

El producto cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas de grado alimenticio dadas por la Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) y por Food Chemical Codex (FCC).

Envases: Revise la lista de envases estándar para mayor información.

Almacenamiento recomendado:

Utilizar preferentemente antes de	Consumir antes de la fecha que aparece en la etiqueta o en el CoA según lo solicitado.
Temperatura de almacenamiento	0-25°C (32°F-77°F)
Condiciones de almacenamiento	En envase intacto, en lugar seco y protegido de la luz solar. El producto ha sido formulado para mantener una estabilidad óptima. Puede resultar necesario aumentar la dosificación si la enzima ha experimentado un almacenamiento prolongado o condiciones adversas, incluyendo temperatura o humedad alta.

Precauciones de seguridad y manejo

Las enzimas son proteínas. La inhalación de polvo o aerosoles puede provocar sensibilización y causar reacciones alérgicas en personas propensas. Tras un contacto prolongado, algunas enzimas pueden irritar la piel, los ojos y las mucosas. El producto puede crear aerosoles inhalables si se salpica o si se agita fuertemente. El producto derramado puede secarse y generar polvo. Cualquier material derramado debe lavarse con agua abundante. Deben evitarse las salpicaduras. El material sobrante puede secarse y generar polvo. Úsense ropa, guantes adecuados y protección para los ojos y la cara según las indicaciones en la etiqueta de advertencia. Lávese toda la ropa manchada o salpicada. Con todos los productos se suministra una ficha de seguridad. Revise el Manual de Seguridad para mayor información sobre el manejo seguro del producto.

**Application:**

Novozym 33095 is a new generation of a pectinase preparation for mashing of a variety of fruits such as apples, pears, peaches and grapes for juice production. Novozym 33095 is unique for treatments at elevated temperatures. Novozym 33095 may also be used for production of juices from other fruits.

Enzyme description:

Novozym 33095 contains a broad spectrum of pectolytic enzyme activities, optimised to break down the cell wall of fruits and thus providing excellent performance in fruit processing. Application in fruit treatments gives the following benefits:

Benefits:

- Fast mash and juice viscosity reduction
- Increased juice yield and production capacity
- Heat stable up to 60 °C, if desired
- Smooth down stream processing

Process conditions for fruit treatments:

Recommended parameters depend on fruit quality, variety, ripeness and process conditions.

Recommended dosages	50-250 ml/ton
---------------------	---------------

Recommended temperatures and pH range
The product is active from 15-60°C However, higher temperatures (60°) may have a negative influence on aroma quality. Temperatures of below 10 °C should be avoided
Optimum pH range from 3.5 - 4.2 The product is active in the pH range of 3.0-5.0

Recommended holding time
As enzymes require a reaction time, please allow for a holding time 30-120 min. Stirring can speed up the process.



The pectinase preparation is inactivated either during aroma recovery, fining steps or at the pasteurisation phase.
Further information on this product is available from the Novozymes customer center, www.mynovozymes.com

Usage

A diluted solution (if possible 10 % in tap water at ambient temperature) is dosed directly into the mill or the mash tank, preferable via metering pump.

Safety, handling and storage

Safety, handling and storage guidelines are provided with the product data sheet.

Novozymes Switzerland AG
Neumatt
4243 Dittingen
Switzerland

Tel. +41 61 7656111
Fax +41 61 7656333

For more information
and addresses of
international offices,
please see
www.novozymes.com
fruitjuice@novozymes.com

Laws, regulations, and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing, and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S - November 2007

Alimentos / 2002-21754-01.pdf

Ficha técnica

Página 1:3



Protamex™

Descripción

Protamex es un complejo de proteasa de *Bacillus* desarrollado para la hidrólisis de proteínas de alimentos.

Propiedades del producto

Tipo de producto

Protamex es un microgranulado color marrón claro, de libre fluido, exento de polvo con un tamaño de partícula medio de aproximadamente 250-450 micras. El color puede variar de un lote a otro y la intensidad del color no es una indicación de la actividad del producto. El producto es fácilmente soluble en agua.

Actividad

Protamex está estandarizado en *Anson Units* por gramo (AU/g).

Protamex Actividad declarada.....1.5 AU/g

Revise el método analítico para mayor información sobre el análisis proteolítico, el cual se basa en la proteólisis de la hemoglobina desnaturalizada.

Pureza

El producto cumple con las especificaciones de pureza recomendadas por la *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) y *Food Chemicals Codex* (FCC), relativas a enzimas de uso alimentario.

Envases

Revise la Lista de Envases estándar para mayor información.

Aplicación

En contraste con muchas otras endoproteasas, Protamex no produce hidrolizados de proteína amargos incluso a bajos grados de hidrólisis.

Parámetros de reacción

Las condiciones óptimas de trabajo son a pH 5.5-7.5 y a 35-60°C como se determinó en las pruebas de aplicación.

En la Figura 1 las actividades mostradas son medidas de acuerdo al método modificado Anson en soluciones acuosas sin el efecto estabilizante de la materia proteica. La estabilidad de Protamex a cierta temperatura es influenciada por el tipo y concentración de la proteína presente.

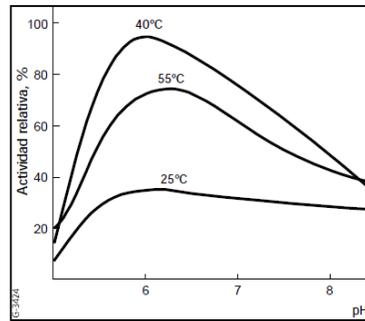


Fig. 1. Influencia del pH a varias temperaturas sobre la actividad de Protamex.

Método: AF 4
Sustrato: Hemoglobina desnaturalizada

Inactivación

Protamex puede inactivarse en 30 minutos a 50°C o superior cuando el pH es 4, y en 10 minutos a 85°C o superior cuando el pH es 8.

Sin embargo, la inactivación depende mucho del sustrato (concentración de sustrato, pH, etc.). Por lo que, la documentación para la eliminación eficiente de Protamex debe basarse en análisis actuales para la detección de actividad residual.

Revise el método para la detección de actividad residual de proteasa en proteína hidrolizada, para mayor información.

Seguridad

Las enzimas son proteínas, y la inhalación de polvo o aerosoles puede provocar sensibilización y causar reacciones alérgicas en personas propensas. Tras un contacto prolongado, las enzimas pueden irritar la piel, los ojos y las mucosas.

El producto está diseñado para resistir ciertos efectos mecánicos. Sin embargo, el uso y desgaste mecánicos excesivos y la trituración pueden generar polvo. Cualquier derrame, incluso pequeño, debe lavarse inmediatamente. Se deben utilizar medidas protectoras sobre el aparato respiratorio. Los grandes derrames deben introducirse cuidadosamente en recipientes revestidos de plástico con una pala. Los pequeños derrames y los restos procedentes de grandes derrames deben eliminarse mediante aspiración o lavado con agua (sin salpicar).

Las aspiradoras y sistemas centrales de aspiración deben estar provistos de filtros HEPA.

Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara según las indicaciones en la etiqueta de advertencia. Lávese toda la ropa manchada o salpicada.

Todos los productos se suministran con ficha de seguridad. Previa solicitud facilitamos información detallada sobre el manejo seguro del producto.

Almacenamiento

Se recomienda almacenar el producto a 0-25°C en envase intacto, en lugar seco y protegido de la luz solar. El producto ha sido formulado para mantener una estabilidad óptima. Sin embargo, las enzimas pierden gradualmente su actividad con el tiempo. Puede resultar necesario aumentar la dosificación si la enzima ha experimentado un almacenamiento prolongado o condiciones adversas, incluyendo temperatura o humedad alta.



Viscoflow® MG

Valid From

2007-08-17

Características del producto:

Enzima Declarada	Beta-glucanasa (endo-1,3(4)-)
Actividad declarada	500 BGU/g
Actividades colaterales	Este producto contiene actividad de Celulasa Alfa-amilasa Xilanasa
Color	Crema y marrón
Forma física	Granulado
Propiedades	De fluido libre, baja polvosidad
Transportadores	Cloruro de sodio
Solubilidad	Fácilmente soluble en las soluciones de aplicación relevantes en todos los niveles de concentración, temperatura y pH de uso normal.
Método de producción	Producido mediante fermentación sumergida de microorganismos. Se separa la proteína enzimática de los organismos de producción y se purifica.

Especificación del producto:

	Límite Mínimo	Límite Máximo	Unidad
Betaglucanase Units BGU	500		/g
Cuenta Total en Placa	-	50000	/g
Bacteria coliforme	-	30	/g
E.coli enteropatógeno	Ninguno detectado		/25 g
Salmonella	Ninguno detectado		/25 g

El producto cumple con las especificaciones de pureza recomendadas para enzimas de grado alimenticio dadas por la Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) y por Food Chemical Codex (FCC).

Envases:

Revise la lista de envases estándar para mayor información.

Almacenamiento recomendado:

Utilizar preferentemente antes de	Almacenado como es recomendado, el producto debe utilizarse dentro de 6 meses a partir de la fecha de entrega.
Temperatura de almacenamiento	0-10°C (32°F-50°F)
Condiciones de almacenamiento	En envase intacto, en lugar seco y protegido de la luz solar. El producto ha sido formulado para mantener una estabilidad óptima. Puede resultar necesario aumentar la dosificación si la enzima ha experimentado un almacenamiento prolongado o condiciones adversas, incluyendo temperatura o humedad alta.

Precauciones de seguridad y manejo

Las enzimas son proteínas. La inhalación de polvo o aerosoles puede provocar sensibilización y causar reacciones alérgicas en personas propensas. Tras un contacto prolongado algunas enzimas pueden irritar la piel, los ojos y las mucosas. El producto está diseñado para resistir algunos efectos mecánicos. Sin embargo, el uso y desgaste mecánicos excesivos y la trituración pueden generar polvo. Cualquier derrame, incluso pequeño, debe lavarse inmediatamente. Se debe utilizar protección sobre el aparato respiratorio. Los grandes derrames deben introducirse cuidadosamente en recipientes revestidos de plástico con una pala. Los pequeños derrames y los restos procedentes de grandes derrames deben eliminarse mediante aspiración o lavado con agua (sin salpicar). Las aspiradoras y sistemas centrales de aspiración deben estar provistos de filtros HEPA. Úsense ropa, guantes adecuados y protección para los ojos y la cara según las indicaciones en la etiqueta de advertencia. Lávese toda la ropa manchada o salpicada. Con todos los productos se suministra una ficha de seguridad. Revise el Manual de Seguridad para mayor información sobre el manejo seguro del producto.

2 / 2

Novozymes Latin America Ltda.
Rua professor Francisco Ribeiro 683
CEP 83707-660 - Araucária - Paraná
Brazil

Tel. +55 41 641 1000
Fax +55 41 643 1443

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark

Tel. +45 4446 0000
Fax +45 4446 9999

Para más informaciones, o direcciones de nuestras oficinas, visite:
www.novozymes.com

La legislación, las reglamentaciones y los derechos de terceros podrían impedir que los clientes importasen, utilizasen, procesasen o revendiesen los productos que se describen en el presente documento en determinadas formas. Sin otro contrato por escrito entre el cliente y Novozymes para ese efecto, este documento no constituye una declaración o garantía de ningún tipo y se encuentra sujeto a cambio sin previo aviso.

