



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN EL POLEN APÍCOLA COMO ALTERNATIVA DE ADECUACIÓN PARA UN SUSTRATO DE FERMENTACIÓN LÁCTICA**

**Ruth Mary Benavides Guevara**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2016



# **EVALUACIÓN DE PRETRATAMIENTOS EN EL POLEN APÍCOLA COMO ALTERNATIVA DE ADECUACIÓN PARA UN SUSTRATO DE FERMENTACIÓN LÁCTICA**

**Ruth Mary Benavides Guevara**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Director (a):

Ph.D., Marta Cecilia Quicazán

Codirector (a):

Ph.D., Cristina Ramírez

Línea de Investigación:

Caracterización y Generación de Valor de Productos Apícolas

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la calidad de alimentos y desarrollo de nuevos productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2016



*Dedicatoria*

*Todo ideal cumplido siempre será dedicado a Dios, mi familia y mi hogar por su apoyo incondicional*

*Aprendí que todo será en los tiempos de Dios.*



## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional de Colombia por acogerme académicamente, al instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos por permitir mi desarrollo personal y profesional.

Agradezco a Dios y a mis amados padres Guillermo y Etelvina por enseñarme que todo se puede alcanzar y cumplir con perseverancia y amor. Gracias a mi querido Johnny por entender mi dedicación, brindarme su amor y apoyo incondicional. A mis queridos hermanos Yuliana, Eibar y Arbey, por impulsar mis anhelos e ilusión en cada etapa a cumplir.

Infinitos agradecimientos a la profesora Marta Quicazán por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por dirigir mi tesis y brindarme su experiencia para mi formación profesional donde se incentivó a la investigación. De igual manera a la profesora Cristina por acompañarme desde Cali y compartirme su conocimiento y tiempo.

Agradezco a Colciencias por su apoyo en el proyecto desarrollado.

Infinitas gracias a Carlos Zuluaga por compartir su conocimiento y dedicarme parte de su tiempo y a mi amiga Lizeth por su apoyo constante como profesional y persona.

A todos mis amigos de Maestría y compañeros de laboratorio por lograr compartir y aprender de cada uno su experiencia, en especial a Elkin por su apoyo al inicio de mi posgrado, de igual manera a Ibeth, Juan Fernando, Daniel y a todo el personal ICTA por su acogimiento y en especial a Andrea, Carolina, Gregorio, Esperanza, y Edgar por su apoyo para culminar mi tesis.

Finalmente, pasar por la Universidad Nacional de Colombia deja una huella marcada de conocimiento y liderazgo para poder contribuir en el desarrollo del país.





## Resumen

El polen es un recurso fundamental para la nutrición de las abejas; estos insectos lo recolectan de las flores y lo portan a la colmena (polen apícola), donde inducen un proceso fermentativo en el que se involucran bacterias ácido lácticas (pan de abejas); el carácter nutricional de este producto permite considerar el polen apícola como una interesante alternativa sustentable para alimentación humana. En este trabajo se aplicaron pretratamientos térmicos, alcalinos y enzimáticos al polen apícola y se determinó su efecto sobre la composición, las propiedades nutricionales y la estructura física. Posteriormente se indujo una fermentación láctica con cultivos estériles probióticos (un cultivo mixto y dos cultivos puros), y se efectuó seguimiento de la acidificación, la biomasa, los antioxidantes, los ácidos orgánicos, entre otros. Todos los pretratamientos mostraron incremento en la digestibilidad del polen, desde un 62% a niveles entre 85% y 98%, resultado concordante con los cambios microestructurales revelados con micrografías. La fermentación con *Lactobacillus acidophilus* en el polen con pretratamiento térmico húmedo presentó las mejores características nutricionales.

**Palabras clave:** Pan de abejas, Bacterias lácticas, Digestibilidad, Cultivos Probióticos

## Abstract

Pollen is an essential resource for bees nutrition, these insects collect it from flowers and then they carry it to the hive (bee pollen) where they start a fermentation process in which there are involved lactic-acid bacteria (bees bread); the nutritional character of this product allows to have in consideration the bee pollen as an interesting choice to human nutrition. In this process, alkaline and enzymatic thermal pretreatments were applied to the bee pollen and it was determined their effect over its composition, nutritional properties and physical structure. Later on a lactic fermentation was induced with probiotic-starter cultures (a mixed culture and two pure cultures), monitoring its acidification, biomass, antioxidants, organic acids among others. All the pretreatments shown and increase in the digestibility of pollen from a 62% to levels between 85% and 98%, concordant results with the microstructural changes revealed with micrografies. The fermentation obtained with *Lactobacillus Acidophilus* in pollen with a humid thermal pretreatment, shown better nutritional characteristics.

**Keywords:** Bee bread, lactic bacteria, digestibility, probiotic cultures

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y Abreviaturas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Capítulo 1: MARCO REFERENCIAL</b> .....	<b>5</b>
1.1 Polen apícola.....	5
1.1.1 Estructura del polen.....	6
1.1.2 Composición del polen .....	6
1.1.3 Normatividad del polen apícola.....	11
1.2 PRETRATAMIENTOS .....	12
1.2.1 Pretratamientos térmicos.....	13
1.2.1.1 Pretratamiento térmico calor seco .....	13
1.2.1.2 Pretratamiento térmico calor húmedo.....	14
1.2.2 Pretratamiento enzimático .....	15
1.2.3 Pretratamiento alcalino .....	15
1.3 FERMENTACIÓN .....	16
1.3.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	17
1.3.2 Principales grupos .....	19
1.3.3 Probióticos .....	21
1.3.4 Tipos de cultivos lácticos comerciales .....	22
1.3.5 Fermentación ácido láctica .....	23
1.3.6 Recuento celular de las bacterias ácido lácticas.....	23
1.3.7 Fermentación láctica en matrices vegetales .....	23
<b>2. Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
2.1 Materia prima.....	29
2.1.1 Polen Apícola .....	29
2.1.2 Cultivos lácticos.....	30
2.2 Metodologías analíticas empleadas en el monitoreo de los experimentos. ....	30
2.2.1 Análisis de propiedades fisicoquímicas .....	30
2.2.1.1 Determinación de pH y acidez total .....	30
2.2.1.2 Determinación de grasa por extracto etéreo.....	30

XII Evaluación de pretratamientos en el polen apícola como alternativa de adecuación para un sustrato de fermentación láctica.

---

2.2.1.3	Determinación del contenido de proteína total por el método Kjeldahl	31
2.2.1.4	Determinación de ácidos orgánicos	31
2.2.1.5	Determinación de azúcares	31
2.2.2	Análisis de propiedades nutricionales, antioxidantes y bioactivas	32
2.2.2.1	Determinación de digestibilidad por pepsina <i>in vitro</i>	32
2.2.2.2	Determinación de proteínas (Método de Bradford)	32
2.2.2.3	Preparación del extracto para antioxidantes	32
2.2.2.4	Determinación de la capacidad antioxidante por medio del método TEAC (decoloración del catión radical ABTS)	33
2.2.2.5	Determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)	33
2.2.2.6	Determinación de fenoles totales por método de FOLIN – CIOCALTEU33	33
2.2.2.7	Perfil de aminoácidos	34
2.2.2.8	Determinación de ácidos grasos	34
2.2.3	Análisis de propiedades microbiológicas	35
2.2.3.1	Determinación del recuento de células viables en las bacterias ácido lácticas (BAL)	35
2.2.4	Análisis de la estructura del polen	36
2.2.4.1	Tinción morfológica del polen	36
2.2.4.2	Microscopía electrónica de barrido (MEB)	36
2.3	Ensayos preliminares	36
2.4	Pretratamientos	37
2.4.1	Adecuación del polen	37
2.4.2	Pretratamiento térmico calor seco	37
2.4.3	Pretratamiento térmico calor húmedo	38
2.4.4	Pretratamiento enzimático	39
2.4.5	Pretratamiento alcalino	40
2.5	Fermentación del polen	41
2.6	Metodología estadística	42
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3: Resultados y Discusión</b>	<b>43</b>
3.1	Caracterización del polen apícola	43
3.2	Ensayos preliminares	44
3.3	Evaluación de pretratamientos	46
3.3.1	Disponibilidad de nutrientes del polen apícola	46
3.3.2	Estimación estadística de las variables evaluadas en los pretratamientos de forma conjunta	49
3.3.3	Tinción morfológica del polen	51
3.3.4	Morfología del polen sin tratar y pretratado mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)	52
3.4	Fermentación láctica del polen apícola con diferentes pretratamientos	54
3.4.1	Indicadores de proceso en la fermentación con <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205, para el polen con pretratamiento térmico seco.	54
3.4.2	Indicadores de proceso en la fermentación con <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205, para el polen con pretratamiento térmico húmedo.	60
3.4.3	Indicadores de proceso en la fermentación con <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205, para el polen con pretratamiento enzimático.	64

3.4.4	Indicadores de proceso en la fermentación con <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y <i>Yomix@205</i> , para el polen con pretratamiento alcalino.	69
3.5	Estimación estadística para el polen fermentado con los diferentes cultivos.	71
3.6	Estimación estadística para comparar el polen sin tratar, pretratado y fermentado a las 21 horas de forma conjunta.	75
3.7	Morfología del polen fermentado con <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y <i>Yomix@205</i> mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).	77
<b>4</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones</b>	<b>79</b>
4.1	Conclusiones	79
4.2	Recomendaciones	80
4.3	Socialización de resultados	81
<b>A.</b>	<b>Anexo: Especificaciones de los cultivos lácticos utilizados (Danisco).</b>	<b>83</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Curvas de calibración actividad antioxidante y fenoles.</b>	<b>90</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Curvas de calibración aminoácidos y ácidos grasos.</b>	<b>91</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo: Especificaciones de la enzima Protamex.</b>	<b>92</b>
<b>E.</b>	<b>Anexo: ESTADÍSTICA</b>	<b>95</b>
<b>F.</b>	<b>Anexo: Datos de ácidos orgánicos durante la fermentación del polen por HPLC.</b>	<b>98</b>
<b>G.</b>	<b>Anexo: CROMATOGRAMAS</b>	<b>100</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>113</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1-1. Curva de crecimiento de las bacterias. 1) Fase de latencia o de adaptación. 2) fase logarítmica o exponencial 3) fase de transición 4) fase estacionaria. ....	18
Figura 1-2. Fermentación láctica homofermentativa.....	19
Figura 1-3. Fermentación láctica heterofermentativa.....	20
Figura 2-1. Procedimiento pretratamiento térmico calor húmedo .....	38
Figura 2-2. Procedimiento hidrolisis enzimático .....	39
Figura 2-3. Procedimiento pretratamiento alcalino .....	40
Figura 3-1. Comportamiento del pH y la acidez como ensayo preliminar de fermentación con el cultivo <i>Bifidobacterium lactis</i> .....	45
Figura 3-2. Comportamiento del pH y la acidez como ensayo preliminar de fermentación con el cultivo <i>L.acidophilus</i> .....	45
Figura 3-3. Comportamiento del pH y la acidez como ensayo preliminar de fermentación con el cultivo mixto Yomix@205. ....	45
Figura 3-4. Comparación de digestibilidad para polen seco sin pretratamiento y polen pretratado. ....	47
Figura 3-5. <i>Score plot</i> y <i>Loading plot</i> de los Componentes Principales (PCA) de las variables evaluadas en los diferentes pretratamientos .....	50
Figura 3-6. Micrografías con un aumento de 100X de la estructura de polen apícola sin pretratamiento y con pretratamientos.....	51
Figura 3-7. Micrografías con un aumento de 2000X y 1000X de la estructura de polen apícola sin pretratamiento y con pretratamientos, por medio de Microscopía Electrónica de Barrido. ....	53
Figura 3-8. Comportamiento del pH del polen con pretratamiento térmico seco, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205 .....	55
Figura 3-9. Morfología los cultivo puros a) <i>Lactobacillus acidophilus</i> y b) <i>Bifidobacterium Lactis</i> y el cultivo mixto c) Yomix@205, mediante tinción de Gram.....	56
Figura 3-10. Producción de ácido láctico para el polen con pretratamiento térmico seco sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205. ....	57
Figura 3-11. Comportamiento del pH para el polen con pretratamiento térmico húmedo, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205. ....	61