© Novozymes A/S

Bibliografía

- Acosta, C. 2012. Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel.
- Adebiyi, A.P., A.O. Adebiyi, T. Ogawa, and K. Muramoto. 2008. Purification and characterisation of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43(1): 35–43.
- Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymic Hydrolysis of food proteins*. Elsevier, London, U.K.
- Aehle, W. 2004. *Enzymes in industry. Production and Applications*. Second Edi. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.
- Ahmed, J., S.T. Prabhu, G.S.V. Raghavan, and M. Ngadi. 2007. Physico-chemical, rheological, calorimetric and dielectric behavior of selected Indian honey. *J. Food Eng.* 79(4): 1207–1213.
- Ahn, J., and V.M. Balasubramaniam. 2007. Physiological responses of *Bacillus amyloliquefaciens* spores to high pressure. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(3): 524–529.
- Ajibola, C., J. Fashakin, T. Fagbemi, and R. Aluko. 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 6685–6702.
- Al-Baali, A., and M. Farid. 2006. *Sterilization of food in retort pouches*. Springer, New York, NY, USA.
- Aličić, D., D. Šubarić, M. Jašić, H. Pašalić, and Đ. Ačkar. 2014. Antioxidant properties of pollen. *Hrana u Zdr. i Boles. Znan. časopis za Nutr. i dijetetiku* 3(1): 6–12.
- Almaraz-Abarca, N., M. Campos, J. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, and J. Corral. 2007. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). *J. Food Compos. Anal.* 20(2): 119–124.
- Almaraz-Abarca, N., M. Campos, J. Ávila-Reyes, N. Naranjo-Jiménez, J. Herrera-Corral, and L. González-Valdez. 2004. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29(10): 1–12.
- Almeida-Muradian, L., L. Pamplona, S. Coimbra, and O. Barth. 2005. Chemical

- composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J. Food Compos. Anal.* 18(1): 105–111.
- Alvarez-Suarez, J.M., S. Tulipani, S. Romandini, A. Vidal, and M. Battino. 2009. Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Curr. Anal. Chem.* 5: 293–302.
- Andelkovic, B., G. Jevtic, M. Mladenovic, J. Markovic, M. Petrovic, and N. Nedic. 2012. Quality of pollen and honey bee bread collected in spring. *J. Hyg. Eng. Des.* 1: 275–277.
- Anderssen, M., and P. Kiel. 1997. *Cereals: Novel Uses and Processes* (G Campbell, C Webb, and S McKee, Eds.). Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Association Official Analytical Chemists.
- Argentina. 1990. Código Alimentario Argentino. Capitulo X. Art. 785. Polen. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.
- Arrieta-Baez, D., L. Dorantes-Alvarez, R. Martínez-Torres, G. Zepeda-Vallejo, M. Jaramillo-Florez, A. Ortiz-Moreno, and G. Aparicio-Ozores. 2012. Effect of thermal sterilization on ferulic, coumaric and cinnamic acids: dimerization and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 92(13): 2715–2720.
- de Arruda, V.A.S., A.A.S. Pereira, A.S. de Freitas, O.M. Barth, and L.B. de Almeida-Muradian. 2013. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *J. Food Compos. Anal.* 29(2): 100–105.
- Arruda, V.A.S. de, A.A.S. Pereira, M.L.M.F. Estevinho, and L.B. de Almeida-Muradian. 2013. Presence and stability of B complex vitamins in bee pollen using different storage conditions. *Food Chem. Toxicol.* 51: 143–148.
- Atkin, S., S. Barrier, Z. Cui, P. Fletcher, G. Mackenzie, V. Panel, V. Sol, and X. Zhang. 2011. UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 102: 209–217.
- Balkanska, R., and M. Ignatova. 2012. Chemical composition of multifloral bee pollen from Bulgaria. p. 375–378. *In* 6th Central European Congress on Food. Novi Sad, Serbia.
- Ballabio, D. 2015. A MATLAB toolbox for Principal Component Analysis and unsupervised exploration of data structure. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 149: 1–9.
- Balny, C., P. Masson, and K. Heremans. 2002. High pressure effects on biological

- macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1595(1-2): 3–10.
- Balny, C., V. Mozhaev, and R. Lange. 1997. Hydrostatic pressure and proteins: basic concepts and new data. *Comp. Biochem. Physiol.* 116A(4): 299–304.
- Baltrusaityte, V., P. Venskutonis, and V. Ceksteryte. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chem.* 101(2): 502–514.
- Baptist, J., M. Mandel, and R. Gherna. 1978. Comparative zone electrophoresis of enzymes in the genus *Bacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28: 229–244.
- Barajas, J., M. Cortes-Rodriguez, and E. Rodríguez-Sandoval. 2012. Effect of Temperature on the Drying Process of Bee Pollen From Two Zones of Colombia. *J. Food Process Eng.* 35(1): 134–148.
- Barba, F., M. Esteve, and A. Frigola. 2010. Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *J. Agric. Food Chem.* 58(18): 10070–10075.
- Barbosa-Cánovas, G., A. Fontana Jr., S. Schmidt, and T. Labunza. 2007. *Water activity in foods*. Blackwell Publishing, Iowa, USA.
- Barrier, S., A. Lobbert, A. Boasman, A. Boa, M. Lorch, S. Atkin, and G. Mackenzie. 2010. Access to a primary aminosporepollenin solid support from plant spores. *Green Chem.* 12: 234–240.
- Bartkiene, E., G. Juodeikiene, D. Vidmantiene, P. Viskelis, and D. Urbonaviciene. 2011. Nutritional and quality aspects of wheat sourdough bread using *L. luteus* and *L. angustifolius* flours fermented by *Pediococcus acidilactici*. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46(1724-1733).
- Basuny, A., S. Arafat, and H. Soliman. 2013. Chemical analysis of olive and palm pollen: Antioxidant and antimicrobial activation properties. *Wudpecker J. Food Technol.* 1(2): 14–21.
- Bayındırlı, A., H. Alpas, F. Bozoğlu, and M. Hızal. 2006. Efficiency of high pressure treatment on inactivation of pathogenic microorganisms and enzymes in apple, orange, apricot and sour cherry juices. *Food Control* 17(1): 52–58.
- Belhadj, H., D. Harzallah, D. Bouamra, F. Khenouf, S. Dahamna, and M. Ghadbane. 2014. Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen: A Preliminary Study. *Biosci. Microbiota, Food Heal.* 33(1): 11–23.

- Belhadj, H., D. Harzallah, F. Khenouf, S. Dahamna, S. Bouharati, and A. Baghiani. 2010. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from Algerian honeybee collected pollen. *Acta Hort.* 854: 51–58.
- Bell, R., E. Thorner, J. Seet, M. Groves, N. Ho, and D. Bell. 1983. Composition and protein quality of honey bee collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucalyptus calophylla*. *J. Nutr.* 113(12): 2479–2484.
- Bennett, P., and S.-T. Yang. 2012. Beneficial effect of protracted sterilization of lentils on phytase production by *Aspergillus ficuum* in solid state fermentation. *Biotechnol. Prog.* 28(5): 1263–1270.
- Benzie, F., and J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* 239(1): 70–76.
- Bereton, R. 2007. *Applied Chemometrics for Scientists*. John Wiley & Sons, USA.
- Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company.
- Bertoncelj, J., U. Dobersek, M. Jamnik, and T. Golob. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.* 105(2): 822–828.
- Black, E., T. Huppertz, G. Fitzgerald, and A. Kelly. 2007. Baroprotection of vegetative bacteria by milk constituents: A study of *Listeria innocua*. *Int. Dairy J.* 17: 104–110.
- Blackburn, C., and P. McClure. 2000. *Foodborne pathogens. Hazards, risk analysis and control*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Blackmore, S., A. Wortley, J. Skvarla, and J. Rowley. 2007. Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* 174(3): 483–498.
- Block, G., R. Sinh, and G. Gridley. 1994. Collection of dietary-supplement data and implication for analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 59(Supp. 1): S234–S239.
- van Boekel, M., V. Fogliano, N. Pellegrini, C. Stanton, G. Scholz, S. Lalljie, V. Somoza, D. Knorr, P.R. Jasti, and G. Eisenbrand. 2010. A review on the beneficial aspects of food processing. *Mol. Nutr. Food Res.* 54(9): 1215–1247.
- Bogdanov, S. 2004. Quality standards of bee pollen and beeswax. *Apiacta* 39: 334–341.
- Bogdanov, S. 2011. *The Bee Pollen Book*. Bee Product Science.
- Bonvehí, J., J. Galindo, and A. Pajuelo. 1986. Estudio de la composición y características físico-químicas del polen de abejas. *Alimentaria* 176: 63–67.

- Bourdichon, F., S. Casaregola, C. Farrokh, J. Frisvad, M. Gerds, W. Hammes, J. Harnett, G. Huys, S. Laulund, A. Ouwehand, I. Powell, J. Prajapati, Y. Seto, E. Ter Schure, A. Van Boven, V. Vankerckhoven, A. Zgoda, S. Tuijelaars, and E. Hansen. 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *J. Food Microbiol.* 154: 87–97.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Brasil. 2001. Instrucao Normativa n. 3 de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade, de Apitoxina, de Cera de Abelha, de Geléia Real, de Geléia Real Liofilizada, de Pólen Apícola, de Própolis, de Extrato de Própolis. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Briones-Labarca, V., G. Venegas-Cubillos, S. Ortiz-Portilla, M. Chacana-Ojeda, and H. Maureira. 2011. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chem.* 128: 520–529.
- Van den Broeck, I., L. Ludikhuyze, C. Weemaes, A. Van Loey, and M. Hendrickx. 1998. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2001–2006.
- Broekmans, W.M., I. a Klöpping-Ketelaars, C.R. Schuurman, H. Verhagen, H. van den Berg, F.J. Kok, and G. van Poppel. 2000. Fruits and vegetables increase plasma carotenoids and vitamins and decrease homocysteine in humans. *J. Nutr.* 130(6): 1578–1583.
- Brown, M.J.F.F., and R.J. Paxton. 2009. The conservation of bees : a global perspective. *Apidologie* 40: 410–416.
- Buckenhüskes, H. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 253–272.
- Buckenhüskes, H. 1997. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (P Doyle, L Beuchat, and T Montville, Eds.). ASM Press, Washington D.C., USA.
- Van Buggenhout, S., I. Messagie, A. Van Loey, and M. Hendrickx. 2005. Influence of low-temperature blanching combined with high-pressure shift freezing on the texture of frozen carrots. *J. Food Sci.* 70(4): S304–S308.
- Buitink, J., C. Walters-Vertucci, F. Hoekstra, and O. Leprince. 1996. Calorimetric Properties of Dehydrating Pollen. *Plant Physiol.* 111: 235–242.
- Butré, C.I., P. a Wierenga, and H. Gruppen. 2014. Influence of water availability on the

- enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochem.* 49(11): 1903–1912.
- Butz, P., R. Edenharder, A. Fernandez-Garcia, H. Fister, C. Merkel, and B. Tauscher. 2002a. Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Res. Int.* 35(2/3): 295–300.
- Butz, P., R. Edenharder, A. Garcia, H. Fister, C. Merkel, and B. Tauscher. 2002b. Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Res. Int.* 35: 295–300.
- Butz, P., A. Fernandez-Garcia, R. Lindauer, S. Dieterich, A. Bognar, and B. Tauscher. 2003. Influence of ultra high pressure processing on fruit and vegetable products. *J. Food Eng.* 56: 233–236.
- Butz, P., Y. Serfert, A. Fernandez-Garcia, S. Dieterich, R. Lindauer, and A. Bognar. 2004. Influence of high-pressure treatment at 25°C and 80°C on folates in orange juice and model media. *J. Food Sci.* 69(3): 117–121.
- Bylund, G. 1995. *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak Processing Systems, Sweden.
- Cai, M., R. Gu, C. Li, Y. Ma, Z. Dong, W. Liu, Z. Jin, J. Lu, and W. Yi. 2012. Pilot-scale production of soybean oligopeptides and antioxidant and antihypertensive effects in vitro and in vivo. *J. Food Sci. Technol.*
- Callejas, M. 2006. Desarrollo de la norma técnica para polen en Honduras.
- Campos, M., S. Bogdanov, L. Almeida-Muradian, T. Szczesna, Y. Mancebo, C. Frigerio, and F. Ferreira. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apic. Res. Bee World* 47(2): 156–163.
- Campos, M., C. Frigerio, J. Lopes, and S. Bogdanov. 2010. What is the future of Bee-Pollen? *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* 2(4): 131–144.
- Campos, M., R. Webby, K. Markham, K. Mitchall, and A. Da Cunha. 2003. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 51(3): 742–745.
- Canobbio, S., V. Mezzanotte, B. Ballabio, and M. Pavan. 2008. A Tool for Assessing River Ecosystem Health Using Functional Macroinvertebrate Traits. p. 169. *In* Pavan, M., Todeschini, R. (eds.), *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Caplice, E., and G. Fitzgerald. 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1-2): 131–149.
- Carpes, S., R. Begnini, S. Alencar, and M. Masson. 2007. Study of preparations of bee

- pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia* 31(6): 1818–1825.
- Carpes, S., G. Mourao, S. Alencar, and M. Masson. 2009. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian J. Food Technol.* 12(3): 220–229.
- Carr, F., D. Chill, and N. Maida. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281–370.
- Castro, A., J. Rejon, M. Fendri, M. Jimenez-Quesada, A. Zafra, M. Jimenez-Lopez, M. Rodriguez-Garcia, and J. Alche. 2010. Taxonomical discrimination of pollen grains by using confocal laser scanning microscopy (CLSM) imaging of autofluorescence. *Microsc. Sci. Technol. Educ.* 1(4): 607–613.
- Čeksterytė, V., J. Račys, V. Kaškonienė, and P. Venskutonis. 2008. Fatty acid composition in beebread. *Biologija* 54(4): 253–257.
- CFR. 2012. Title 21: Food and drugs. FDA. Available at <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=120.24>.
- Chang, S., and H. Hassan. 1997. Characterization of superoxide dismutase in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9): 3732–3735.
- Chen, X., and A. Mujumdar. 2008. *Drying Technologies in Food Processing*. Blackwell Publishing Ltd, Singapur.
- Chen, H., K. Muramoto, F. Yamauchi, and K. Nokihara. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative properties isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2619–2623.
- Chen, X., and K. Patel. 2006. Micro-organism inactivation during drying of small droplets or thin-layer slabs - A critical review of existing kinetics models and an appraisal of the drying rate dependent model. *J. Food Eng.* 82: 1–10.
- Ching, T., and K. Ching. 1962. Fatty Acids in Pollen of Some Coniferous Species. *Science* (80-). 138(3543): 890–891.
- Choi, Y., S. Lee, J. Lee, and B. Chun. 2006. Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chem.* 99(2): 381–387.
- Chun, O., D. Kim, N. Smith, D. Schroeder, J. Han, and C. Lee. 2005. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J. Sci. Food Agric.* 85(10): 1715–1724.

- Coda, R., C. Rizzello, D. Pinto, and M. Gobbetti. 2012. Selected lactic acid bacteria synthesize antioxidant peptides during Sourdough fermentation of cereal flours. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(4): 1087–1096.
- Conabio. 2015. *Hypochaeris radicata* L. Available at <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/hypochaeris-radicata/fichas/ficha.htm> (verified 14 October 2015).
- Cook, S., C. Awmack, D. Murray, and I. Williams. 2003. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecol. Entomol.* 28(5): 622–627.
- Costanza, R., R. D'Arge, R. de Groot, S. Farber, M. Grasso, B. Hannon, K. Limburg, S. Naeem, R. O'Neill, J. Paruelo, R. Raskin, P. Sutton, and M. van der Belt. 1997. The value of the World's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387: 253–259.
- CPAA. 2011. Plan estratégico de acción 2011-2025. Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura, Bogotá, Colombia.
- Cruz, N., M. Capellas, M. Hernández, a. J. Trujillo, B. Guamis, and V. Ferragut. 2007. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. *Food Res. Int.* 40(6): 725–732.
- Czerucka, D., T. Piche, and P. Rampal. 2007. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26(6): 767–778.
- Dede, S., H. Alpas, and A. Bayındırlı. 2007. High hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: Antioxidant activity and microbial safety. *J. Sci. Food Agric.* 87(5): 773–782.
- De-Melo, A.A.M., M.L.M.F. Estevinho, J.A.G. Sattler, B.R. Souza, A.D.S. Freitas, O.M. Barth, and L.B. Almeida-Muradian. 2016. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT - Food Sci. Technol.* 65: 808–815.
- Deveza, M.V., K.M. Keller, M. Cristina, A. Lorenzon, L. Maria, T. Nunes, É.O. Sales, and O.M. Barth. 2015. Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen. (2008).
- Dewanto, V., X. Wu, K.K. Adom, and R.H. Liu. 2002. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3010–3014.
- Diaz, C., C. Zuluaga, C. Morales, and M. Quicazán. 2012. Determinación de fibra dietaria

- en polen apícola colombiano. *Vitae* 19(S1): S454–S456.
- Dijk, A.A., B. Folkertsma, and P.J. Dekker. 2007. Carboxypeptidase for cheese ripening. Available at <https://www.google.com/patents/US20070160711>.
- Doblado, R., J. Frias, and C. Vidal-Valverde. 2007. Changes in vitamin C content and antioxidant activity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinensis* var. *carilla*) seed induced by high pressure treatment. *Food Chem.* 101: 918–923.
- Domínguez-Valhondo, D., D. Bohoyo Gil, M.T. Hernández, and D. González-Gómez. 2011. Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *Int. J. Food Sci. Technol.* 46(10): 2204–2211.
- Dong, J., K. Gao, K. Wang, X. Xu, and H. Zhang. 2015. Cell Wall Disruption of Rape Bee Pollen Treated with Combination of Protamex Hydrolysis and Ultrasonication. *Food Res. Int.* 75: 123–130.
- Doores, S., Y. Salfinger, and M. Tortorello. 2013. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington D.C., USA.
- Đorđević, T.M., and R.D. Đurović-Pejčev. 2015. Dissipation of chlorpyrifos-methyl by *Saccharomyces cerevisiae* during wheat fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* 61(2): 516–523.
- Dordevic, T., S. Siler-Marinkovic, and S. Dimitrijevic-Brankovic. 2010. Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food Chem.* 119(3): 957–963.
- Dryáková, A., A. Pihlanto, P. Marnila, L. Čurda, and H.J.T. Korhonen. 2010. Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *Eur. Food Res. Technol.* 230(6): 865–874.
- Dudek, S., C. Horstmann, and K. Schwenke. 1996. Limited tryptic hydrolysis of legumin from faba bean (*Vicia faba* L.) formation of an “unequal” subunit pattern. *Nahrung* 40: 171–176.
- Dueñas, M., D. Fernandez, T. Hernandez, I. Estrella, and R. Muñoz. 2005. Bioactive phenolic compounds of cowpeas (*Vigna sinensis* L.). Modifications by fermentation with natural microflora and with *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J. Sci. Food Agric.* 85(2): 297–304.
- Durán, A. 2014. Diseño de un sistema de secado y separación de impurezas para polen apícola en Colombia.

- Durán, A., C. Zuluaga, and M. Quicazán. 2014. Rectificación de las prácticas de cosecha y deshidratación en el beneficio del polen apícola en Colombia. p. ISSN: 2390–0148. *In* Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Dutta, K., S. Sen, and V. Veeranki. 2009. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochem.* 44(127-134).
- Erel, O. 2004. Novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37: 277–285.
- Estevinho, L.M., X. Feás, J. a Seijas, and M. Pilar Vázquez-Tato. 2012a. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food Chem. Toxicol.* 50(2): 258–64.
- Estevinho, L.M., S. Rodrigues, A.P. Pereira, and X. Feás. 2012b. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47(2): 429–435.
- FAOSTAT. 2014. Production quantities by country. Honey, natural. Food Agric. Organ. Available at <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QL/E> (verified 1 October 2014).
- Feás, X., M. Vázquez, L. Estevinho, J. Seijas, and A. Iglesias. 2012. Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. *Molecules* 17: 8359–8377.
- Feeherry, F.E., D.T. Munsey, and D.B. Rowley. 1987. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(2): 365–370.
- Feng, H., S. Jiao, Y. Tang, P. Tang, J. Liu, and X. Zhao. 2011. The broken-wall crafts for rape bee-pollen using yeast fermentation. *Food Sci. Technol.* ISSN: 1005.
- Fernández, M., and M. Zúñiga. 2006. Amino Acid Catabolic Pathways of Lactic Acid Bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 32(3): 155–183.
- Fernandez-Garcia, A., P. Butz, A. Bognar, and B. Tauscher. 2001. Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *Eur. Food Res. Technol.* 213: 290–296.
- Fernández-García, E., I. Carvajal-Lérida, M. Jarén-Galán, J. Garrido-Fernández, A. Pérez-Gálvez, and D. Hornero-Méndez. 2012. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Funct. Foods Nutraceuticals* 46(2): 438–450.