---

Figura 3-12. Producción de ácido láctico para el polen con pretratamiento térmico húmedo sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	63
Figura 3-13. Comportamiento del pH del polen con pretratamiento enzimático, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	65
Figura 3-14. Producción de ácido láctico para el polen con pretratamiento enzimático sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	67
Figura 3-15. Comportamiento del pH del polen con pretratamiento alcalino, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	70
Figura 3-16. Análisis de perfiles para el pH y acidez del polen fermentado con <i>Bifidobacterium Lactis</i> .....	72
Figura 3-17. Análisis de perfiles para el pH y acidez del polen fermentado con <i>L.acidophilus</i> .....	73
Figura 3-18. Análisis de perfiles para el pH y acidez del polen fermentado con Yomix@205.....	74
Figura 3-19. Análisis de decisiones por técnicas de ordenamiento para el polen sometido a diferentes pretratamientos y fermentado con el cultivo <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	75
Figura 3-20. <i>Score plot</i> y <i>Loading plot</i> de los Componentes Principales (PCA) para el polen sometido a diferentes pretratamientos y fermentado a las 21 horas. ....	76
Figura 3-21. Micrografías con un aumento de 2000X sobre los cambios estructurales del polen fermentado, por medio de Microscopía Electrónica de Barrido. ....	77

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1-1. Aminoácidos presentes en la proteína del polen seco (Lesser, 1987) .....	8
Tabla 1-2. Contenido de vitaminas en el polen apícola (Bogdanov, 2012; Oliveira, 2006).9	
Tabla 1-3. Parámetros fisicoquímicos del polen apícola en diferentes países (Fuenmayor, Zuluaga, 2014).....	10
Tabla 1-4. Resumen de los requisitos fisicoquímicos para el polen apícola según Legislación de Argentina, Brasil y México (Coronel <i>et al.</i> , 2004; Instrução, 2001; NMX-FF-094-SCFI, 2008) .....	12
Tabla 1-5. Principales características de las bacterias ácido lácticas asociadas con las fermentaciones de productos vegetales (Montaño, 2010) .....	19
Tabla 1-6. Microorganismos que se consideran como probióticos (Caicedo, 2010) .....	21
Tabla 2-1. Metodología empleada para la evaluación de propiedades fisicoquímicas del polen.....	29
Tabla 2-2. Metodología empleada para la evaluación de propiedades microbiológicas del polen.....	30
Tabla 2-3. Condiciones experimentales empleadas para los ensayos preliminares de fermentación del polen.....	36
Tabla 2-4. Condiciones experimentales empleadas en los ensayos de fermentación del polen.....	41
Tabla 3-1. Caracterización fisicoquímica del polen seco empleado en el estudio.....	43
Tabla 3-2. Caracterización microbiológica del polen seco empleado en el estudio .....	44
Tabla 3-3. Comparación de proteína, capacidad antioxidante y fenoles totales para polen sin pretratamiento y pretratado. ....	48
Tabla 3-4. Comportamiento de la acidez libre (%) del polen con pretratamiento térmico seco, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205. ....	54
Tabla 3-5. Recuento de células viables del polen pretratado térmico seco y fermentado con <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	55
Tabla 3-6. Perfil de azúcares para el polen con pretratamiento térmico seco sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205. ....	57
Tabla 3-7. Valores de proteína, digestibilidad, capacidad antioxidante y fenoles, para el polen fermentado con los tres cultivos después de aplicar pretratamiento térmico seco. 58	
Tabla 3-8. Perfil de aminoácidos para el polen con pretratamiento térmico seco, y fermentado con <i>L.acidophilus</i> a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas. ....	59



---

Tabla 3-9. Composición de ácidos grasos para el polen con pretratamiento térmico seco, y fermentado con <i>L.acidophilus</i> a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas.....	60
Tabla 3-10. Comportamiento de la acidez libre del polen con pretratamiento térmico húmedo, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	61
Tabla 3-11. Recuento de células viables del polen con pretratamiento térmico calor húmedo, fermentado con <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	62
Tabla 3-12. Perfil de azúcares para el polen con pretratamiento térmico calor húmedo sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> - Yomix@205 .....	63
Tabla 3-13. Capacidad antioxidante y fenoles en el polen con pretratamiento térmico calor húmedo, fermentado con <i>L.acidophilus</i> - Yomix@205. ....	64
Tabla 3-14. Comportamiento de la acidez libre del polen con pretratamiento enzimático, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	64
Tabla 3-15. Recuento de células viables del polen pretratado enzimáticamente y fermentado con <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	65
Tabla 3-16. Perfil de azúcares para el polen con pretratamiento enzimático sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205. ....	66
Tabla 3-17. Valores de proteína, digestibilidad, capacidad antioxidante y fenoles, para el polen fermentado con los tres cultivos después de aplicar pretratamiento enzimático. ..	67
Tabla 3-18. Perfil de aminoácidos para el polen con pretratamiento enzimático, y fermentado con <i>L.acidophilus</i> a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas.....	68
Tabla 3-19. Composición de ácidos grasos para el polen con pretratamiento enzimático, y fermentado con <i>L.acidophilus</i> a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas.....	69
Tabla 3-20. Comportamiento de acidez libre del polen con pretratamiento alcalino, sometido a fermentación con diferentes cultivos <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	70
Tabla 3-21. Recuento de células viables del polen con pretratamiento alcalino, fermentado con <i>L.acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> y Yomix@205.....	71

## Lista de Símbolos y Abreviaturas

### Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
<i>kg</i>	Kilogramo
<i>g</i>	Gramo
<i>mg</i>	Miligramo
<i>mM</i>	Milimolar

### Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
$\beta$	Beta
$\mu$	Micro
$\alpha$	Alfa

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>BAL</i>	Bacterias ácido lácticas
<i>UFC</i>	Unidades Formadoras de Colonia
<i>MRS</i>	Man Rogosa Sharpe
<i>FRAP</i>	Ferric Reducing Antioxidant Power
<i>ABTS</i>	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6sulfónico

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>TEAC</i>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
<i>HPLC</i>	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
<i>PCA</i>	Análisis de componentes principales



# Introducción

La apicultura es una actividad que aprovecha los recursos vegetales de manera amigable con el ambiente y la biodiversidad, que debería ser valorada al lograr contribuir a la seguridad alimentaria y a la economía campesina del país de manera sustentable, mediante la producción de miel, polen y otros productos de la colmena (Thomas & Rodríguez, 2012), en particular las abejas presentan un rol importante en el mantenimiento de la biodiversidad de las plantas puesto que aseguran la reproducción y la diversidad genética mediante la polinización cruzada (Saavedra, Kelina, Rojas, Delgado & Guillermo, 2013).

En el año 2006 se reportó 2.100 apicultores y 40.000 colmenas para Colombia. Esta distribución ha permitido la creación de la Federación Nacional de Apicultores de Colombia (FENAPICOL) en el año 2004 e impulsó la Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura (CPAA) en el país al aprobarse la Resolución 282 emitida por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, desde el año 2012 (Martínez, 2006).

De hecho el polen es un importante producto apícola con alto potencial de comercialización en Colombia; la posición geográfica y las condiciones climáticas, botánicas y biodiversidad de este país, proporcionan un elevado potencial para la cría abejas, con los consecuentes beneficios económicos y sociales (LABUN, 2006; Martínez, 2006); la zona Altoandina de Boyacá es catalogada como la zona de mayor producción de polen en Colombia respecto a otros sectores del país: Santander, Cundinamarca, Sucre, Magdalena, Antioquia, Cauca y Huila (Martínez, 2006).

La Cadena Productiva de las Abejas y la Apicultura – CPAA, instauró el Plan estratégico de acción 2011-2025 (CPAA, 2011), que busca el reconocimiento del potencial y la problemática del sector apícola, mediante la identificación de amenazas, debilidades, fortalezas y oportunidades para productores y consumidores; adicionalmente, tiene proyectado para el 2015 un crecimiento del 5% en la producción de polen con índices de 38 kg/colmena/año; para el 2025 se proyecta un incremento del 8% con promedio de 40 kg/colmena/año. Los lineamientos de la Política Nacional de Competitividad y Productividad considera la sostenibilidad ambiental como factor de competitividad, factor necesario para el cumplimiento de normas, regulaciones ambientales y promover procesos productivos e impulsar el desarrollo de oportunidades de negocio (Martínez, 2006; CONPES 3527, 2008). En este sentido, el Plan Estratégico estableció convenios con diferentes actores de la CPAA, para promover el desarrollo competitivo a través de diferentes estrategias que fortalezca la producción, la comercialización y la investigación.

Estos convenios favorecen a los apicultores de Colombia, por las nuevas tendencias en el mercado hacia el consumo de alimentos naturales y saludables (Kroyer & Hegedus, 2001). De hecho podrían ser una alternativa para las personas que buscan una buena fuente de proteína, grasas, vitaminas, minerales y antioxidantes (Mesa, Valencia, 2015). Este momento de cambio en el comportamiento alimentario de las personas, ha aumentado el interés de la industria, los legisladores y las universidades en investigar y desarrollar nuevos productos con ventajas nutricionales que afecte positivamente la salud de las personas y logren satisfacer a los nuevos consumidores (Cóccaro, 2010). Algunos países como Brasil presenta una regulación en la que define de manera formal al alimento funcional como un “componente alimenticio nutritivo o no, que puede producir efectos benéficos para la salud, diferentes de la nutrición básica cuando forman parte de una dieta normal sin ser un medicamento”(Cóccaro, 2010); en consecuencia la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria Brasileira rige la seguridad y eficacia de los componentes alimenticios para su distribución (Sarmiento, 2006).

Sin embargo, algunos estudios reportan que el polen no es fácilmente digerible en su estado original, debido a su pared celular externa que se caracteriza por ser muy resistente, elástica y firme, e impide que los compuestos nutricionales sean digeribles, al presentar una baja absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal en el ser humano y las abejas (Hesse, Halbritter, Zetter, Weber, Buchner, Frosch-Radivo, *et al.*, 2009).

De hecho, destacan que las abejas no presentan en el sistema digestivo enzimas capaces de degradar el polen, razón por la cual la colonia no lo consume en su estado fresco; las abejas obreras almacenan el polen recolectado en celdas como una materia prima, la cual es combinada con capas delgadas sucesivas de miel, y bajo el efecto de microorganismos y enzimas presentes en las secreciones salivares y gastrointestinales de las abejas, lo convierten en un producto comestible, conocido como “pan de abejas”, que constituye el alimento, fuente de nitrógeno, tanto para las larvas como para las abejas adultas (Gilliam, 1979). Al mejorar el potencial de asimilación de los nutrientes en el organismo, por acción de las enzimas ( $\beta$ -glucosidasa) transforman los compuestos grandes como polisacáridos y carbohidratos en compuestos de menor peso molecular que facilitan la digestión del pan de abeja, al aumentar la solubilidad de las proteínas entre 2,9-5,6% (Gilliam, 1979; Jean-Prost, 2007; Loper & Standifer, 1980; Seeley, 2006).

Las condiciones peculiares existentes en Colombia para la producción de polen apícola ha motivado el desarrollo de diversos trabajos de investigación tendientes a aprovechar este recurso. La universidad Nacional de Colombia y el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA), desarrollaron el proyecto *Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales*, financiado por COLCIENCIAS (Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación); al buscar mejorar las condiciones de obtención, almacenamiento y transformación del polen apícola para su empleo como recurso alimenticio con carácter funcional que impulse a los apicultores de Colombia.

Con el propósito de planear alternativas tendientes a aprovechar el potencial nutricional y la alta producción de polen apícola en el Altiplano Cundiboyacense, mediante el desarrollo de bioprocesos, el presente trabajo abordó el estudio de la aplicación de diferentes pretratamientos al polen seco, que permitan afectar su estructura física, de modo que pudiera ser empleado como sustrato de fermentación láctica. Siguiendo como base, el modelo natural que realizan las abejas en la colmena para su sustento, se pretendió ampliar las posibilidades del polen apícola en la alimentación humana, con criterios de sustentabilidad, con los consiguientes beneficios ambientales, económicos y sociales.