- Franchi, G., G. Corti, and A. Pompella. 1997. Microspectroscopic evaluation of digestibility of pollen grains. *Plant Foods Hum. Nutr.* 50(2): 115–126.
- Fuchigami, M., N. Kato, and A. Teramoto. 1997. High pressure freezing effects on textural quality of carrots. *J. Food Sci.* 62(4): 804–808.
- Fuenmayor, C. 2009. Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional protéico. Universidad Nacional de Colombia.
- Fuenmayor, C., C. Zuluaga, C. Diaz, M. Quicazán, M.S. Cosio, and S. Mannino. 2014. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Rev. MVZ Córdoba* 19(1): 4003–4014.
- Gabbott, P. 2008. *Principles and Applications of Thermal Analysis*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, U.K.
- Gabriele, M., E. Parri, A. Felicioli, S. Sagona, L. Pozzo, C. Biondi, V. Domenici, and L. Pucci. 2015. Phytochemical composition and antioxidant activity of Tuscan bee-pollen of different botanical origins. *Ital. J. Food Sci.* 27: 248–259.
- Gallai, N., J.M. Salles, J. Settele, and B.E. Vaissière. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68(3): 810–821.
- Galvagno, M.A., and P. Cerrutti. 2004. Aumento de la actividad panificante de levaduras comerciales por aplicación de condiciones de estrés durante su propagación. *Rev. Argent. Microbiol.* 36: 41–46.
- Gao, K., H. Zhang, and J. Dong. 2011. Protamex hydrolysis and cell wall of rape bee-pollen. *Food Sci.* 32(20): 99–103.
- Gasson, M., and W. de Vos. 2004. *Genetics and Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*. Springer, Berlin, Germany.
- GAUN. 2003. Polen: un mega-alimento. Grupo Apícola Universidad Nacional: 6 pp.
- GBX. 2012. Fast-Lab water activity meter. Available at http://www.gbxonline.com/Eng_AW.html (verified 25 June 2012).
- Georget, E., R. Sevenich, K. Reineke, A. Mathys, V. Heinz, and M. Callanan. 2015. Inactivation of microorganism by high pressure processing in complex matrices: a review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 27(1-14).
- Gilliam, M. 1979a. Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. *Apidologie* 10(3): 269–274.
- Gilliam, M. 1979b. Microbiology of pollen and bee bread: The yeasts. *Apidologie* 10(1):

43–53.

- González, G., M.J. Hinojo, R. Mateo, a Medina, and M. Jiménez. 2005. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. Food Microbiol.* 105(1): 1–9.
- Gonzalez-Martin, I., J. Hernandez-Hierro, N. Barros-Ferreiro, C. Cordon, and R. Garcia-Villanova. 2007. Use of NIRS technology with a remote reflectance fibre-optic probe for predicting major components in bee pollen. *Talanta* 72: 998–1003.
- Gonzalez-Tello, P., F. Camacho, E. Jurado, M. Paez, and E. Guadix. 1994. Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins: I. Kinetic models. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 523–528.
- Green, D., and R. Perry. 2008. *Chemical Engineers Handbook*. 8th Editio. Taylor & Francis, New York, NY, USA.
- Guan, X., H. Yao, Z. Chen, L. Shan, and M. Zhang. 2007. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chem.* 101: 163–170.
- Hani, B., B. Dalila, D. Saliha, H. Daoud, G. Mouloud, and K. Seddik. 2012. Microbiological Sanitary Aspects of Pollen. *Adv. Environ. Biol.* 6(4): 1415–1420.
- Harrington, E. 1965. The desirability function. *Ind. Qual. Control* 21: 494–498.
- He, R., A. Girgih, S. Malomo, X. Ju, and R. Aluko. 2013. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *J. Funct. Foods* 5: 219–227.
- He, R., X. Ju, J. Yuan, L. Wang, A. Girgih, and R. Aluko. 2012. Antioxidant activities of rapeseed peptides produced by solid state fermentation. *Food Res. Int.* 49(1): 432–438.
- Heldman, D., and B. Lund. 2007. *Handbook of Food Engineering*. Second Edi. Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- Hemsley, A., P. Barrie, W. Chaloner, and A. Scott. 1993. The Composition of Sporopollenin and its use in Living and Fossil Plant Systematics. *Grana* 32(S1): 2–11.
- Hendrickx, M.E., and D. Knorr. 2001. *Ultra High Pressure Treatments of Foods*. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Herbert, E., and H. Shimanuki. 1978. Chemical composition and nutritive value of bee collected and bee stored pollen. *Apidologie* 9(1): 33–40.
- Hernández-Carrión, M., L.M. Guardado, J.M. Carot, I. Pérez-Munuera, A. Quiles, and I. Hernando. 2011. Structural stability of white sauces prepared with different types of fats and thawed in a microwave oven. *J. Food Eng.* 104(4): 557–564.

- Hernández-Carrión, M., J.L. Vázquez-Gutiérrez, I. Hernando, and A. Quiles. 2014. Impact of high hydrostatic pressure and pasteurization on the structure and the extractability of bioactive compounds of persimmon "Rojo Brillante." *J. Food Sci.* 79(1): C32–C38.
- Hervatin, H. 2009. Avaliação microbiológica e físico-química do pólen apícola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas.
- Higuchi, T. 1985. Biosynthesis of lignin. p. 141–160. *In* Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Academic Press.
- Holdsworth, D., and R. Simpson. 2007. Thermal processing of packaged foods. Second Edi. Springer, New York, NY, USA.
- Holguín, M., B. Rubio, M. Vargas, A. Muñoz, and G. Diaz. 1998. Manual de técnicas de análisis para el control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA, Bogotá, Colombia.
- Hoover, D., C. Metrick, A. Papineau, D. Farkas, and D. Knorr. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* 43(3): 99–107.
- Hrcková, M., M. Rusnáková, and J. Zemanovic. 2002. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech J. Food Sci.* 20: 7–14.
- Huang, W., K. Majumder, and J. Wu. 2010. Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chem.* 123: 635–641.
- Hubert, J., M. Berger, F. Nepveu, F. Paul, and J. Dayde. 2008. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. *Food Chem.* 109(4): 709–721.
- Hui, Y. 2006. Handbook of Food Science, Technology and Engineering. First Edit. Taylor & Francis, Boca Raton, USA.
- Human, H., and S. Nicolson. 2006. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe geaeheadii* va. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 67: 1486–1492.
- ICEX. 2013. El mercado de la alimentación en Colombia. Oficina Económica y Comercial de la Embajada de España en Bogotá, Bogotá, Colombia.
- ICONTEC. 1994. NTC 719.-Alimento para animales. Determinación de la digestibilidad con pepsina de la proteína de origen animal. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, Bogotá, Colombia.

- ICTA. 2007. Estrategías para establecer la Denominación de Origen de Productos de las abejas en Colombia. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia.
- ICTA. 2010. Programa estratégico en alternativas para la generación de valor en productos apícolas en Colombia a través de la innovación y el desarrollo tecnológico. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia.
- Indrawati, O., C. Arroqui, I. Messagie, M. Nguyen, A. Van Loey, and M.E. Hendrickx. 2004a. Comparative study on pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products. *J. Agric. Food Chem.* 52: 485–492.
- Indrawati, O., A. Van Loey, D. Fachin, B. Nguyen, I. Verlent, and M. Hendrickx. 2002. Overview: effect of high pressure on enzymes related to food quality. *High Press. Res.* 22: 613–618.
- Indrawati, O., A. Van Loey, and M. Hendrickx. 2004b. Pressure and temperature stability of water soluble antioxidants in orange and carrot juice: a kinetic study. *Eur. J. Food Res. Technol.* 219: 161–166.
- Indrawati, O., A. Van Loey, and M. Hendrickx. 2005. Pressure and temperature stability of 5-methyltetrafoliac acid: a kinetic study. *J. Agric. Food Chem.* 53(8): 3081–3087.
- Isidorov, V. a., a. G. Isidorova, L. Szczepaniak, and U. Czyzewska. 2009. Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread. *Food Chem.* 115(3): 1056–1063.
- Jay, J. 2000. *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, USA.
- Jazwiak, K., J. Rozmierska, B. Chablowska, K. Stecka, S. Skapska, M. Kliszcz, and E. Rzeszowiak. 2013. Starter cultures for lactic acid fermentation of sweet pepper, patty-pan squash and tomatoes. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 63(2): 95–102.
- Jian, S., T. Wenyi, and C. Wuyong. 2011. Kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. *J. Clean. Prod.* 19(4): 325–331.
- Jodayree, S., J.C. Smith, and A. Tsopmo. 2012. Use of carbohydrase to enhance protein extraction efficiency and antioxidative properties of oat bran protein hydrolysates. *Food Res. Int.* 46(1): 69–75.
- Johnson, M., A. Lucius, T. Meyer, and E. Mejia. 2011. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and in vitro inhibition of α -amilase and α -glucosidase of highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). *J. Agric. Food Chem.* 59(16): 8923–8930.

- Juan, M., and C. Chou. 2010. Enhancement of antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of black soybeans by solid state fermentation with *Bacillus subtilis* BCTC 14715. *Food Microbiol.* 27(5): 586–591.
- Juliano, P., K. Knoerzer, P.J. Fryer, and C. Versteeg. 2009. *C. botulinum* inactivation kinetics implemented in a computational model of a high-pressure sterilization process. *Biotechnol. Prog.* 25(1): 163–175.
- Jung, L., S. Lee, S. Kim, and J. Ahn. 2013. Effect of high hydrostatic pressure on the quality-related properties of carrot and spinach. *Food Sci. Biotechnol.* 22(1): 189–195.
- Jung, S., P. Murphy, and L. Johnson. 2005. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *J. Food Sci.* 70: c180–c186.
- Kacaniova, M., S. Pavlicova, P. Hascik, G. Kociubinski, V. Knazovicka, M. Sudzina, J. Sudzinová, and M. Fikselová. 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56(3): 285–295.
- Kafsi, H. El, J. Binesse, V. Loux, J. Buratti, S. Boudebouze, R. Dervyn, S. Kennedy, N. Galleron, B. Quinquis, J. Batto, B. Moumen, E. Maguin, and M. van de Guchte. 2014. *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* and *ssp. bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. *BMC Genomics* 15: 407–418.
- Kamizake, N.K., M.M. Gonçalves, C.T.B. Zaia, and D.A. Zaia. 2003. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and spectrophotometric methods. *J. Food Compos. Anal.* 16(4): 507–516.
- Kaškonienė, V., G. Ruočkusienė, P. Kaškonas, I. Akuneca, and A. Maruška. 2014. Chemometric Analysis of Bee Pollen Based on Volatile and Phenolic Compound Compositions and Antioxidant Properties. *Food Anal. Methods* 8(5): 1150–1163.
- Katina, K., A. Laitila, R. Juvonen, K. Liukkonen, S. Kariluoto, and V. Piironen. 2007. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiol.* 24(2): 175–186.
- Kato, M., J. Fuchimoto, T. Tanino, A. Kondo, H. Fukuda, and M. Ueda. 2007. Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75(3): 549–555.
- Katz, E., and A. Demain. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.* 41: 449–474.
- Kawai, S., T. Umezawa, M. Shimada, and T. Higuchi. 1988. Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus*

- versicolor. *FEBS Lett.* 236(2): 309–311.
- Ketkar, S., A. Rathore, S. Lohidasan, L. Rao, A. Paradkar, and K. Mahadik. 2014. Investigation of the nutraceutical potential of monofloral Indian mustard bee pollen. *J. Integr. Med.* 12(4): 379–389.
- Kim, H., H. Chae, S. Jeong, J. Ham, S. Im, and C. Ahn. 2005. Antioxidant activity of some yogurt starter cultures. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 18(2): 255–258.
- Kleerebezem, M., and J. Hugenholtz. 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 232–237.
- Knoerzer, K., P. Juliano, S. Gladman, C. Versteeg, and P.J. Fryer. 2007. A computational model for temperature and sterility distributions in a pilot-scale high-pressure high-temperature process. *AIChE J.* 53: 2996–3010.
- Knorr, D. 2001. High pressure processing for preservation, modification and transformation of foods. *In* European High Pressure Research Group Meeting. Santander, Spain.
- Kogan, G., A. Stasko, K. Baurerova, M. Polovka, L. Soltes, V. Brezova, J. Navarova, and D. Mihalova. 2005. Antioxidant properties of yeast (1→3)-β--glucan studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy and its activity in the adjuvant arthritis. *Carbohydr. Polym.* 61(1): 18–28.
- Kong, X., H. Zhou, and H. Qian. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem.* 101(2): 615–620.
- Koo, S.H., I.Y. Bae, S. Lee, D.H. Lee, B.S. Hur, and H.G. Lee. 2014. Evaluation of wheat gluten hydrolysates as taste-active compounds with antioxidant activity. *J. Food Sci. Technol.* 51(3): 535–542.
- Kosalec, I., J. Cvek, and S. Tomic. 2009. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 60: 485–501.
- Kovacik, L., J. Plitzko, M. Grote, and R. Reichelt. 2009. Electron tomography of structures in the wall of hazel pollen grains. *J. Struct. Biol.* 166(3): 263–271.
- Kroyer, G., and H. Hegedus. 2001. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2: 171–174.
- Kullisar, T., M. Zilmer, M. Mikelsaar, T. Vihalemm, H. Annuk, and C. Kairane. 2002. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 72(3): 215–224.
- Kunji, E.S., I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman, and W. Konings. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70(2-4): 187–221.

- Kunugi, S., and N. Tanaka. 2002. Cold denaturation of proteins under high pressure. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1595(1-2): 329–344.
- Kurtzman, C., J. Fell, and T. Boekhout. 2011. *The Yeasts: A taxonomic study*. 5th Editio. Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- Laverde, J., L. Egea, D. Rodriguez, and J. Peña. 2010. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Leandro, M., H. Sychrova, C. Prista, and M.C. Loureiro-Dias. 2011. The osmotolerant fructophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii* employs two plasma- membrane fructose uptake systems belonging to a new family of yeast sugar transporters. *Microbiology* 157: 601–608.
- LeBlanc, B., O. Davis, S. Boue, A. DeLucca, and T. Deeby. 2009. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem.* 115(4): 1299–1305.
- Lebovka, N.I., I. Praporscic, and E. Vorobiev. 2004. Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5(1): 9–16.
- Lee, J., Y. Hung, and C. Chou. 2008. Solid-state fermentation with fungi to enhance the antioxidative activity, total phenolic and anthocyanin contents of black bean. *Int. J. Food Microbiol.* 121(2): 150–156.
- Lee, S., S. Jeong, S. Kim, H. Park, K. Nam, and D. Ahn. 2006a. Effect of far- infrared radiation and heat treatment on the antioxidant activity of water extracts from peanut hulls. *Food Chem.* 94(4): 489–493.
- Lee, H., J. Park, S. Seok, M. Baek, D. Kim, and K. Lee. 2006b. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1761(7): 736–744.
- Leja, M., A. Mareczek, G. Wyżgolik, J. Klepacz-Baniak, and K. Czekońska. 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chem.* 100(1): 237–240.
- Lewis, N., and E. Yamamoto. 1990. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 455–496.
- Li, L., L. Feng, J. Yi, C. Hua, F. Chen, X. Liao, Z. Wang, and X. Hu. 2010. High hydrostatic pressure inactivation of total aerobic bacteria, lactic acid bacteria, yeasts in sour Chinese cabbage. *Int. J. Food Microbiol.* 142(1-2): 180–184.

- Linton, M., and M. Patterson. 2000. High pressure processing of foods for microbial safety and quality. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 47(2-3): 175–182.
- Liu, L., J.F.D. Dean, W.E. Friedman, and K.-E.L. Eriksson. 1994. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *Plant J.* 6(2): 213–224.
- Liu, X., X. Zheng, Z. Song, X. Liu, N.K. Kopparapu, X. Wang, and Y. Zheng. 2014. Preparation of enzymatic pretreated corn gluten meal hydrolysate and in vivo evaluation of its antioxidant activity. *J. Funct. Foods.*
- Loewus, F.A., B.G. Baldi, V.R. Franceschi, L.D. Meinert, and J.J. McCollum. 1985. Pollen Sporoplasts: Dissolution of Pollen Walls. *Plant Physiol.* 78: 652–654.
- Van Loey, A., V. Ooms, C. Weemaes, I. Van den Broeck, L. Ludikhuyze, and O. Indrawati. 1998. Thermal and pressure temperature degradation of chlorophyll in broccoli (*Brassica oleracea* L. *italica*) juice: a kinetic study. *J. Agric. Food Chem.* 46(12): 2785–2792.
- Loper, G., L. Standifer, M. Thompson, and M. Gilliam. 1980. Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*prunus dulcis*) pollen and bee bread. I- Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals. *Apidologie* 11(1): 63–73.
- Ludikhuyze, L., A. Van Loey, C. Smout, O. Indrawati, and M. Hendrickx. 2003. Effect of combined pressure and temperature on enzymes related to quality of fruits and vegetables: from kinetic information to process engineering aspects. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43(5): 527–586.
- Ludikhuyze, L., L. Rodrigo, and M. Hendrickx. 2000. The activity of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. cv *Italica*): influence of intrinsic and extrinsic factors. *J. Food Prot.* 63(3): 400–403.
- Madhavi, V., and S.S. Lele. 2009. Laccase: Properties and applications. *BioResources* 4(Thurston 1994): 1694–1717.
- MADR. 2015. Cifras Sectoriales de la Cadena de las Abejas y la Apicultura en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Mäki, M. 2004. Lactic Acid Bacteria in Vegetable Fermentations. p. 419–430. *In* Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (eds.), *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects.* Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA.
- Manning, R. 2006. Fatty acid composition of pollen and the effect of two dominant fatty acids (linoleic and oleic) in pollen and flour diets on longevity and nutritional composition of honey bees (*Apis mellifera*).

- Maragkoudakis, P., W. Chingwaru, L. Gradisnik, E. Tsakalidou, and A. Cencic. 2010. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *Int. J. Food Microbiol.* 141: S91–S97.
- Margaoan, R., L. Marghitas, D. Dezmirean, O. Bobis, L. Tomos, C. Mihai, and V. Bonta. 2013. Honeybee-collected Pollen from Transylvania: Palynological Origin, Phenolic Content and Antioxidant Activity. *Bull. UASVM Anim. Sci. Biotechnol.* 70(2): 311–315.
- Mărghitaș, L.A., O.G. Stanciu, D.S. Dezmirean, O. Bobiș, O. Popescu, S. Bogdanov, and M.G. Campos. 2009. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chem.* 115(3): 878–883.
- Margosch, D., M. Ehrmann, R. Buckow, V. Heinz, R. Vogel, and M. Ganzle. 2006. High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3476–3481.
- Marinova, M., and B. Tchorbanov. 2010. Preparation of Antioxidant Enzymatic Hydrolysates from Honeybee-Collected Pollen Using Plant Enzymes. *Enzyme Res.* doi:10.406.
- Markowicz, D., O. Barth, C. Rocha, I. Barbosa, P. Oliveira, E. Silva, and M. Michelin. 2004. Fatty acid composition and palynological analysis of bee (*Apis*) pollen loads in the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *J. Apic. Res.* 43(2): 35–39.
- Martínez, T. 2006. Diagnóstico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural - Dirección de Cadenas Productivas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Martinez, K., R. Baeza, F. Millan, and A. Pilosof. 2005. Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocoll.* 19: 361–369.
- Martinez-Anaya, M. 1996. Enzymes and Bread flavor. *J. Agric. Food Chem.* 44(9): 2469–2480.
- Martini, A. 1992. Biodiversity and conservation of yeasts. *Biodivers. Conserv.* 1(4): 324–333.
- Martinson, V., B. Danforth, R. Minckley, O. Rueppell, S. Tingek, and N. Moran. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.* 20: 619–628.
- Mathur, S., and R. Singh. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105(3): 281–95.
- Mathys, A., K. Reineke, V. Heinz, and D. Knorr. 2009. High pressure thermal sterilization -

- development and application of temperature controlled spore inactivation studies. *High Press. Res.* 29(1): 3–7.
- Matser, A.M., B. Krebbers, R. Van den Berg, and P. Bartels. 2004. Advantages of high pressure sterilization on quality of food products. *Trends Food Sci. Technol.* 15(2): 79–85.
- McFrederick, Q.S., W.T. Wcislo, D.R. Taylor, H.D. Ishak, S.E. Dowd, and U.G. Mueller. 2012. Environment or kin: whence do bees obtain acidophilic bacteria? *Mol. Ecol.* 21(7): 1754–1768.
- McInerney, J., C. Seccafien, C. Stewart, and A. Bird. 2007a. Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8: 543–548.
- McInerney, J., C. Seccafien, C. Stewart, and A. Bird. 2007b. Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *High Press. Process. Spec. Issue Sect.* 8(4): 543–548.
- Medina, A., G. Gonzalez, J. Saez, R. Mateo, and M. Jimenez. 2004. Bee pollen, a substrate that stimulates ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 27(2): 261–267.
- Melnikova, E., V. Roshchina, and V. Karnaukhov. 1997. Microspectrofluorometry of pollen. *Biophys. J.* 42: 226–233.
- Mendes-Ferreira, A., F. Cosme, C. Barbosa, V. Falco, A. Inês, and A. Mendes-Faia. 2010. Optimization of honey-must preparation and alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* for mead production. *Int. J. Food Microbiol.* 144(1): 193–8.
- Meng, X., B. a Slominski, C.M. Nyachoti, L.D. Campbell, and W. Guenter. 2005. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. *Poult. Sci.* 84(1): 37–47.
- Mesa, A. 2015. Caracterización fisicoquímica y funcional del polen de abejas (*Apis mellifera*) como estrategia para generar valor agregado y parámetros de calidad al producto apícola.
- México. 1998. Norma Mexicana NMX-FF-094-1998-SCFI: Productos alimenticios no industrializados para consumo humano - Polen - (Pollínis). Especificaciones. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.
- Michel, M., and K. Autio. 2001. Effects of high pressure on quality of food products (M Hendrickx and D Knorr, Eds.). Kluwer Academic Plenum Publishers, New York, NY,

USA.