Se parte de la transformación del polen apícola mediante pretratamientos térmicos, enzimático y alcalino; se logró probar un incremento en la digestibilidad debido a la ruptura o degradación de la pared externa, efecto que fue posible evidenciar mediante microscopia. La ruptura generó una liberación de nutrientes, que le confiere características adecuadas para ser empleado como sustrato de fermentación, mediante el empleo de cultivos starter. Y a través de la evaluación de pH, acidez, biomasa, antioxidantes, ácidos orgánicos y proteína fue posible diferenciar los mejores tratamientos.

Los logros que se alcanzaron en esta tesis, son de gran importancia en el proceso de industrialización que viene desarrollándose en Colombia en cuanto al aprovechamiento del polen apícola en la alimentación humana.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Evaluar diferentes alternativas de pretratamientos en la adecuación del polen apícola como sustrato de fermentación láctica.

### Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de los pretratamientos enzimáticos, térmicos y químicos, a través de los cambios microestructurales del polen apícola.
- Evaluar la efectividad de los cultivos lácticos para inducir una fermentación del polen pretratado a través de las características fisicoquímicas y bioactivas.



# 1. Capítulo 1: MARCO REFERENCIAL

La palabra “polen” deriva del griego: “pale”, que a la vez designaba la harina y el polvo polínico. De la misma raíz nace la palabra “palinología”, que corresponde al estudio científico de los granos de polen, que se caracterizan por ser una multitud de cuerpos microscópicos (de 20 a 40 micrones como promedio), de forma esférica u oval, contenidos en los sacos polínicos de la antera de la flor. El polen es la estructura reproductiva masculina de las plantas superiores (Del Risco, 2002; Saavedra *et al.*, 2013). El polen fue reconocido por el hombre desde la más remota antigüedad. A finales del siglo XIX el estudio morfológico del polen había alcanzado un gran desarrollo, sobre todo al diferenciar 2.200 tipos diferentes de polen con base en la exina y a los lugares de salida del tubo polínico (Ortiz, Dilia, Cogua, 1989).

La acción del polen apícola sobre el organismo humano ha sido estudiada desde 1950; desde entonces se reconocían el efecto benéfico en el ser humano, como regulador de las funciones intestinales para personas con problemas de estreñimiento crónico, en caso de diarreas crónicas, o en niños que presentan anemia; su acción se relaciona con una elevación rápida de la tasa de hemoglobina en la sangre, con una consecuente mejora en el crecimiento en niños y una actividad cerebral estimulada (Jean-Prost, 2007).

## 1.1 Polen apícola

El polen es el gametofito masculino de las plantas superiores (gimnospermas y angiospermas); en las gimnospermas es producido en microesporangios o conos masculinos y en las angiospermas es producido en las anteras de las flores indispensable para fecundar los óvulos.

Los apicultores cosechan el polen apícola de las colmenas a través de trampas de recolección al obligar a las abejas pecoreadoras a pasar por la trampa con una rejilla de malla pequeña a fin de desenganchar el polen de las patas posteriores, que luego cae a un recipiente situado debajo de la trampa (Saavedra *et al.*, 2013). Es imprescindible el vaciado diario de los cajones con la cosecha, ya que, al permanecer húmedo, el polen puede fermentar rápidamente. Esta forma de recolectar el polen, no perjudica el buen desarrollo de las colmenas (Del Risco, 2002), ya que se considera que una colmena fuerte necesita entre 10 y 20 kilos de polen por año para su desarrollo (Dussart & Bartholomé, 2007).

Después de recolectado, es necesario realizar una prelimpieza al polen mediante tamices para la remoción de impurezas (patas, antenas), debido a que con frecuencia el polen apícola comercial presenta elevados recuentos de microorganismos (mesófilos, coliformes, mohos y levaduras) (Risco-Ríos, Pérez-Piñeiro, Álvarez-Rivera, Rodríguez-Castro, Leiva-Castillo, Puig-Peña & Garcia-Neninger, 2012), se requiere aplicar un pretratamiento para disminuir la carga microbiana y cumplir con los criterios de calidad establecidos para los alimentos; es necesario secarlo inmediatamente durante 3 ó 4 h a temperatura usualmente entre 40 y 50 °C, hasta alcanzar una humedad 5-6%. Posteriormente es necesario realizar una nueva limpieza, de impurezas macroscópicas (Zuluaga, Durán & Díaz, 2012).

### **1.1.1 Estructura del polen**

Los granos de polen, están compuestos por una pared externa muy resistente química y físicamente, llamada exina o esporodermis, constituida por esporopolenina que son biopolímeros como cutina (compuesta por ácidos grasos para proteger la superficie de las células), suberina (polímero de ácidos grasos de cadena larga) y lignina (compuestos fenólicos) (Zuluaga, Serrato, & Quicazán, 2014) y una pared interna llamada intina; la intina envuelve al protoplasma, es delicada, poco resistente, constituida de celulosa y pectina, es más gruesa generalmente a la altura de las aperturas. Las fibras de celulosa le permiten al grano de polen hincharse o encogerse a su deseo, lo que le concede cierta elasticidad al aplastamiento. La exina es un polímero de carotenos y ésteres, y se conserva muy bien en fósiles. Protege al polen de la desecación durante largos periodos de tiempo y evita la muerte de la célula. El grano de polen contiene tocoferoles, provitamina A, vitamina D y fitoesteroles que lo protegen contra la oxidación; contiene también selenio, mineral que lo protege de los daños ocasionados por los rayos ultravioletas (Gavarayeba, 1996).

Según algunos reportes, la morfología del grano de polen presenta distintos tipos de exina: reticular perforada (tipo común), reticular granulada y bireticular, que presentan un espesor que varía entre 0,7 y 1,9  $\mu\text{m}$  y un espesor de la intina de 0,5 a 1,2  $\mu\text{m}$  (Hülya, Sevil, Ahmet, Musa, Ferhat, Birol, Ahter, 2011).

Se consideró que la esporopolenina representa del 20 al 40% del peso del grano de polen (Bogotá & Giovanni, 2002). La degradación química de la esporopolenina en diferentes estudios, no es apreciable (Domínguez, Mercado, Quesada & Heredia, 1999).

### **1.1.2 Composición del polen**

Desde el punto de vista bioquímico y nutricional, los granos de polen pueden diferenciarse por su origen botánico y geográfico. Sin embargo, todo polen se caracteriza por ser una buena fuente de compuestos saludables: agua, hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, carotenoides, flavonoides, compuestos fenólicos, antioxidantes, carotenos y xantofilas (Jean-Prost, 2007) y sus

derivados que le confieren propiedades antioxidantes (Hernandez, 2014), considerados benéficos para la salud de las personas (Morais, Moreira, Feás, & Estevinho, 2011).

Se puede mencionar los siguientes componentes del polen:

- Agua: entre 10 y 40%
- Proteínas: 11 a 35%; se encuentran 10 aminoácidos esenciales.
- Glúcidos: 20 al 40%; azúcares, almidón, celulosa, pectina, lignina.
- Lípidos: 0,5 y 20%: materias grasas y ácido grasos.
- Minerales: 1 al 7%;K, Na, Ca, Mg, N, P, S, Al, Cu, Fe, Mn, Ni, Ti, Zn
- Resinas y esteroides
- Vitaminas: Vitamina A bajo forma de caroteno (provitamina A), Vitaminas B, C, D, y E.
- Enzimas: en particular las depositadas por las abejas (peroxidasas, poligalacturonasas, glucanasas y estereasas) en la confección de las bolitas de polen.

- **Carbohidrato o Hidratos de Carbono**

El polen contiene del 20 al 40% del peso seco en carbohidratos, constituido por polisacáridos; azúcares como fructosa, glucosa, sacarosa y especialmente lactosa, azúcar de la leche que no ha sido descubierta en otra matriz vegetal. Contiene además almidones que oscila entre 1,4 -12%, rafinosa, pentosanas, almidón, celulosa y hemicelulosa (que se localizan en la esporodermis) (Bogotá & Giovanni, 2002; Lesser, 1987).

- **Proteína**

El polen es una fuente alta de proteínas o prótidos, considerado como materia prima fundamental para la constitución de los seres vivos, animales o vegetales. El contenido de proteínas en el polen puede variar según su origen botánico, y desde el punto de vista nutricional es reconocido como una fuente de aminoácidos esenciales para la salud, considerándose una variable importante para la alimentación humana (Somerville, 2001).

En particular, el interés del polen reside en los aminoácidos que son compuestos que se caracterizan por un grupo amino y un ácido carboxílico, de los cuales se conocen diez aminoácidos indispensables para la vida incluidos los que no se sintetiza (Coronel, Grasso, Pereira & Fernández, 2004) y que deben ser aportados forzosamente en la dieta, ya que bioquímicamente no se producen en las cantidades adecuadas para el organismo, como la arginina, histidina, lisina, treonina que se caracterizan por ser hidrófilos, mientras el triptófano, fenilalanina, metionina, leucina, isoleucina y valina, se identifican por ser hidrofobo. Siendo una manera de clasificar los aminoácidos, de acuerdo a su solubilidad en agua, que depende de su capacidad de establecer puentes de hidrogeno con las moléculas de agua (Badui, 2006; Lesser, 1987).

### Funciones de los aminoácidos

- La *leucina*, es necesaria para el buen funcionamiento del páncreas, el bazo, y está presente en las glándulas salivales y linfáticas. Ejerce una acción tónica sobre los músculos y especialmente al nivel del miocardio, y de manera general contribuye a equilibrar el potencial energético del organismo.
- La *lisina*, favorece la renovación de los glóbulos rojos.
- La *valina*, fortifica la célula nerviosa, las células de las vísceras y de los músculos.
- La *isoleucina* interviene en la asimilación y en la desasimilación de las proteínas
- La arginina, es indispensable para el crecimiento; su carencia expone a la impotencia o a la frigidez y a la esterilidad.
- La *fenilalanina* activa el proceso de intervención de la vitamina C, y contribuye conjuntamente a la acción de esta vitamina, hacer el organismo más resistente a la fatiga y a las agresiones patógenas.
- La *histidina*, favorece la constitución de la sangre, más exactamente de la globina, elemento de la hemoglobina, célula apta para fijar oxígeno o el gas carbónico, debido a la presencia de los átomos ferrosos que aseguran lo esencial de la función respiratoria.
- La metionina, ácido aminado sulfurado, es indispensable para la vida, el organismo. Su carencia provoca anemia y trastornos hepáticos. Es un protector del hígado.

En la tabla 1-1, se observa que la proteína del polen contiene aminoácidos indispensables y que figuran como los reconocidos para la integridad del ser humano y que brindan beneficios (Lesser, 1987).

**Tabla 1-1.** Aminoácidos presentes en la proteína del polen seco (Lesser, 1987).

<b>Aminoácidos</b>	<b>Valor (%)</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Valor (%)</b>
Leucina	6,7 a 7,5	Treonina	2,3 a 4
Lisina	5,9 a 7	Cistina	2,3 a 3,9
Valina	5,5 a 6	Histidina	2 a 3,5
Isoleucina	4,5 a 6	Metionina	1,8 a 2,4
Arginina	4,4 a 5,7	Triptófano	1,2 a 1,6
Fenilalanina	3,7 a 4,4		

- **Lípidos**

Los lípidos existen en el polen en pequeño porcentaje con diferencias significativas según la composición de la grasa, como el origen botánico, reportándose en la literatura entre 0,5 y 20% (Bogdanov, 2012).

El polen, se distingue por ser un alimento natural, rico en lípidos, donde se ha identificado fosfolípidos, esteroides, triglicéridos, ésteres de esteroides y ceras (Lesser, 1987; Muniategui, Sancho, López, Huidobro & Simal, 2010). Adicional, se encuentra el caprílico, cáprico, laurico, tridecanoico, mirístico, pentadecílico, y en un menor porcentaje siendo inferior en un 1%, mientras los ácidos grasos eicosanoico, linoleico, behénico,tricosanoico, lignocérico, se encuentran en cantidades del 1 al 2%. En cambio el ácido palmítico, existente en todas las muestras de polen, siendo el ácido graso mayoritario en un rango del 18,2% al 40,2% (Munlategui & Simal, 1989).

- **Vitaminas**

El polen contiene vitaminas: entre ellas todas las hidrosolubles del complejo B y algunas liposolubles, que son micronutrientes esenciales para los seres humanos; actúan como coenzimas o precursores (niacina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido pantoténico, piridoxina, y cobalamina folato) e intervienen como componentes del sistema de defensa antioxidante (ácido ascórbico, algunos carotenoides y vitamina E), entre otros (Gasparotto, 2013). Se reporta el contenido de vitaminas del polen apícola en la siguiente tabla 1-2.

**Tabla 1-2.** Contenido de vitaminas en el polen apícola (Bogdanov, 2012; Oliveira, 2006).

Vitaminas	mg/kg	Vitaminas	mg/kg
β-caroteno (Provitamina A)	10 - 200	B6 - Piridoxina	2 - 7
B1-Tiamina	6 - 13	C - Ácido ascórbico	70 - 560
B2 -Riboflamina	6 - 20	H - Biotina	0,5 - 0,7
B3 -Niacina	40 -110	Ácido fólico	3 - 10
B5 - Ácido pantoténico	5 - 20	E - Tocoferol	40 - 320

Por otro lado, se presenta una comparación de las propiedades fisicoquímicas (base seca) del polen apícola entre algunos países (Fuenmayor, Zuluaga, 2014; Hernandez, 2014; Yang, Wu, Ye, Liu, Chen, 2013), y el estudio de caracterización del polen colombiano, proveniente del Altiplano Cundiboyacense (Fuenmayor, Zuluaga, 2014), representado en la siguiente tabla 1-3.

**Tabla 1-3.** Parámetros fisicoquímicos del polen apícola en diferentes países (Fuenmayor, Zuluaga, 2014).

	COLOMBIA	CHINA	ARGENTINA	BRASIL	SALVADOR	MÉXICO	POLONIA	INDIA
pH	4,6	5,0	4 - 6	4 - 6	4 - 6	4 – 6	4,5	4,3
Acidez Libre (meq-kg)	256	351	-	-	-		332	383
Humedad (g/100g)	7,7	2,0	8	4	4	4 - 8	4,0	9,1
Cenizas (g/100g)	2,5	4,3	4	4	4	1,5 – 2,2	2,6	3,3
Lípidos (g/100g)	6,9	5,2					5,7	8,0
Proteína (g/100g)	23,8	17,6	15-28	8		12 -18	25,6	26,1
Sodio (mg/kg)	99,3	125					236	113
Potasio (mg/kg)	5625	9542					5797	4794
Calcio (mg/kg)	1717	1620					1654	2376
Iron (mg/kg)	70,7	63,3					56,2	197,7
Magnesio (mg/kg)	1029	2636					1194	1430
Zinc (mg/kg)	47,4	31,4					53,2	31,3
Fibra dietaría Insoluble (g/100g)	11,7	-					5,7	12,8
Fibra dietaría soluble (g/100g)	2,7	-					2,3	1,7

### 1.1.3 Normatividad del polen apícola

En Colombia no se cuenta con una norma técnica que regule la calidad del polen apícola, por tal razón se considera algunas normas internacionales para comparar las especificaciones mínimas de calidad en cuanto a su calidad microbiológica y fisicoquímica (Risco-Ríos, Pérez-Piñeiro, Álvarez-Rivera, Rodríguez-Castro et al., 2012; Zuluaga *et al.*, 2012).

- **Argentina - Código Alimentario Argentino (artículo 785), 2003.** De acuerdo a la legislación Argentina, se ha establecido los requisitos mínimos de calidad del polen apícola, en cuanto a sus características fisicoquímicas y microbiológicas (Coronel *et al.*, 2004).
- **Brasil – Norma Brasileira, 2001.** Cuenta con un Reglamento técnico para el establecimiento y la calidad del polen apícola y propóleos desde el 19 de enero de 2001. Presenta como objetivo establecer los requisitos mínimos de calidad para el polen apícola, los requisitos fisicoquímicos del polen apícola (Instrução, 2001).
- **México – NMX-FF-094-SCFI-2008.** Productos alimenticios no industrializados para consumo humano-polen (Pollinis). Esta norma establece las especificaciones mínimas de calidad que debe cumplir el polen, que es recolectado de las flores por las abejas en cualquiera de sus presentaciones, producido y/o comercializado en territorio nacional, después de su acondicionamiento y envasado. Este reglamento es parcialmente equivalente a las normas internacionales CODEX STAN 12:1981Rev. 2 (2001) para la miel y CODEX STAN 192 para los aditivos alimentarios, adoptado en 2007 (NMX-FF-094-SCFI, 2008).
- **Chile – Norma 3255-2011.** Incluye requisitos de calidad que comprometa a las colmenas de las abejas (*Apis mellifera*) para una efectiva polinización y diferenciación del polen desde el punto de vista del origen botánico, donde realizan un ensayo palinológico que permitan conocer la fuente de recolección del polen por las abejas (NCH, 2011).

En este contexto, algunos países han mostrado interés en la producción del polen apícola por su importancia nutricional, a través de diferentes normas establecidas con el fin de comercializar un producto de mejor calidad (Hernandez, 2014). En la tabla 1-4 se compara diferentes normas de tres países.

**Tabla 1-4.** Resumen de los requisitos fisicoquímicos para el polen apícola según Legislación de Argentina, Brasil y México (Coronel *et al.*, 2004; Instrução, 2001; NMX-FF-094-SCFI, 2008).

Determinación fisicoquímica	Requisitos		
	Argentina	Brasil	México
Humedad (%)	Max. 8,0	Max. 4,0	4,5- 8,0
Azúcares totales (g azúcares/g polen)	-	14,5- 55,0	-
Cenizas (%)	Max .4,0	Max. 4,0	1,5- 2,2
Fibra cruda (%)		Min. 2,0	0,27 –0,70
Lípidos (%)		Min. 1,8	2,5- 6,5
pH	4,0-6,0	4,0- 6,0	Min. 4,0
Proteínas (%)	15-28	Min. 8,0	12- 18
Acidez libre (meq/kg polen)	-	Max. 300,0	-

## 1.2 PRETRATAMIENTOS

En algunos materiales vegetales es posible realizar una conversión eficiente de la celulosa en azúcares fermentables mediante la aplicación de pretratamientos que modifican las propiedades físicas y químicas de la pared celular (Rojas, 2011). A nivel industrial se realizan diferentes pretratamientos de tipo químico, térmico o enzimático, con el fin de aumentar la susceptibilidad del material, romper lignina y la hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa, e incrementar la porosidad de los materiales; la tecnología ideal del pretratamiento debe en lo posible, aumentar la concentración de azúcares, remover parcial o total la lignina y la hemicelulosa, disminuir la cristalinidad de la celulosa, y reducir el tamaño de las partículas del material (Buitrago, 2007).

De hecho, diferentes estudios del polen apícola reportan una pared celular externa, difícil de degradar debido a su estructura rígida y firme. Por tal razón, es necesario evaluar algunos pretratamientos aplicados a otras matrices vegetales complejas según algunos estudios, con el fin que puedan afectar esa pared celular y aprovechar sus componentes nutricionales para procesos fermentativos. No obstante, algunos de estos tratamientos pueden presentar la desnaturalización parcial o total de algunas proteínas, lo que conlleva en numerosas ocasiones a un aumento de la digestibilidad de éstas (Buitrago, 2007; Ruiz, 2010).



### 1.2.1 Pretratamientos térmicos

Aplicar algún tipo de tratamiento térmico a un alimento tiene como finalidad la destrucción de la carga microbiana, la desnaturalización de las enzimas y la destrucción de algunos componentes propios del material. La mayoría de los métodos de conservación tradicionales de alimentos están basados en tratamientos térmicos (escaldado, pasteurización o esterilización) (Geankoplis, 2006), y se expone los siguientes tratamientos térmicos:

#### 1.2.1.1 Pretratamiento térmico calor seco

Durante este pretratamiento térmico la biomasa lignocelulósica se calienta, una parte de la hemicelulosa se hidroliza y forma ácidos. Estos mismos ácidos se supone que siguen catalizando la hidrólisis de la hemicelulosa (Cortes, 2011) y que a temperaturas superiores a 150°C pueden producir ciertos compuestos fenólicos, que en algunos casos podrían tener un efecto inhibitorio sobre las bacterias (Rojas, 2011).

Rojas (2011), evaluó diferentes pretratamientos, que fueron previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma. Se encontró que al trabajar con un pretratamiento térmico a temperaturas de 146°C a 160°C presentó degradación de las fracciones hemicelulosicas, con un rendimiento de 47,8% en celulosa y lignina. Sin embargo al aplicar combinación de dos pretratamientos uno biológico y un térmico presentó una mayor recuperación del 62,9% de azúcares fermentables. Respecto a los compuestos inhibidores se detectó principalmente ácido acético y 5-hidroximetilfurfural, y no se encontró presencia de compuestos fenólicos.

Estudios resaltan que la esterilización por calor es el procedimiento más efectivo para aumentar la vida útil de los alimentos, ya que elimina todos los microorganismos vegetativos y elimina o inactiva las esporas bacterianas de forma prácticamente total. Sin embargo, la esterilización afecta negativamente a muchos nutrientes, en particular a las vitaminas termolábiles, y el valor biológico de las proteínas a causa de la pérdida de aminoácidos disponibles que tiene lugar en las reacciones de Maillard (Ruiz, 2010). Se reporta que la fracción proteica del polen contiene cantidades notables de enzimas, especialmente amilasa, invertasa, fosfatasas, transferasas así como factores coenzimáticos, como biotina, glutatión y ciertos nucleótidos (Human & Nicolson, 2006).

Fuenmayor (2009), evaluó en el polen apícola un tratamiento térmico calor seco, en estufa de circulación forzada de aire a 70°Cx15min, 80°Cx30min, 90°Cx15min y el tratamiento térmico en autoclave a 121°Cx 5, 10 y 15 minutos, encontrando que el mejor tratamiento térmico fue a 121°Cx15min . De hecho el estudio de Salazar (2014), vuelve a corroborar el tratamiento térmico a 70°Cx15 min, 70°Cx30min, 80°Cx15min y el tratamiento térmico con presión a 121°Cx15min, 115°Cx12min y 110°Cx36min, encontrando el mismo resultado de Fuenmayor (2009), al verificar índices microbiológicos satisfactorios y cambios estructurales en la capa externa del polen, al

lograr observar esta ruptura de la pared celular a través de microscopia de barrido. Se destaca que antes de aplicar el tratamiento debe emplearse adición de agua ya que al exponer esta matriz vegetal sola, presenta cambios drásticos nutricionalmente y una notoria reacción de Maillard.

### **1.2.1.2 Pretratamiento térmico calor húmedo**

Este pretratamiento consiste en impregnar el material con agua y someterlo a alta temperatura, durante unos minutos, para ser liberado el vapor y enfriar rápidamente la biomasa, lo que hace que el agua de la biomasa explote el material. Este pretratamiento tiene como objetivo solubilizar principalmente la hemicelulosa para tener mejor acceso a la celulosa (Cortes, 2011).

El fin es solubilizar la fracción de la hemicelulosa como oligosacáridos líquidos solubles para hacer la celulosa más asequible y evitar formación de inhibidores. Entre las ventajas que presenta este pre-tratamiento se encuentra que no emplea ningún catalizador, pero es necesario utilizar presión para mantener el agua en estado líquido a temperaturas elevadas. Se ha reportado que tiene un gran potencial para remover la hemicelulosa, mientras que minimiza la hidrólisis de la celulosa y las reacciones de degradación de azúcares. Por ejemplo se podría lograr remover hasta el 80% de la hemicelulosa y mejora la digestibilidad enzimática de materias primas pre-tratadas como fibra de maíz, bagazo de caña de azúcar y paja de trigo (Rojas, 2011).

Este pretratamiento presenta la ventaja que se usa agua y no ácidos donde se reduce los riesgos en términos de costos, seguridad de la planta y sostenibilidad ambiental. Este proceso se considera autohidrólisis, utiliza agua caliente a presión superior a la atmosférica; la temperatura puede alcanzar hasta los 230°C y, el tiempo de reacción puede variar desde unos segundos hasta horas (Rojas, 2011).