- Molina-Höppner, A., W. Doster, R. Vogel, and M. Gänzle. 2004. Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4): 2013–2020.
- Montoya, P. 2011. Uso de recursos florales poliníferos por *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) en apiarios de la Sabana de Bogotá y alrededores. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Morais, M., L. Moreira, X. Feás, and L. Estevinho. 2011. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* 49(5): 1096–1101.
- Moreno, L. 2012. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas.
- Moussa, M., J. Perrier-Cornet, and P. Gervais. 2006. Synergistic and antagonistic effects of combined subzero temperature and high pressure on inactivation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 150–156.
- Mozzi, F., R. Raya, and G. Vignolo. 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing, Aimes, USA.
- Mujica-Paz, H., A. Valdez-Fragoso, C. Samson, J. Welti-Chanes, and J. Torres. 2011. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food Bioprocess Technol.* 4(6): 969–985.
- Müller, J., and A. Heindl. 2006. Drying of medicinal plants. *Frontis* 17: 237–252.
- Muñoz, M., B. De Ancos, C. Sanchez-Moreno, and M. Cano. 2007. Effects of High Pressure and mild heat on endogenous microflora and on the inactivation and sublethal injury of *Escherichia coli* inoculated into fruit juices and vegetable soup. *J. Food Prot.* 7: 1587–1593.
- Naczk, M., and F. Shahidi. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41(5): 1523–1542.
- Nagai, T., R. Inoue, H. Inoue, and N. Suzuki. 2002. Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. *Nutr. Res.* 22(4): 519–526.
- Nagata, H., T. Takei, R. Kojima, Y. Kodera, H. Nishimura, and Y. Inada. 2005. Characteristics of an aminopeptidase from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen. *J. Agric. Food Chem.* 53(13): 5445–5448.

- Naggar, Y. a Al, E. a Naiem, A.I. Seif, and M.H. Mona. 2013. Honey bees and their products as bio-indicator of environmental pollution with heavy metals. *Mellifera* 20(October): 10–20.
- Napoli, A., D. Aiello, L. Donna, A. Sajjad, E. Perri, and G. Sindona. 2006. Profiling of hydrophilic proteins from *Olea europaea* olive pollen by MALDI TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78(10): 3434–3443.
- Neetoo, H., S. Nekoozadeh, Z. Jiang, and H. Chen. 2011. Application of high hydrostatic pressure to decontaminate green onions from *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 28(7): 1275–1283.
- Neetoo, H., M. Ye, and H. Chen. 2008. Potential application of high hydrostatic pressure to eliminate *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.* 128(2): 348–353.
- Nevas, M., M. Lindström, K. Hautamäki, S. Puoskari, and H. Korkeala. 2005. Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E and F in honey produced in the Nordic countries. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 145–151.
- Nevas, M., M. Lindström, A. Hörman, R. Keto-Timonen, and H. Korkeala. 2006. Contamination routes of *Clostridium botulinum* in the honey production environment. *Environ. Microbiol.* 8(6): 1085–1094.
- Nguyen, M., I. Oey, M. Hendrickx, and A. Van Loey. 2006. Kinetics for isobaric-isothermal degradation of (6R,S) 5-formyltetrahydrofolic acid in a model system. *Eur. Food Res. Technol.* 223(3): 325–332.
- Nielsen, J., V. John, and G. Liden. 2003. *Bioreaction Engineering Principles*. Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Nijveldt, R., E. Nood, D. Hoorn, P. Boelens, K. Norren, and P. Leeuwen. 2001. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 418–425.
- Niu, L., S. Jiang, and L. Pan. 2013. Preparation and evaluation of antioxidant activities of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation. *J. Food Sci. Technol.* 50(1): 53–61.
- Norton, T., and D.-W. Sun. 2008. Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food Bioprocess Technol.* 1(1): 2–34.
- O'Meara, T., and J. Alspaugh. 2012. The cryptococcus neoformans capsule: A sword and a shield. *Clin. Microbiol. Rev.* 25(3): 387–408.

- Oey, I., M. Lille, A. Van Loey, and M. Hendrickx. 2008. Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 19(6): 320–328.
- Oey, I., P. Verlinde, M. Hendrickx, and A. Van Loey. 2006. Temperature and pressure stability of L-ascorbic acid and/or [6s] 5-methyltetrahydrofolic acid: a kinetic study. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 71–77.
- Oliveira, K. 2006. Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadores do processo de desidratação. Master Dissertation. Pharmaceutical Science School, University of São Paulo, Brazil.
- Oliveira, A., M. Silvestre, H. Alves-Prado, R. Andre, M. Paz, G. Fonseca, and R. Leite. 2015. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. *African J. Biotechnol.* 14(14): 1215–1223.
- Oliver, G., R. Wheeler, and D. Thacker. 1996. Semi-sweet biscuits: 2. Alternatives to the use of sodium metabisulphite in semi-sweet biscuit production. *J. Sci. Food Agric.* 71(3): 337–344.
- ONU. 1987. Report of the World Commission on Environment and Development. United Nations Organization, New York, NY, USA.
- ONU. 2015a. Objetivos de Desarrollo del Milenio. Organización de las Naciones Unidas, New York, NY, USA.
- ONU. 2015b. World population prospects. United Nations Organization, New York, NY, USA.
- Van Opstal, I., S. Vanmuyssen, and C. Michiels. 2003. High sucrose concentration protects *E. coli* against high pressure inactivation but not against high pressure sensitization to the lactoperoxidase system. *Int. J. Food Microbiol.* 88(1): 1–9.
- Ortiz, L. 2007. Evaluación del Potencial de Producción de Bacteriocinas de *Lactobacillus* aislados de Ensilajes a base de Maíz.
- Orzáez, M., A. Díaz, R. Bravo, and G. Blázquez. 2001. Mineral content of commercial pollen. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 52(3): 243–249.
- Oszmiański, J., A. Wojdyło, and J. Kolniak. 2011. Effect of pectinase treatment on extraction of antioxidant phenols from pomace, for the production of puree-enriched cloudy apple juices. *Food Chem.* 127(2): 623–631.
- Otero, L., M. Martino, N. Zaritzky, M. Solas, and P. Sanz. 2000. Preservation of microstructure in peach and mango during high-pressure shift freezing. *J. Food Sci.*

65(3): 466–470.

- Otero, L., M. Solas, P. Sanz, C. Elvira, and J. Carrasco. 1998. Contrasting effects of high pressure assisted freezing and conventional air freezing on eggplant tissue microstructure. *Zeitschrift für Leb. Untersuchung und Forsch. A / Food Res. Technol.* 206(5): 338–342.
- Othman, N., D. Roblain, N. Chammen, P. Thonart, and M. Hamdi. 2009. Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chetoui olives. *Food Chem.* 116(3): 662–669.
- Özler, H., S. Pehlivan, A. Kahraman, M. Doğan, F. Celep, B. Başer, A. Yavru, and S. Bagherpour. 2011. Pollen morphology of the genres *Salvia* L. (Lamiaceae) in Turkey. *Flora - Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 206(4): 316–327.
- Panyam, D., and A. Kilara. 1996. Enhancing the functionality of food modification proteins by enzymatic. *Trends Food Sci. Technol.* 7(April): 120–125.
- Di Paola-Naranjo, R., J. Sánchez-Sánchez, A. González-Paramás, and R.-G. C. 2004. Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. *J. Chromatogr. A*, 1054(1-2): 205–210.
- Paraman, I., N.S. Hettiarachchy, C. Schaefer, and M.I. Beck. 2007. Hydrophobicity, Solubility, and Emulsifying Properties of Enzyme-Modified Rice Endosperm Protein. *Cereal Chem. J.* 84(4): 343–349.
- Park, P., W. Jung, K. Nam, F. Shahidi, and S. Kim. 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78: 651–656.
- Park, S., J. Lee, H. Baek, and H. Lee. 2010. Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate. *J. Food Biochem.* 34: 120–132.
- Pasini, G., B. Simonato, M. Giannattasio, A. Perufo, and A. Curioni. 2001. Modifications of wheat flour proteins during in vitro digestion of bread dough, crumb and crust: An electrophoretic and immunological study. *J. Agric. Food Chem.* 49(5): 2254–2261.
- Patras, A., N. Brunton, S. Da Pieve, and F. Butler. 2009. Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10(3): 308–313.
- Patterson, M.F., A.M. McKay, M. Connolly, and M. Linton. 2012. The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during

- refrigerated storage. *Food Microbiol.* 30(1): 205–212.
- Pavan, M., and A. Worth. 2008. A set of case studies to illustrate the applicability of DART (Decision Analysis by Ranking Techniques) in the ranking of chemicals. Luxemburg.
- Peres, C., C. Peres, A. Hernandez-Mendoza, and F. Malcata. 2012. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - with emphasis on table olives. *Trends Food Sci. Technol.* 26(31-42).
- Pérez-Gregorio, M.R., J. Regueiro, E. Alonso-González, L.M. Pastrana-Castro, and J. Simal-Gándara. 2011. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Sci. Technol.* 44(8): 1793–1801.
- Pernal, S., and R. Currie. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31(3): 387–409.
- Phunchaisri, C., and A. Apichartsrangkoon. 2005. Effects of ultra-high pressure on biochemical and physical modification of lychee (*Litchi chinesis* Sonn.). *Food Chem.* 93(1): 57–64.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16: 1306–1314.
- Pinelo, M., B. Zeuner, and A.S. Meyer. 2010. Juice clarification by protease and pectinase treatments indicates new roles of pectin and protein in cherry juice turbidity. *Food Bioprod. Process.* 88(2-3): 259–265.
- der Plancken, I. Van, A. Van Loey, and M. Hendrickx. 2005. Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. *J. Agric. Food Chem.* 14: 5726–5733.
- Plaza, L., C. Sanchez-Moreno, B. DeAncos, and M. Cano. 2006. Carotenoid content and antioxidant capacity of Mediterranean vegetable soup (gazpacho) treated by high-pressure/temperature during refrigerated storage. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 210–215.
- Polydera, A., N. Stoforos, and P. Taoukis. 2004. The effect of storage on the antioxidant activity of reconstituted orange juice, which had been pasteurized by high pressure or heat. *Int. J. Food Sci.* 39(7): 783–791.
- Polydera, A., N. Stoforos, and P. Taoukis. 2005. Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chem.* 91(3): 495–503.
- Prado, J. 2005. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del polen de abejas de

cinco departamentos de Honduras. Zamorano, Tegucigalpa. Honduras.