Por consiguiente, en el estudio de Gonzalez (2000), evaluó el efecto de dos tratamientos térmicos húmedos (hervor prolongado y olla presión), en caraotas negras y lentejas, utiliza 500 g de muestra para cada uno de los tratamientos. Para el hervor prolongado manejo 125 min para caraotas y 30 min para lentejas, mientras en la olla presión manejo 10 min para caraotas y 7 min para las lentejas. Concluyendo que cualquiera de los tratamientos térmicos, ocasionó un aumento considerable en el contenido de Fibra dietética total y rompimiento de sus componentes (celulosa, hemicelulosa, lignina) (Gonzalez & Gisell, 2000).

Otro estudió, evaluó el efecto de dos tratamientos térmicos (hervido y cocinado al vapor) sobre los fitoquímicos de zanahoria, coliflor y espinaca. Encontró como resultado que la ebullición produjo un mayor efecto sobre el contenido de carotenoides, clorofilas, ácido ascórbico y fenoles en comparación con el cocinado al vapor (Mazzeo, 2011).

### 1.2.2 Pretratamiento enzimático

Las enzimas se clasifican de acuerdo al tipo de reacción que catalizan y el nombre hace referencia al sustrato, por ejemplo las hidrolasas rompen un enlace y aumenta una molécula de agua, las isomerasas catalizan reacciones de interconversión de isómeros (Tutt, Kikas & Olt, 2012). Las enzimas pueden actuar como biocatalizadores en las reacciones químicas que tienen lugar en el interior de las células de organismos vivos, por tanto, su actividad catalítica se desarrolla en las condiciones de un medio de reacción biológico, además actúa en pequeña cantidad y se recupera indefinidamente. Su actividad catalítica se caracteriza por: tener lugar en condiciones suaves de temperatura y pH, son altamente específicas hacia un sustrato o hacia sustratos muy similares desde el punto de vista químico, la velocidad de reacción es muy alta (Avilez, 2009; Prieto, 2007).

La hidrólisis, se puede llevar a cabo con diferentes enzimas, al producir la degradación de lignocelulosa, los factores que afectan la tasa de la hidrólisis enzimática es la accesibilidad de las fibras de las celulosas por las enzimas, la cristalinidad de la celulosa, la hemicelulosa, y el contenido de lignina. Por lo tanto, la eliminación de la lignina y la hemicelulosa, así como el aumento de la porosidad durante el proceso de un pretratamiento aumenta la velocidad de hidrólisis significativamente (Tutt et al., 2012) al liberar azúcares que pueden ser aprovechados como fuente de carbono para una fermentación por parte de las bacterias (Fuenmayor, 2009).

En el estudio de Juárez, (2010), comparó el uso de diferentes enzimas comerciales *Protamex*, *Neutrassa* y *Alcalasa*, en la preparación de quitina de desperdicios de camarón. Los resultados obtenidos mostraron que la enzima *Protamex* fue la de mejor proceso para hidrolizar la proteína de la quitina en comparación a las otras enzimas comerciales.

Otra investigación en productos de la colmena que evalúan un hidrolizado con diferentes enzimas comerciales *Protamex*, *Suberose* y *Viscoflow*. Encontró que la hidrólisis enzimática presentó cambios significativos con el aumento en el contenido de proteína, actividad antioxidante, el contenido de fenoles y flavonoides totales, siendo un producto con mejores características bioactivas comparado con el polen apícola sin tratamiento enzimático (Castro, Zuluaga, Quicazan, 2014).

### 1.2.3 Pretratamiento alcalino

El pretratamiento alcalino consiste en la solubilización de la hemicelulosa y parte de la lignina. La remoción de la hemicelulosa tiene un efecto positivo sobre la degradabilidad de la celulosa, durante el pretratamiento alcalino las primeras reacciones que tienen lugar son la solvatación y saponificación. Esto provoca que la biomasa se expanda, haciendo más accesible a las enzimas y bacterias. Sin embargo se debe tener en cuenta que altas concentraciones alcalinas, ocurrirá una hidrólisis que conllevaría a la degradación y descomposición de polisacáridos (Cortes, 2011).

En este sentido, se destaca que las ventajas de emplear un pretratamiento alcalino es solubilizar la hemicelulosa y la lignina, y mejorar la digestibilidad enzimática de los polisacáridos y lograr una posible conversión de azúcares reductores. Sin embargo, como desventaja puede ser objeto de reacciones hidrolíticas y compuestos como hidroximetil furfural que pueden inhibir una fermentación (Cortínez, 2010; López, Cárdenas & Zambrano, 2013).

El estudio de Tutt *et al* (2012), evaluó pretratamientos con ácidos (ácido sulfúrico, ácido nítrico) y alcalinos (NaOH, KOH y Ca (OH)<sub>2</sub>), con temperaturas entre 120-180 °C, en la paja de trigo, para ser llevada a una hidrólisis enzimática, con el fin de convertir la celulosa y hemicelulosa en azúcares fermentables, finalmente las muestras fueron fermentadas con levadura *Saccharomyces Cerevisiae*. Como resultado, encontró que el pretratamiento con álcali fue el de mejor rendimiento de etanol que el pretratamiento con ácido diluido, destacando al pretratamiento con KOH, esto es debido a una mejor eficiencia de la fermentación, porque se evita la formación de subproductos inhibidores.

### 1.3 FERMENTACIÓN

La fermentación es la transformación de una sustancia orgánica (generalmente un carbohidrato) en otra utilizable, producida mediante un proceso metabólico por microorganismos o por enzimas que provocan reacciones de oxidación-reducción, de las cuales el organismo productor deriva la energía suficiente para su metabolismo, las fermentaciones pueden ser anaeróbicas, si se producen fuera del contacto con el aire, o aeróbicas, que sólo tienen lugar en presencia de oxígeno (Lucas, 2009).

Este proceso se identifica por ser económico y sencillo que causa cambios químicos y modifica la funcionalidad de los alimentos debida a la acción de los microorganismos y/o enzimas que genera cambios en dicho proceso y como consecuencia mejora el valor nutricional, aumenta la vida útil de algunos alimentos y se modifica las propiedades sensoriales. Sin embargo, los cambios que se producen en los alimentos fermentados dependen de las condiciones de la fermentación en cada alimento (Buitrago, 2007).

El desarrollo de las tecnologías de fermentación se presenta a través de la historia. Se piensa que el consumo de alimentos fermentados se inicia por los cazadores recolectores con un consumo de fruta fresca y en momentos de escases tendrían que adquirir frutos fermentados. El pan probablemente se originó en Egipto hace más de 3.500 años; varios panes triangulares fueron encontrados en tumbas antiguas. La fermentación de la leche se evidencia en muchos lugares con pruebas de productos fermentados usados en Babilonia hace más de 5.000 años. Mientras en China, se cree que se originó con las verduras fermentadas (Battcock, Azam-Ali, 1998).

La fermentación es considerada un método de conservación de los alimentos, una tecnología ampliamente practicada y antigua. La fermentación se asegura no sólo

aumento de la vida útil y la seguridad microbiológica de un alimento sino también que sean más digeribles ciertos alimentos, por ejemplo el caso de la yuca fermentada reduce la toxicidad del sustrato. Las bacterias ácido lácticas, debido a sus características en el metabolismo, están implicadas en muchos procesos de fermentación de la leche, carnes, cereales y verduras. Para asegurar la repetibilidad de los procesos y la calidad de los productos, muchas fermentaciones son tradicionalmente dependientes de la inoculación de unos cultivos iniciadores, insumos disponibles para los procesos comerciales tales como la fabricación de queso, yogurt y pan (Caplice & Fitzgerald, 1999).

En la industria de alimentos es muy común la fermentación para la elaboración de productos de panadería (fermentación por levaduras). Los encurtidos vegetales y los ensilados se obtienen por fermentación no alcohólica. La fermentación alcohólica se aplica en productos como vino (fermentación alcohólica y maloláctica), la cerveza, los destilados y el vinagre (transformación de alcohol en ácido acético); la fermentación láctica también sucede en productos cárnicos como los embutidos crudos curados (salame, chorizo español, entre otros). La fermentación láctica es útil en la obtención de leches fermentadas en general, en el yogur (fermentación de leche con microorganismos acidificantes, como *Lactobacillus*), quesos (fermentación con determinados cultivos bacterianos inoculados) y bebidas lácticas alcohólicas (Kefir). Actualmente se están desarrollando nuevos productos fermentados como salsa de soya, miso, tofu, entre otros (Lucas, 2009).

### 1.3.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL, desde la antigüedad han sido aisladas de alimentos fermentados, animales y humanos para ser utilizadas en la producción de ácido láctico y como cultivos iniciadores en la elaboración de vegetales, cárnicos y productos lácteos fermentados. La mezcla de cepas ha sido propuesta como una buena alternativa para satisfacer ciertas necesidades y se ha encontrado potencial de uso en la producción de alimentos de ácido láctico, la producción de alimentos prebióticos, el mejoramiento de la eficiencia de transformación de azúcares en forrajes ensilados, entre otros (Serna, Rodríguez de Stouvenel, 2005).

Las BAL, son microorganismos Gram positivos productores de ácido láctico como principal producto metabólico a partir de carbohidratos (Reddy, Altaf, Naveena, Venkateshwar & Kumar, 2008). Son anaerobias facultativas, catalasa negativa, y no formadoras de esporas. Desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación en la industria alimentaria, gracias a su acción no patógena, su habilidad para acidificar y preservar los alimentos; adicionalmente, tienen la capacidad de mejorar la textura, sabor, olor y aroma de alimentos. Mantienen apreciable su viabilidad, resisten bajos pH y la presencia de ácido láctico (Parra, 2010).

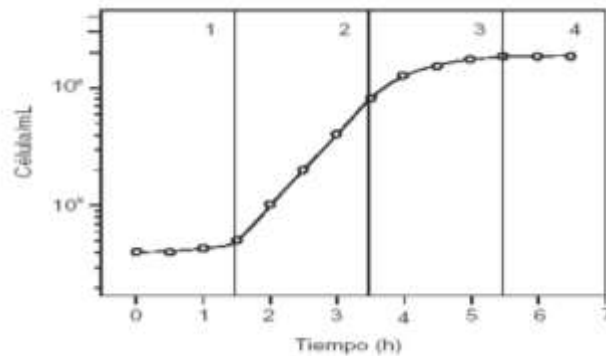
Las BAL se consideran GRAS, sigla en inglés que significa generalmente reconocido como seguro, al perder o inactivar los genes característicos de las especies patógenas (Olivera, 2011). Las BAL son de gran importancia en la preservación y en la fermentación

de alimentos, al mejorar la calidad higiénica e inhibiendo la presencia de patógenos (Jensen, Grimmer, Naterstad & Axelsson, 2012).

Los principales miembros de las BAL son los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Mientras *Lactobacillus* es el más grande de estos géneros (Parra, 2010).

En la figura 1-1, se presenta la curva de crecimiento de estas bacterias y se incluyen las diferentes fases.

**Figura 1-1.** Curva de crecimiento de las bacterias. 1) Fase de latencia o de adaptación. 2) fase logarítmica o exponencial 3) fase de transición 4) fase estacionaria (Crueger, 1993).



En la figura 1-1, se expone las diferentes fases de crecimiento para la bacteria. En la fase 1, las bacterias se llevan a un medio líquido nuevo, la división celular no puede comenzar inmediatamente: puede existir una fase de latencia inicial en la que apenas se dan divisiones celulares. Por consiguiente, en la fase de latencia las células se están adaptando al nuevo ambiente y la longitud puede depender principalmente a las condiciones en que estaban las células antes de ser introducidas al medio (Crueger, 1993).

Mientras en la fase 2, las bacterias están adaptadas al nuevo medio, las células comienzan a crecer y dividirse a una tasa que es máxima para la especie en las condiciones existentes, siendo la fase logarítmica o exponencial, las células se duplican a velocidad constante.

En la fase 3 y 4, sí el nutriente esencial del medio de cultivo se acaba, o algún producto de desecho se acumula en el medio hasta alcanzar concentraciones inhibitorias del crecimiento exponencial, la población entonces alcanza la fase estacionaria. En esta fase no hay incremento o decremento del número de células (Garzon, 2007).

Cuando las células han muerto, la tasa de mortalidad disminuye bruscamente, por lo que un número pequeño de sobrevivientes pueden persistir en cultivo por meses o años, debido a los nutrientes liberados por las células que mueren y lisan (Scragg, 2002).

Las principales especies se exponen en la siguiente tabla 1-5, con sus características principales.

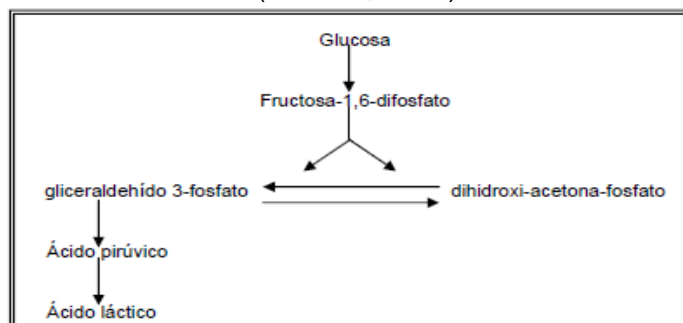
**Tabla 1-5.** Principales características de las bacterias ácido lácticas asociadas con las fermentaciones de productos vegetales (Montaño, 2010).

	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Morfología celular	Bacilos en cadena	Bacilos en cadena	Cocos en pareja y tétradas	Cocos en parejas y cadena
Temperatura óptima (°C)	30-35	30	28-32	20-30
Intervalo aprox. de pH	3,8-7,5	3,8-7,5	4,0-8,0	4,5-8,0
Metabolismo de glucosa	Homoláctico	Heteroláctico	Homoláctico	Heteroláctico

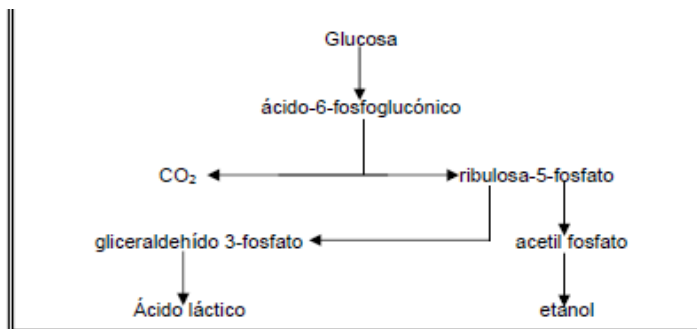
### 1.3.2 Principales grupos

Las bacterias ácido-lácticas se clasifican en dos grupos según sus características bioquímicas: las homofermentativas y heterofermentativas. En la figura 1-2 y 1-3 se presenta las rutas fermentativas de los dos grupos mencionados de acuerdo a sus características (Cabeza, 2006; Mancha Agresti *et al.*, 2012).

**Figura 1-2.** Fermentación láctica homofermentativa adaptada por Larpent 1995 a (Cabeza, 2006).



**Figura 1-3.** Fermentación láctica heterofermentativa (Cabeza, 2006).



### 1.3.2.1 Género *Streptococcus*

Este género se encuentra en la Familia *Streptococcaceae* y está integrado por 67 especies, algunas de ellas patógenas, sin embargo algunas de las especies *Streptococcus* son consideradas como GRAS. Morfológicamente, son cocos Gram-positivos ovoides que se disponen de a pares o en cadenas. Con respecto a la fermentación son homofermentativos y generan L-ácido láctico. Son microorganismos no móviles, mesófilos incapaces de crecer a 10°C; sin embargo algunas especies crecen a 45°C. El pH óptimo para su crecimiento es de 6,5, pero no a 4,4 ó 9,6 (Olivera, 2011).

### 1.3.2.2 Género *Lactobacillus*

Este género, se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos. Estos bacilos se presentan comúnmente al formar cadenas. Son Gram positivos y sólo las células muertas pueden dar resultados variables a la tinción de Gram. Además, no esporulan y algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato. Los grandes bacilos homofermentativos presentan gránulos internos revelados por tinción de Gram o por tinción con azul de metileno (Silva, Jacobus, Deneke & Gorbachl, 1987).

### 1.3.2.3 Género *Bifidobacterium*

Estos microorganismos se caracterizan por ser un generó propio, presenta la enzima fructosa-6-fosfato en su ruta metabólica, hecho que diferencia de los lactobacilos. Son bacilos cortos de forma ramificada, este género no solo produce ácido láctico sino también ácido acético, principales productos de fermentación y son anaerobios obligados (Collado Amores, 2004), sin embargo las *Bifidobacterium lactis* es una especie tolerante al oxígeno hasta una concentración del 10%, al ser de gran interés para su incorporación en productos fermentados comerciales. Además, manifiesta una alta tolerancia a valores bajos de pH, por tanto, son propiedades que diferencian esta especie del resto de las bifidobacterias. Adicional, se consideran uno de los mayores géneros de bacterias saprófitas de la flora intestinal y que residen en el colon (Rodríguez, 2006).



### 1.3.3 Probióticos

Según el CODEX STAN 243-2003, para leches fermentadas se considera que los microorganismos deben ser viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de duración mínima salvo si el producto es tratado térmicamente tras la fermentación, en cuyo caso no se aplica el requisito de microorganismos viables.

Para poder ejercer beneficios a la salud de las personas, se reporta en la Resolución número 333 de 2011 del Ministerio de protección social de Colombia que el contenido de microorganismos debe ser viables y presentar de  $10^6$  unidades formadoras de colonias/g (UFC/g), en el momento de consumirlo. La viabilidad de las colonias es afectada en la mayoría de los productos durante el almacenamiento (Alvear, 2010; Gonzáles-Montiel, Bravo-Delgado, Pimentel-Gonzáles, Campos-Montiel, 2010).

Se considera alimentos probióticos al adicionar microorganismos que beneficia la salud del hospedero y mantiene un equilibrio en la flora intestinal. Las bacterias que pueden servir como probióticos se pueden aislar del tracto intestinal humano, carnes, frutas y vegetales fermentados. Adicional, las bacterias deben cumplir ciertos requisitos para ser consideradas probióticas; resistir la acidez del estómago y sales biliares, fijar en el epitelio intestinal y colonizar el intestino, además deben ser capaces de competir con otras bacterias o sus productos tóxicos y eliminarlos mediante cambios de pH intestinal (Barboza-Corona, Vázquez-Acosta, Salcedo, Bautista-Justo, 2004).

En la tabla 1-6, se presenta los microorganismos que se consideran como probióticos.

**Tabla 1-6.** Microorganismos que se consideran como probióticos (Caicedo, 2010).

<b>Lactobacilos</b>	<b>Cocos Gram positivos</b>	<b>Bifidobacterias</b>	<b>Levaduras</b>
<b><i>L. acidophilus</i></b>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Saccharomyces</i>
<b><i>L. casei</i></b>	<i>Streptococcus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>boulardii</i>
<b><i>L. reuteri</i></b>	<i>salivarius</i>	<i>B. animalis</i>	
<b><i>L. brevis</i></b>	<i>Enterococcus</i>	<i>B. longum</i>	
<b><i>L. curvatus</i></b>	<i>faecium</i>	<i>B. thermophilum</i>	
<b><i>L. fermentum</i></b>	<i>Streptococcus</i>		
<b><i>L. plantarum</i></b>	<i>intermedius</i>		
	<i>Streptococcus</i>		
	<i>diacetylactis</i>		

### 1.3.4 Tipos de cultivos lácticos comerciales

Se encuentra diferentes tipos de cultivos lácticos para uso industrial; la mayoría se usan en forma de cultivos iniciadores, los cuales son inoculados directamente en el alimento para dar curso a la fermentación (Olivera, 2011). Un cultivo iniciador puede ser definido como una preparación microbiana de al menos una o grandes números de células que se pueden añadir a una materia prima y producir una fermentación en el alimento pero de forma acelerada (Leroy & De Vuyst, 2004).

Por tanto, los cultivos iniciadores puede ser puros (única cepa), mixtos (mezcla definida de bacterias ácido lácticas). La comercialización de los fermentos pueden ser liofilizados, deshidratados, congelados o líquidos (Heller, 2008; Schlegel & Zaborosch, 1997). Adicional, los cultivos iniciadores se clasifica de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de las bacterias ácido lácticas que lo compone; cultivos mesófilos empleados en procesos de fermentación con temperaturas entre 20-30°C, los cultivos termófilos son utilizados a un rango de 30–50°C. Mientras los mixtos, son empleados en procesos fermentativos de 30–40°C (Ingraham, Ingraham, 1998).

En este contexto la producción de alimentos fermentados, se pueden desarrollar al utilizar mezclas de cepas ya sea de una misma especie o varias subespecies y en la industria se basan en el uso de cultivos iniciadores, al brindar una rápida acidificación de la materia prima. Por ejemplo los cultivos mixtos se emplean para la fabricación de quesos, yogurt, maduración de quesos, etc. Algunos cultivos que se pueden clasificar como termófilos, los *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, etc. Siendo un cultivo poco sensible al pH, desarrollándose algunas cepas en la leche hasta un pH entre 3,8 y 4,1 y su temperatura óptima se encuentra entre 41-43°C, este tipo de cepas son empleadas en kumis y yogurt. Mientras en los cultivos mesófilos, se encuentra los Estreptococos y algunos lactobacilos que se manejan para la fabricación de algunos productos lácteos como quesos. Se resalta que estas cepas, presentan una temperatura óptima de fermentación 25 y 30°C, y acidifica la leche a un pH de 4,5 y en un medio líquido presentan un tiempo de duplicación entre 35 y 40 minutos (Leroy & De Vuyst, 2004).

Los cultivos mixtos se utilizan para inocular los alimentos y obtener alimentos fermentados como kéfir, salsa de soja o el mijo, al ser un cultivo iniciador (“starters”) de mezclas complejas de bacterias y hongos. Estos cultivos mixtos estables presentan ciertas ventajas sobre los cultivos puros; poseen una alta tasa de crecimiento y un rendimiento más elevado (algunos cultivos mixtos de bacterias lácticas producen más ácido láctico del que produciría cualquier componente del cultivo individualmente), además son muy resistentes a la contaminación, y pueden intervenir, simultáneamente, en las transformaciones en varias etapas de mezclas de sustratos complejas (Ingraham, Ingraham, 1998).

Estos cultivos iniciadores o starter son diseñados para fermentar matrices lácteas como inoculación en leche directa, sin embargo, estudios con algunos de estos cultivos en

matrices vegetales, encuentran efectos favorables sobre la fermentación de soya e inicia los primeros estudios de fermentación en el polen (Fuenmayor, Quicazán, 2011).

### **1.3.5 Fermentación ácido láctica**

Es un proceso biológico, que convierte los azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) en energía celular y en ácido láctico principalmente; durante la glucólisis, que es la primera fase de la fermentación del ácido láctico, la oxidación de una molécula de glucosa produce dos moléculas de ácido pirúvico. Esta reacción de oxidación genera la energía necesaria para formar las dos moléculas de ATP. Durante el paso siguiente las dos moléculas de ácido pirúvico son reducidas por dos moléculas de NADH para formar dos moléculas de ácido láctico. El piruvato se reduce directamente por acción del NADH para formar lactato como producto final, sin liberación de CO<sub>2</sub> (el lactato es la forma ionizada del ácido láctico) (Tortora, Funke, Case, 2007). La fermentación láctica es una tradición que se remonta a la antigüedad para la conservación de los alimentos (Guern, 1995).

### **1.3.6 Recuento celular de las bacterias ácido lácticas**

Se expone que el recuento de las bacterias lácticas totales en una fermentación, es con el fin de obtener un número de células vivas o viables en determinado sustrato; la célula viable es aquella que es capaz de dividirse y formar un progenie y el conteo se determina por la cantidad de células presentes en la muestra, capaces de formar colonias sobre un medio adecuado como el agar, y se llama recuento de colonias. Esta técnica presenta utilidad cuando se requiere medidas de control de crecimiento microbiano durante la optimización de inóculos, monitoreo de desarrollo microbiano en procesos fermentativos (Ramirez, 2008).

### **1.3.7 Fermentación láctica en matrices vegetales**

Se reportan algunas investigaciones que han propuesto fermentar matrices vegetales, al emplear bacterias lácticas, algunas con características probióticas. Por tanto, se han llevado a cabo diferentes investigaciones que evaluaron diferentes matrices vegetales.