- Prelipcean, A. 2012. The dynamics of total polyphenols, flavonoids and antioxidant activity of bee-pollen collected from Moldavia Area, Romania. *Cercet. Agron. Mold.* 45(1): 81–92.
- Prestamo, G., and G. Arroyo. 2000. Preparation of preserves with fruits treated by high pressure. *Alimentaria* 318: 25–30.
- Prestamo, G., L. Palomares, and P. Sanz. 2004. Broccoli (*Brasica oleracea*) treated under pressure-shift freezing process. *Eur. Food Res. Technol.* 219(6): 598–604.
- Pulido, N., C. Salazar, M. Quicazán, and C. Diaz. 2012. Evaluación del efecto de la temperatura de secado sobre el contenido total de compuestos fenólicos en polen apícola. p. 33–36. *In* Seminario Internacional Secado de Productos Agrícolas.
- Qian, W.L., Z. Khan, D.G. Watson, and J. Fearnley. 2008. Analysis of sugars in bee pollen and propolis by ligand exchange chromatography in combination with pulsed amperometric detection and mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* 21(1): 78–83.
- Qin, F., and H. Sun. 2005. Immunosuppressive activity of Pollen *Typhae* ethanol extract on the immune responses in mice. *J. Ethnopharmacol.* 102(3): 424–429.
- Qiu, W., H. Jiang, H. Wang, and Y. Gao. 2006. Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability. *Food Chem.* 97(3): 516–523.
- Rasanayagam, V., V.M. Balasubramaniam, E. Ting, C. Sizer, C. Bush, and C. Andersson. 2003. Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *J. Food Sci.* 68(1): 254–259.
- Rastogi, N.K., K.S.M.S. Raghavarao, V.M. Balasubramaniam, K. Niranjana, and D. Knorr. 2007. Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47(1): 69–112.
- Rawel, H.M., K. Meidtner, and J. Kroll. 2005. Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins. *J. Agric. Food Chem.* 53(10): 4228–4235.
- Rebiai, A., and T. Lanez. 2012. Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from northwest Algeria. *J. Fundam. Appl. Sci.* 4(2): 26–35.
- Reineke, K., A. Mathys, and D. Knorr. 2011. The impact of high pressure and temperature on Bacterial Spores: Inactivation mechanisms of *Bacillus subtilis* above 500 MPa. *J. Food Sci.* 76(3): M189–M197.
- Reineke, K., K. Schlumbach, D. Baier, A. Mathys, and D. Knorr. 2013. The release of

- dipicolinic acid - the rate-limiting step of *Bacillus* endospore inactivation during the high pressure thermal sterilization process. *Int. J. Food Microbiol.* 162(1): 55–63.
- Ren, X., H. Zhang, and J. Dong. 2009a. Research progress in cell disruption techniques for pollen. *Food Sci.* 30(21): 380–383.
- Ren, X., H. Zhang, J. Dong, H. Li, and L. Zhao. 2009b. Effect of papain treatment on permeability of cell wall of bee pollen. *Food Sci.* 30(23): 246–251.
- Ren, J., X. Zheng, X. Liu, and H. Liu. 2010. Purification and characterization of antioxidative peptide from sunflower protein hydrolysate. *Food Technol. Biotechnol.* 48(4): 519–523.
- Rimpler, M. 2003. Von Bienen gesammelte Blütenpollen: Eigenschaften und Verwendung. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren* 44(3): 158–165.
- Del Risco, C. 2002. Polen-pan de abejas: composición, nutrición, acción en la salud humana y microbiología. Estación Experimental Apícola de La Habana, Cuba.
- Del Risco, C. 2011. Polen-Pan de Abejas: Composición, Nutrición, Acción en la Salud Humana y Microbiología.
- Del Risco, C., A. Pérez, V. Álvarez, G. Rodríguez, V. Leiva, Y. Puig, and R. García. 2012. Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas* 43(1): 17–21.
- Rodríguez, H., J. Curiel, J. Landete, B. de las Rivas, F. de Felipe, and C. Gómez-Cordoves. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 132(2-3): 79–90.
- Rodríguez-Amaya, D., and K. Kimura. 2004. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus, Washington D.C., USA.
- Roldán-Marín, E., C. Sánchez-Moreno, R. Lloría, B. de Ancos, and M. Cano. 2009. Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT –Food Sci. Technol.* 42: 835–841.
- Romero, M. 2003. Hidrólisis ácida y enzimática del residuo de poda de olivo. Fermentación de hidrolizados con *Pachysolen tannophilus*.
- Roshchina, V., E. Melnikova, and L. Kovaleva. 2010. Changes in fluorescence during development of the male gametophyte. *Russ. J. Plant Physiol.* 44: 45–53.
- Rossini, K., C.P.Z. Noreña, F. Cladera-Olivera, and A. Brandelli. 2009. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. *LWT - Food Sci. Technol.* 42(4): 862–867.

- Roulston, T., and J. Cane. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst. Evol.* 222(1): 187–209.
- Rowley, J., D. Claugher, and J. Skvarla. 1999. Structure of the exine in *Artemisia vulgaris* (Asteraceae): A review. *Taiwania* 44: 1–21.
- Rowley, J., and J. Skvarla. 2000. The elasticity of the exine. *Grana* 39: 1–7.
- Rozema, J., R. Broekman, P. Blokker, B. Meijkamp, N. de Bakker, J. van de Staij, A. van Beem, F. Ariese, and S. Kars. 2001. UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 62(1-2): 108–117.
- Russo, P., R. Beleggia, S. Ferrer, I. Pardo, and G. Spano. 2010. A polyphasic approach in order to identify dominant lactic acid bacteria during pasta manufacturing. *LWT –Food Sci. Technol.* 43: 982–986.
- Ryan, K., and C. Ryan. 2004. *Sherris Medical Microbiology*. 4th Editio. Mc. Graw Hill.
- Sá Otero, M., E. Díaz, and S. Arnesto. 2009. Analysis of protein content in pollen loads produced in north- west Spain. *Grana* 48(4): 290–296.
- Saa-Otero, M., E. Diaz-Losada, and E. Fernandez-Gomez. 2000. Analysis of fatty acids, proteins and ethereal extract in honeybee pollen. *Grana* 39(4): 175–181.
- Saavedra, C., C. Rojas, P. Delgado, and E. Guillermo. 2013. Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque - Perú). *Rev. Chil. Nutr.* 40: 71–78.
- Sablani, S.S., and M.S. Rahman. 2003. Using neural networks to predict thermal conductivity of food as a function of moisture content, temperature and apparent porosity. *Food Res. Int.* 36(6): 617–623.
- Sadeghbeigi, R. 2000. *Fluid Catalytic Cracking Handbook*. Second edi. Gulf Publishing, Houston, USA.
- Sakanaka, S., and Y. Ishihara. 2008. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Food Chem.* 107: 739–744.
- Salazar, C. 2014. Evaluación de diferentes condiciones del proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola.
- Salvador. 2005. Norma Salvadoreña. NSO 65.38.01:05. Calidad del Polen de Abejas. Especificaciones. Cons. Nac. Cienc. y Tecnol.

- Sánchez-Moreno, C., B. De Ancos, L. Plaza, P. Elez-Martínez, and M. Cano. 2009. Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49: 552–576.
- Sanchez-Moreno, C., L. Plaza, B. De Ancos, and M. Cano. 2006. Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato puree on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity. *J. Sci. Food Agric.* 86(2): 171–179.
- Sanchez-Moreno, C., L. Plaza, P. Elez-Martínez, B. De Ancos, O. Martín-Belloso, and M. Cano. 2005. Impact of high-pressure and pulse electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice and comparison with traditional thermal processing. *J. Agric. Food Chem.* 53(11): 4403–4409.
- Sargin, İ., and G. Arslan. 2015. Effect of glutaraldehyde cross-linking degree of chitosan/sporopollenin microcapsules on removal of copper(II) from aqueous solution. *Desalin. Water Treat.:* 1–13.
- Sariaslani, F.S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Crit. Rev. Biotechnol.* 9(3): 171–257.
- Saric, A., T. Balog, S. Sobocanec, B. Kusic, V. Sverko, G. Rusak, S. Likic, D. Bubalo, B. Pinto, D. Reali, and T. Marotti. 2009. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem. Toxicol.* 47(3): 547–554.
- Sarmadi, B., and A. Ismail. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31: 1949–1956.
- Sattler, J.A.G., I.L.P. de Melo, D. Granato, E. Araújo, A. da Silva de Freitas, O.M. Barth, A. Sattler, and L.B. de Almeida-Muradian. 2015. Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil. *Food Res. Int.*
- Saucedo-Reyes, D., A. Marco-Celdrán, M. Pina-Pérez, D. Rodrigo, and A. Martínez-López. 2009. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10(2): 135–141.
- Schulte, F., J. Mäder, L. Kroh, U. Panne, and J. Kneipp. 2009. Characterization of pollen carotenoids with in situ and high-performance thin layer chromatography supported resonant Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* 81: 8426–8433.
- Scott, R., and A. Stead. 1995. *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction.* Cambridge University Press.
- Seeley, T. 2006. *Ecología da abelha: Um estudo de adaptação na vida social.* Paixao.

- Serra-Bonvehi, J., J. Gonell, and A. Gomez. 1986. Estudio de la composición y características físico-químicas del polen de abejas. *Alimentaria*: 63–67.
- Serra-Bonvehi, J., and R. Jordá. 1997. Nutrient composition and microbial quality of honeybee-collected pollen Spain. *J. Agric. Food Chem.* 45: 725–732.
- Serra-Bonvehí, J., M. Soliva-Torrentó, and E. Centelles-Lorente. 2001. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 49(4): 1848–1853.
- Sevenich, R., F. Bark, C. Crews, W. Andersson, C. Pye, and K. Riddlellova. 2013. Effect of high pressure thermal sterilization on the formation of food processing contaminants. *J. Food Sci.* 20: 42–50.
- Sevenich, R., F. Bark, E. Kleinstueck, C. Crews, C. Pye, J. Hradecky, K. Reineke, M. Lavilla, I. Martinez-de-Maranon, J.C. Briand, and D. Knorr. 2015. The impact of high pressure thermal sterilization on the microbiological stability and formation of food processing contaminants in selected fish systems and baby food puree at pilot scale. *Food Control* 50: 539–547.
- Shouqin, Z., X. Jun, and W. Changzheng. 2005. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80(1): 50–54.
- Silva, T., C. Camara, A. Lins, J. Barbosa-Filho, E. Silva, and B. Freitas. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Compos. Anal.* 19(6-7): 507–511.
- Simpson, R., and A. Gilmour. 1997a. The effect of high hydrostatic pressure on the activity of intracellular enzymes of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 48–53.
- Simpson, R., and A. Gilmour. 1997b. The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *J. Appl. Microbiol.* 83: 181–188.
- Singleton, V., R. Orthofer, and R. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152–178.
- Slamenova, D., J. Labaj, L. Krizkova, G. Kogan, J. Sandula, N. Bresgen, and P. Eckl. 2003. Protective effects of fungal (1→3)-β-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells. *Cancer Lett.* 198: 153–160.
- Smelt, J., J. Hellemons, and M. Patterson. 2002. Effects of high pressure on vegetative microorganisms (M Hendrickx and D Knorr, Eds.). Kluwer Academic Publishers, New York, NY, USA.