Quicazán (2012), evaluó la fermentación de bebidas de soya con dos cultivos lácticos comerciales Choozit® MY 800 – Yomix@205,® 205 LYO-250 DCU. Para obtener las bebidas evaluó la hidratación de la soya (20°C, 40°C y 80°C), y utilizó un blanqueo mediante inmersión en agua a 80°C con diferentes relaciones soya:agua y tiempos de inmersión (1,2,3, y 4 minutos), posterior presentó una prueba de extracción acuosa para obtener las bebidas, y realizó un tratamiento térmico. Respecto a la fermentación se trabajó a 43°C y efectuó seguimiento durante 9 horas a parámetros como la acidez y pH. Finalmente concluyó que se debe controlar las etapas de hidratación y escaldado, mientras en la fermentación comparó el curso de las bebidas y encontró que con el cultivo Choozit® MY 800, alcanzó a las 7 horas la fermentación y logró una acidez entre 0,4 y 0,8% mayor que Yomix@205,® 205 LYO-250 DCU, con un número pertinente de bacterias lácticas superiores a 10<sup>6</sup> UFC/mL, mientras el otro cultivo presentó un

crecimiento lento de microorganismos sin llegar a cumplir el límite, concluyendo que existió diferencia según el cultivo utilizado, sin embargo el tipo de bebida es la que define la varianza entre los indicadores y avance del proceso.

Morales(2000), estudió la posibilidad de obtener un extracto de garbanzo fermentado, el cual se sometió a un proceso de molienda y un tratamiento térmico durante 20 minutos en una dilución de 1:4, a una presión de 7,7 kg/cm<sup>2</sup>, para después ser fermentado con diferentes porcentajes de inóculo de la flora natural del garbanzo; con *L. casei* y *L. plantarum* y un cultivo mixto de estos lactobacilos (5% y 5%) inoculados en caldo MRS. Los resultados indicaron que la presencia de microorganismos propios de la flora natural del garbanzo pueden provocar interferencias en la fermentación, por tanto, se aplicó un tratamiento térmico, y se encontró que al emplear un cultivo mixto inoculado con caldo MRS, redujo el tiempo de fermentación al incrementar la producción de ácido láctico y descenso del pH en 6 horas, al ser un tiempo menor al que presentan cada una de las cepas, el extracto de garbanzo presentó características similares a las de un queso.

Otro estudio evaluó el crecimiento de las bacterias ácido lácticas tales como *L. plantarum* en algas marinas como un sustrato, al emplear algas crudas y tratadas al calor. Se llevó a cabo un tratamiento térmico en una autoclave a 95 °C durante 15 min. Las algas fueron lavadas, cortadas en trozos pequeños (2 cm x 0,5 cm) y se tomaron 5 g en un matraz Erlenmeyer de 100 mL y se adicionó 24 mL de agua desionizada. Los matraces que contienen algas y agua (en adelante, el caldo de algas marinas), se llevaron a autoclave a las condiciones requeridas (95 °C durante 15 min) e inoculado con 4% de inóculo (1 mL) al enfriar. En caso de las algas crudas, se llevaron a matraces que contenían 24 mL de agua y se esterilizaron por separado. Se añadieron las algas prelavadas y picadas (5 g) en frascos con condiciones estériles, seguido por la inoculación con 4% de inóculo. Los matraces se incubaron a 37 °C y 50 rpm, al tomar muestras durante 0, 24, 48, y 72 horas para el análisis microbiológico y el contenido de azúcares totales. Finalmente encontraron que el tratamiento térmico puede servir para: eliminar microflora de la superficie, producir un producto aceptable, y mejorar la disponibilidad de nutrientes. Sin embargo durante las pruebas iniciales de la fermentación de algas, la concentración de células de *L. plantarum* se mantuvo alta (7-8 log UFC / mL). Mientras en el curso temporal para el crecimiento de *L. plantarum* en las diferentes condiciones de procesamiento, se observó que las algas tanto crudas como procesadas no fueron sustrato adecuados para el crecimiento de la cepa (Gupta, Abu-Ghannam & Scannell, 2011).

Con base a la revisión bibliográfica sobre la transformación del polen al pan de abejas, existen diferentes descripciones sobre este proceso natural al desarrollar por las abejas en sus colmenas. Según los estudios de Gilliam (1979), reportó la conversión del polen a pan de abejas en cuatro etapas: la primera fase se presenta durante 12 horas y se caracterizó por el desarrollo de un grupo de microorganismos heterogéneos incluyendo las levaduras; en la segunda fase, se presenta la *Streptococcus* que utilizó los productos desarrollados por las levaduras para bajar el pH del polen; la tercera fase se caracterizó

por desaparecer el *Streptococcus* y el desarrollo de la *Lactobacillus* que produce más ácido que la otra especie; la cuarta fase consistió en la desaparición de las bacterias ácido lácticas por el alto contenido de acidez.

Mientras Del Risco (2002), presentó dos etapas factibles para este proceso de fermentación del polen: en la primera etapa se presentó un grupo de microorganismos como *Lactobacillus*, *Pseudomonas* y *Saccharomyces*, al resaltar que las *Pseudomonas* desarrollaron un ambiente anaeróbico para los *Lactobacillus*, además degradan la exina, mientras las cepas *Lactobacillus* son las encargadas de realizar la fermentación ácido láctica; en la segunda etapa las *Pseudomonas* agotan el oxígeno para generar un entorno anaeróbico propicio para las cepas *Lactobacillus* para luego desaparecer, al resaltar en esta etapa que los *Lactobacillus* degradan los azúcares para generar ácido láctico y por último la *Saccharomyces* apoya la degradación de los azúcares últimos o restantes.

Por consiguiente, estos estudios han generado la necesidad de investigar procesos que desarrollen un producto análogo al pan de abejas, al encontrar en la revisión bibliográfica los siguientes aportes.

Vamanu (2008), estudió a diferentes microorganismos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y la combinación de las dos, al emplear diferentes concentraciones de polen con el propósito de adquirir un producto con carácter probiótico. Se concluye que a mayor concentración de polen presentó mayor viabilidad en la *Lactobacillus acidophilus*, en cambio para la combinación de la *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, es mejor una menor concentraciones de polen.

Fuenmayor (2009), reportó un estudio de caracterización de la materia prima y realizó algunos ensayos con polen sin tratamiento térmico y con tratamiento con calor seco por debajo de 92°C (70°C-15 min, 80°C -30min, 90°C-15min) y autoclave a 121°C, 5, 10 y 15 min, para evaluar su efectividad al disminuir la carga microbiana mediante los indicadores de contaminación microbiana y la capacidad antioxidante, el pH y la acidez de la muestra. Posterior, evaluó el polen sin tratamiento y el polen con mejores características después del tratamiento, para inducir una fermentación del polen apícola, al emplear un inóculo determinado de  $1 \times 10^8$  UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* y dos cultivos mixtos YOMIX@205, ® 205 LYO y CHOOZIT ® MY 800, con mezclas de polen:agua (2:1) y polen:agua:miel (6:3:1), se tomaron muestras cada 24 horas para monitorear el pH, la producción de acidez y número de células de bacterias ácido lácticas. Adicional aplicó el uso de una mezcla comercial de enzimas Citrozym Ultra® usada típicamente para la degradación de estructuras rígidas de matrices vegetales. Finalmente, encontró que el mejor tratamiento térmico fue a 121°C durante 5 min, respecto a los índices microbiológicos y por afectar estructuralmente al polen. Mientras el cultivo que mejor se adaptó al sustrato sin adición de miel fue *Lactobacillus acidophilus* puro, creciendo hasta niveles superiores de  $10^{10}$  UFC/g, sin embargo presentó un descenso significativo entre las 48 horas y las 72 horas. Respecto a la

adición de enzimas no afectó la fermentación en términos de rendimiento en la producción de acidez.

Vamanu, Vamanu, Popa, & Narcisa (2010), presentaron una investigación con cuatro cepas del género *Lactobacillus*: *Lactococcus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* BS1 y *Lactobacillus plantarum* BS3 y *Lactobacillus paracasei* y dos cepas del género *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium bifidum* BS4 y *Bifidobacterium bifidum* BS5. Además evaluó la influencia de prebióticos como inulina, rafinosa y lactulosa en el sustrato, al buscar determinar el efecto de las sustancias en cuanto a la viabilidad celular, producción de ácido láctico y la capacidad antioxidante. Se concluye que los mejores resultados fueron con la inulina y lactulosa.

Posteriormente Moreno (2012), evaluó un aislamiento de cepas a partir del pan de abejas, al encontrar que el principal microorganismo fermentador, pertenece al género *Lactobacillus* *Kunkeei*, al presentar los mejores resultados en las pruebas bioquímicas. Adicionalmente, se realizó una fermentación en el polen apícola a partir de la cepa aislada *L. Kunkeei* para ser comparada con una comercial *L. acidophilus*, estableció que 12 horas es el tiempo pertinente para obtener una fermentación óptima respecto a la viabilidad, pH y acidez por parte de los microorganismos y elaborar pan de abejas, por tanto, estos hallazgos visualizan que *L. Kunkeei* no presenta diferencia significativa de la cepa comercial, considerada probiótica y concluyen que se puede obtener un buen producto final.

Apoyándose en las anteriores investigaciones, Salazar (2014), desarrolló una fermentación en fase sólida, donde realizó una caracterización fisicoquímica y bioactiva de la materia prima, para aplicar tratamientos térmicos como esterilización 121°C-15min, 115°C-12 min, 110°C-36min y relaciones polen:agua (2:1; 1:1; 1:2), aplicó dos cepas comerciales *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, una levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 y una mezcla (*Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces cerevisiae*), realizó una adaptación de los microorganismos al sustrato a través de escalamiento, al manejar relaciones polen:caldo nutritivo (1:10, 1:25, 1:50) durante 36 y 48 horas, mientras la *S. cerevisiae* y *L. acidophilus*, y la *L. plantarum* entre 48 y 72 horas, al evaluar su efectividad a través del número de células de Bacterias ácido lácticas, para seleccionar la cepa que pueda combinar con la cepa *S. cerevisiae*. Para el proceso de fermentación se utilizó un inóculo  $10^8$  UFC/g y se evaluó polen húmedo y las relaciones polen:agua (1:1; 2:1) para las temperaturas de incubación 35°C y 40°C, siguió la fermentación mediante el pH y la acidez, adicionalmente evaluó las características bioactivas del polen como TEAC, FRAP, Fenoles totales, carotenoides y vitamina E y sensorialmente a través de la nariz electrónica de barrido.

Se encontró que el tratamiento de 121°Cx15min, reportó pruebas microbiológicas satisfactorias en todas las relaciones polen:agua, y cambios estructurales en la capa externa, encontró que la mejor cepa para combinar con la levadura fue la *L. plantarum* al presentar recuentos de aproximadamente  $10^8$  UFC/g hasta las 48 horas y  $10^7$  UFC/g a las 72 horas. Se estableció que la mejor relación de polen:agua (1:1) para *L. plantarum*, *L. acidophilus* y el cultivo mixto, mientras para *S. cerevisiae* polen:agua (2:1), respecto a

la temperatura de fermentación encontró que 35°C es la mejor para *L.plantarum*, *S. cerevisiae* y el cultivo mixto, mientras *L.acidophilus* a 40°C, respecto al pH observaron descensos y un aumento en la acidez en todas las cepas, excepto para la levadura se concluye que son parámetros que benefician. Respecto a los compuestos bioactivos del polen los mejores resultados los presentó el cultivo mixto al mostrar incremento en el contenido de carotenoides totales, fenoles totales y vitamina E durante el proceso de fermentación. Finalmente expone que la producción de compuestos aromáticos se ven influenciadas por las distintas cepas y al hacer la mezcla genera productos totalmente diferentes, al concluir que existieron diferencias significativas entre cada cepa (bacterias, levadura y cultivo mixto) y el cultivo mixto.

### 1.3.7.1 Cambios ocurridos durante la fermentación láctica

El pH y la acidez, son parámetros que pueden indicar si el sustrato presenta un proceso de fermentación efectivo durante el tiempo de incubación. Al encontrar que el pH debe descender y la acidez debe presentar un crecimiento, al considerar que las BAL desarrollan ácido láctico durante el proceso de fermentación de los azúcares disponibles del sustrato (Ramirez, 2008)

Moreno (2012) evaluó el comportamiento del pH, debido al efecto de la adición de cepas y el efecto del tiempo de fermentación, encontró que todas las cepas presentan un descenso similar de pH (4,4 para la *L. acidophilus* al ser mayor en comparación al pan de abejas 4,1). Indicaron que a las 24 y 36 horas no se evidenció cambios significativos en este parámetro, mientras la acidez libre presentó una mayor producción (263 meq/kg al ser un valor menor en comparación al pan de abejas 271 meq/kg). Concluyó que la variación del pH y la acidez no son atribuibles al metabolismo bacteriano, sino a las actividades químicas propias del sustrato.