- Southworth, D. 1988. Isolation of Exines from Gymnosperm Pollen. *Am. J. Bot.* 75(1): 15–21.
- Souverein, O., J. Vries, R. Freese, B. Watzl, A. Bub, E. Miller III, J. Castenmiller, W. Pasman, K. van het Hof, M. Chopra, A. Karlsen, L. Dragsted, R. Winkels, C. Itsiopoulos, L. Brazionis, K. O’Dea, C. van Loo-Bouwman, J. Naber, H. van der Voet, and H. Boshuizen. 2015. Prediction of fruit and vegetable intake from biomarkers using individual participant data of diet-controlled intervention studies. *Br. J. Nutr.* 113(9): 1396–1409.
- Spyropoulos, B., E. Misiakos, C. Fotiadis, and C. Stoidis. 2011. Antioxidant properties of probiotics and their protective effects in the pathogenesis of radiation-induced enteritis and colitis. *Dig. Dis. Sci.* 56(2): 285–294.
- Standifer, L., W. McCaughey, S. Dixon, M. Gilliam, and G. Loper. 1980. Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *prunus dulcis*. *Apidologie* 11(2): 163–171.
- Stanley, R., and H. Linskens. 1974. *Pollen: biology, biochemistry, management*. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg.
- Stirling, A., and R. Whittenburg. 1963. Sources of the lactic acid bacteria occurring in silage. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 86–90.
- Su, M.-S., and P.-J. Chien. 2007. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chem.* 104(1): 182–187.
- Sun, D.-W. 2006. *Thermal food processing*. CRC Press., Boca Raton, USA.
- Surowka, K., D. Zmudzinski, M. Fik, R. Macura, and W. Lasocha. 2004a. New protein preparations from soy flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5: 225–234.
- Surowka, K., D. Zmudzinski, and J. Surowka. 2004b. Enzymic modifications of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 153–160.
- Suzuki, H. 2015. *How enzymes work: from structure to function*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Suzuki, T., K. Masaoka, M. Nishi, K. Nakamura, and S. Ishiguro. 2008. Identification of kaonashi Mutants Showing Abnormal Pollen Exine Structure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49(10): 1465–1477.
- Szczesna, T. 2006. Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen

- from selected botanical origins. *J. Apic. Sci.* 50(2): 81–90.
- Szczesna, T. 2007a. Study on the sugar composition of Honeybee-collected pollen. *J. Apic. Sci.* 51(1): 15–22.
- Szczesna, T. 2007b. Concentration of selected elements in honeybee-collected pollen. *J. Apic. Sci.* 51(1): 5–13.
- Szczesna, T., and H. Rybak-Chmielewska. 1998. Some properties of honey bee collected pollen. *Pszczel. Zesz. Nauk.* 42(2): 79–80.
- Talpay, B. 1984. Der pollen. Versuch einer standortbestimmung.
- Tang, C.H., L. Chen, and C.Y. Ma. 2009. Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *Food Chem.* 113: 957–963.
- Teixeira, A. 2007. Thermal processing for food sterilization and preservation (M Kutz, Ed.). Springer, New York, NY, USA.
- Thomasson, M., D. Baldwin, A. Diego-Taboada, S. Atkin, G. Mackenzie, and J. Wadhawan. 2010. Electrochemistry and charge transport in sporopollenin particle arrays. *Electrochem. commun.* 12: 1428–1431.
- Togashi, S., N. Takahashi, Y. Kubo, A. Shigihara, K. Higashiyama, and S. Watanabe. 2000. Purification and identification of antioxidant substances in human-placenta extracts. *J. Heal. Sci.* 46(2): 117–125.
- Tomas-Lorente, F., M. Garcia-Grau, J. Nieto, and F. Tomas-Barberan. 1992. Flavonoids from Cistus-Ladanifer bee pollen. *Phytochemistry* 31(6): 2027–2029.
- Torino, M., R. Limon, C. Martinez-Villaluenga, S. Mäkinen, A. Pihlanto, and C. Vidal-Valverde. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. *Food Chem.* 136(2): 1030–1037.
- Tsai, P., and C. She. 2006. Significance of Phenol-Protein Interactions in Modifying the Antioxidant Capacity of Peas. *J. Agric. Food Chem.* 54(22): 8491–8494.
- Tsangalis, D., J. Ashton, A. McGill, and N. Shah. 2002. Enzymic transformation of isoflavone phytoestrogens in soymilk by B-glucosidase-producing bifidobacteria. *J. Food Sci.* 67(8): 3104–3113.
- Udensi, E., F. Ekwu, and J. Isinguzo. 2007. Antinutrient Factors of Vegetable Cowpea (sesquipedalis) Seeds During Thermal Processing. *Pakistan J. Nutr.* 6(2): 194–197.
- Ujiie, Y., Y. Arata, and M. Sugawara. 2003. Heating experiments on Pinus pollen grains

- and its relation to petroleum genesis. *Geochem. J.* 37: 367–376.
- Ukiya, M., T. Akihisa, H. Tokuda, K. Koike, J. Takayasu, and H. Okuda. 2003. Isolation, structural elucidation, and inhibitory effects of terpenoid and lipid constituents from sunflower pollen on Epstein–Barr virus early antigen induced by tumor promoter, TPA. *J. Agric. Food Chem.* 51(10): 2949–2957.
- Ulusoy, E., and S. Koliayli. 2013. Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer bee pollen. *J. Food Biochem.* 38: 73–82.
- Valero, E. 1993. Caracterización cinética de la polifenol oxidasa de uva Airen.
- Vamanu, A., E. Vamanu, M. Drugulescu, O. Popa, and G. Câmpeanu. 2006. Identification of a Lactic Bacterium Strain Used for Obtaining a Pollen-Based Probiotic Product. *Turkish J. Biol.* 30: 75–80.
- Vasco, C., J. Ruales, and A. Kamal-Eldin. 2008. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 111(4): 816–823.
- Vásquez, A., and T.C. Olofsson. 2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* 48(3): 189–195.
- Vázquez-Gutiérrez, J.L., M. Hernández-Carrión, A. Quiles, I. Hernando, and I. Pérez-Munuera. 2012. Impact of high hydrostatic pressures on the structure, diffusion of soluble compounds and textural properties of persimmon “Rojo Brillante.” *Food Res. Int.* 47(2): 218–222.
- Vázquez-Gutiérrez, J.L., L. Plaza, I. Hernando, C. Sánchez-Moreno, A. Quiles, B. De Ancos, and M. Cano. 2013. Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food Funct.* 4: 586–591.
- Verlent, I., A. Van Loey, C. Smout, T. Duvetter, and M. Hendrickx. 2004. Purified tomato polygalacturonase activity during thermal and high pressure treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 86(1): 63–71.
- Verlent, I., C. Smout, T. Duvetter, M. Hendrickx, and A. Van Loey. 2005. Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6: 293–303.
- Vioque, J., R. Sanchez-Vioque, A. Clemente, J. Pedroche, and F. Millan. 2002. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 1–4.
- Wakil, A., G. Mackenzie, A. Diego-Taboada, J. Gordon, and S. Atkin. 2010. Enhanced Bioavailability of Eicosapentaenoic Acid from Fish Oil After Encapsulation Within

- Plant Spore Exines as Microcapsules. *Lipids* 45(7): 645–649.
- Wang, J., B. Sun, Y. Cao, Y. Tian, and C. Wang. 2009a. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. *Carbohydr. Polym.* 77(4): 816–821.
- Wang, X.S., C.H. Tang, L. Chen, and X.Q. Yang. 2009b. Characterization and antioxidant properties of hemp protein hydrolysates obtained with neutrase?? *Food Technol. Biotechnol.* 47(4): 428–434.
- Wang, X.J., X.Q. Zheng, N.K. Kopparapu, W.S. Cong, Y.P. Deng, X.J. Sun, and X.L. Liu. 2014. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. *Process Biochem.* 49(9): 1562–1569.
- Wennberg, M., and M. Nyman. 2004. On the possibility of using high pressure treatment to modify physicochemical properties of dietary fibre in white cabbage. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5: 171–177.
- Wilczyńska, A. 2010. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Different Types of Polish Honey - A short report. 60(4): 309–313.
- Wilkins, M.R., W.W. Widmer, K. Grohmann, and R.G. Cameron. 2007. Hydrolysis of grapefruit peel waste with cellulase and pectinase enzymes. *Bioresour. Technol.* 98(8): 1596–1601.
- Wimalaratne, S., and M. Farid. 2008. Pressure assisted thermal sterilization. *Food Bioprod. Process.* 86(4): 312–316.
- Winai, S., K. Paul, and Z. Ioannis. 2005. The effect of high hydrostatic pressure on the anthocyanins of raspberry (*Rubus idaeus*). *Food Chem.* 90(1-2): 193–197.
- Winston, M. 1991. *The biology of the honey bee*. Harvard University Press.
- Wood, B., and P. Warner. 2003. *Genetics of Lactic Acid Bacteria*. Kluwer Academic Plenum Publishers, New York, NY, USA.
- Wouters, P., E. Glassker, and J. Smelt. 1998. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 509–514.
- Xiaobo, H., X. Zhaohui, and W. Moucheng. 2007. Preparation of peptides hydrolyzed from rape pollen glutelins. p. 203–208. *In Proceedings The 12th International Rapeseed Congress*. Science Press USA Inc., Wuhan, China.
- Xu, L., I. Sun, L. Dong, and H. Zhang. 2009. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innov. Food*

- Sci. Emerg. Technol. 10: 42–46.
- Yaldagard, M., S. Mortazavi, and F. Tabatabaie. 2008. The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African J. Biotechnol.* 7(16): 2739–2767.
- Yilmaz, Y., and R. Toledo. 2005. Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chem.* 93: 273–278.
- Yuan, K., and W. Xu. 1996. The general situation of the chemistry and pharmacology of Pollen Typhae. *Tradit. Chinese Med.* 27: 634–696.
- Yule, B., S. Roberts, and J. Marshall. 2000. The thermal evolution of sporopollenin. *Org. Geochem.* 31: 859–870.
- Yust, M.D.M., J. Pedroche, M.D.C. Millán-Linares, J.M. Alcaide-Hidalgo, and F. Millán. 2010. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilised Alcalase. *Food Chem.* 122(4): 1212–1217.
- Yuste, J., M. Capellas, D. Fung, and M. Mor-Mur. 2001. High pressure processing for food safety and preservation: a review. *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.* 9(1): 1–10.
- Zanoni, B., E. Pagliarini, G. Giovanelli, and V. Lavelli. 2003. Modelling the effects of thermal sterilization on the quality of tomato puree. *J. Food Eng.* 56(2-3): 203–206.
- Zhang, Y., X. Lu, H. Zhang, L. Wang, X. Guo, and X. Qi. 2014. Isolation and identification of an antioxidant peptide prepared from fermented peanut meal using *Bacillus subtilis* fermentation. *Int. J. Food Prop.* 17: 1237–1253.
- Zhang, Z., H. Pan, L. Fan, C. Soccol, and A. Pandey. 2012. Production of powerful antioxidant supplements via solid-state fermentation of wheat (*Triticum aestivum* Linn.) by *Cordyceps militaris*. *Food Technol. Biotechnol.* 50(1): 32–39.
- Zheng, X., L. Li, X. Liu, X. Wang, J. Lin, and D. Li. 2006. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 763–770.
- Zheng, X., J. Wang, X. Liu, Y. Sun, Y. Zheng, X. Wang, and Y. Liu. 2015. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food Chem.* 172: 407–415.
- Zhou, C., H. Ma, Q. Ding, L. Lin, X. Yu, L. Luo, C. Dai, and A.E.-G. a. Yagoub. 2013. Ultrasonic pretreatment of corn gluten meal proteins and neutrase: Effect on protein conformation and preparation of ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory peptides. *Food Bioprod. Process.* 91(4): 665–671.

- Zhu, K., H. Zhou, and H. Qian. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochem.* 41(6): 1296–1302.
- Zuluaga, C., A. Durán, C. Díaz, and M. Quicazán. 2012. Estrategias para la implementación de Buenas Prácticas en la cadena productiva de polen apícola en Colombia. p. ISBN 978–958–761–308–7. *In* Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Zuluaga, C.M., J.C. Serrato, and M.C. Quicazan. 2015. Bee-Pollen Structure Modification by Physical and Biotechnological Processing: Influence on the Availability of Nutrients and Bioactive Compounds. *Chem. Eng. Trans.* 43: 79–84.