Fuenmayor (2009) observó de manera general un descenso en el pH y un aumento en la acidez del medio, al ser una correlación esperada. Este proceso fue inducido con mayor intensidad, con picos de productividad entre 24 y 48 horas, una fase de latencia inferior a 24 horas y una fase exponencial que llegó un máximo a las 20 y 40 horas. Realizó una comparación del polen húmedo y polen seco, al encontrar diferencia en la acidez al suponer que se produzca también por los mohos y levaduras presentes en el polen húmedo. Mientras en el polen seco la producción de acidez es significativa, en cuanto al pH no hay diferencia significativa.

Estos estudios conducen a pensar que se puede realizar una fermentación láctica en el polen apícola como se expone en otros alimentos proteicos de origen vegetal, al ser posible sustrato al aplicar algunos pretratamientos al polen apícola como alternativas para potencializar la fermentación, tal como ocurre en estas investigaciones.





## 2. Capítulo 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materia prima

#### 2.1.1 Polen Apícola

Actualmente existen diferentes reportes donde resaltan que la humedad es un factor que afecta al polen apícola, debido a su alta carga microbiológica genera un deterioro pronunciado, por tal razón en este estudio se empleó polen apícola seco comercial producido por la empresa “Apiario los Cerezos”, ubicada en el municipio de Viracachá (departamento de Boyacá). Las condiciones de secado durante el día están en un rango de 35°C a 60°C, humedad relativa entre 40-10%, y dura aproximadamente 8 horas.

El polen fue caracterizado fisicoquímica y microbiológicamente de acuerdo con los métodos que se presentan en las tablas 2.1 y 2.2 respectivamente.

**Tabla 2-1.** Metodología empleada para la evaluación de propiedades fisicoquímicas del polen.

Propiedad	Método	Referencia
Humedad (%)	AOAC 925.10	AOAC, 1998a
Actividad de agua ( $a_w$ )	Secado	Ward, Calvo, 1989
pH	AOAC 981.12	AOAC, 1998e
Acidez (meq/kg)	AOAC 950.15	AOAC, 1998c
Grasa (%)	AOAC 942.05	AOAC, 1998b
Proteína (%)	AOAC 960.52	AOAC, 1998d
Actividad antioxidante. Método: FRAP (mmol Trolox/g) y TEAC (mmol Trolox/g)	Espectrofotometría	Bernal, 2012
Fenoles totales (mg Ácido Gálico/g)		
Digestibilidad (%)	NTC 719	ICONTEC, 1994

Con el fin de verificar su calidad, se efectuó pruebas microbiológicas como aerobios mesófilos, mohos, levaduras, coliformes totales y fecales.

**Tabla 2-2.** Metodología empleada para la evaluación de propiedades microbiológicas del polen.

Propiedad	Método	Referencia
Aerobios mesófilos (UFC/g)	NTC 4519	ICONTEC, 2009
Mohos y levaduras (UFC/g)	NTC 4132	ICONTEC, 1997
Coliformes totales (NMP)	NTC 4939	ICONTEC, 2001a
Coliformes fecales NMP	NTC 4939	ICONTEC, 2001a
Estafilococo coagulasa (+) (UFC/g)	NTC 4779	ICONTEC, 2007a
Presencia de <i>Salmonella sp.</i>	NTC 4574	ICONTEC, 2007b
Esporas <i>Clostridium sulfito reductor</i>	NTC 4834	ICONTEC, 2000

### 2.1.2 Cultivos lácticos

Se utilizaron cultivos starter comerciales de la empresa Danisco ® con cepas liofilizadas de bacterias acidolácticas certificadas como probióticas..

- ✓ Howaru™ Bifido (*Bifidobacterium lactis* HN019)
- ✓ Howaru™ Dophilus (*Lactobacillus acidophilus*)
- ✓ YO-MIX™® 205 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*)

Las fichas técnicas de cada uno de estos cultivos comerciales se presentan en el Anexo A.

## 2.2 Metodologías analíticas empleadas en el monitoreo de los experimentos.

A continuación se dan a conocer los métodos empleados para evaluar el efecto de los pretratamientos y los diferentes procesos de fermentación.

### 2.2.1 Análisis de propiedades fisicoquímicas

#### 2.2.1.1 Determinación de pH y acidez total

La acidez y el pH se realiza según el método 981.12 y 950.15 propuestos por la AOAC (AOAC, 1998c, 1998e), donde se emplea un titulador automático Mettler Toledo® T70, al considerar como agente de titulación el NaOH 0,05 M hasta llegar a un pH 8,3, las unidades se expresan en meq/kg, y transforman a porcentaje de ácido láctico.

#### 2.2.1.2 Determinación de grasa por extracto etéreo

La determinación de la grasa en el polen pretratado se emplea el método del extracto etéreo mediante Soxhlet según el método oficial 942.05 de la A.O.A.C. (AOAC, 1998b).

La extracción de grasa en polen fue llevado a cabo por medio de una extracción sólido-líquido, en el cual se aprovecha la alta solubilidad de la grasa en solventes poco polares como el éter de petróleo. Luego de obtenida la grasa en el extracto etéreo, esta se recupera al destilar el solvente a temperatura controlada de 110 °C.

### **2.2.1.3 Determinación del contenido de proteína total por el método Kjeldahl**

La proteína se determinó por el método Kjeldahl según el método oficial 960.52 de la A.O.A.C. (AOAC, 1998d) y utilizó un factor de conversión 6,25.

### **2.2.1.4 Determinación de ácidos orgánicos**

La cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, se usa para llevar a cabo la determinación de ácido láctico como mayor interés, y ácido succínico, ácido cítrico, ácido pirúvico, ácido oxálico y ácido málico del polen fermentado. Se considera la metodología expuesta por Fuenmayor (2009) y usada previamente por Cuenca (2005), con algunas modificaciones.

Sé retira la humedad y grasa de la muestra, pesa 1 g en un tubo falcon® de 50 mL, se adiciona 30 mL de agua grado HPLC, se lleva a vortex a 1500 rpm durante 3 minutos aproximadamente, se deja 15 minutos en ultrasonido, centrifuga a 7000 rpm durante 5 minutos, se toma el sobrenadante y se diluye con agua HPLC en un balón de 50 mL, posterior se toma 5 mL de esta solución en jeringa y se retiran todos los posibles ácidos grasos y proteínas presentes en el extracto de polen mediante un cartucho C:18, finalmente se filtra usando una membrana de tamaño de poro de 0,2 µm, y se recoge en un vial 1,5 mL, para introducir el vial en la cámara de mezclado del equipo de HPLC. La columna fue Phenomenex Rezex ROA- Organic Acid H + 8% con un flujo de 0,5 mL/min, al emplear fase móvil H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4mM a temperatura ambiente.

Los estándares empleados fueron obtenidos de las siguientes fuentes: ácido láctico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico y ácido succínico. Estos estándares fueron disueltos en agua desionizada y desgasificada, para obtener soluciones madre de 25 mg/mL. Las soluciones de calibración fueron preparadas por dilución de las soluciones madre en un rango de concentración de 0,05 mg/mL a 1, 70 mg/mL (Rojas, Quicazán, Mojica, 2015).

### **2.2.1.5 Determinación de azúcares**

Se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC con el fin de detectar glucosa, fructosa y maltosa en el polen fermentado. La muestra se prepara al considerar el procedimiento de ácidos orgánicos, sin embargo después de pasar por el cartucho C:18, se pasa la muestra por un cartucho de alumina, de la cual se toman 2 mL y se pasan por un filtro de jeringa con una membrana de tamaño de poro 0,2 µm, y se recoge en un vial 1,5 mL, para finalmente pasarlo por el HPLC. La columna empleada fue

una Sugar-Pak I marca Waters y fase móvil, agua desionizada y desgasificada, producida por un equipo Barnstead Easy Pure II marca Thermo Scientific, con un flujo de 0,5 mL/min (Cuenca, 2014; Fuenmayor, 2009).

Los estándares empleados fueron obtenidos de las siguientes fuentes: D(+)-glucosa (pureza >98%), D(-)-fructosa (pureza>98%) y D-(+)- maltosa (pureza min.99%). Estos estándares fueron disueltos en agua desionizada y desgasificada, para obtener soluciones madre de 25 mg/mL. Estas soluciones fueron almacenadas en frascos ámbar y guardadas en refrigeración a 8°C. Las soluciones de calibración fueron preparadas por dilución de las soluciones madre en un rango de concentración de 0,02 mg/mL a 6,10 mg/mL. Las soluciones fueron filtradas a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm, antes de inyectarse en el sistema cromatográfico (Rojas, Quicazán, Mojica, 2015).

## **2.2.2 Análisis de propiedades nutricionales, antioxidantes y bioactivas.**

### **2.2.2.1 Determinación de digestibilidad por pepsina *in vitro***

La digestibilidad de una matriz vegetal, se define como la proporción del nitrógeno del mismo que es absorbido mediante la digestión (Gonzalvo, 2001). La digestibilidad en pepsina, se consideró mediante el método cuantitativo descrito en la Norma Técnica Colombiana Icontec NTC 719 (ICONTEC, 1994), al tener en cuenta algunas modificaciones realizadas en el estudio de Castro, Zuluaga, & Quicazan ( 2014). Los resultados se expresan en % de proteína digerida.

### **2.2.2.2 Determinación de proteínas (Método de Bradford)**

Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a los enlaces peptídicos de las proteínas. Esta unión genera un cambio en el máximo de absorción de 595 nm, para ser cuantificado. Es un método sensible, simple, rápido, económico y manejo de pocas sustancias. Por otra parte, este método se aplica en diferentes matrices vegetales por ser un método sensible y práctico en comparación al método Kjeldahl (Torres, 2013).

Se toma 1 g de muestra, se adiciona 25 mL buffer de fosfato con un pH: 7,6, agita en vortex por 5 minutos, se lleva a ultrasonido 15 minutos, centrifuga a 9000 rpm a 4°C por 20 minutos, se realiza una dilución de 2,5 mL en 50 mL de agua destilada. Adiciona 1mL del extracto y 1 mL del reactivo de Bradford, agita y realiza lecturas a 595nm, al emplear el blanco 1 mL reactivo de Bradford y 1 mL de agua destilada. Se expresa en porcentaje de proteína (Castro et al., 2014).

### **2.2.2.3 Preparación del extracto para antioxidantes**

Se toma 1 g de muestra y adiciona 15 mL de etanol al 96% en tubo Falcon de 50 mL, la solución fue sometida a ultrasonido ELMA por 10 minutos, se lleva a centrifugación por 10 minutos a 7000 rpm a 10°C, posterior se extrae el sobrenadante en un balón aforado

de 50 mL, repitiéndose dos veces este procedimiento desde la acción de etanol, finalmente se afora a 50 mL con etanol al 96%. Se toma una alícuota de 5 mL del extracto y transfiere a un balón aforado de 10 mL con etanol al 96%, el extracto se almacena en un frasco ámbar, considerando la metodología expuesta por Bernal (2012) y algunas modificaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Nacional de Colombia.

#### **2.2.2.4 Determinación de la capacidad antioxidante por medio del método TEAC (decoloración del catión radical ABTS).**

ABTS: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzothiazoline-6-sulfonic acid) peso molecular 514.62 g/mol; dona electrones cuando está frente a especies reactivas oxo, reacciona con compuestos antioxidantes como polifenoles, vitamina C y tioles. Una vez el radical se estabiliza se presenta un cambio, proporcional al contenido de antioxidantes, de color que puede ser cuantificado a través de espectrofotometría a 734 nm (Bernal, 2012).

Se utiliza 10  $\mu$ L de extracto y 1 mL de la solución de ABTS<sup>•+</sup>, se espera durante 6 min la reacción en oscuridad, se mide a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC GENESYS 10S (USA), UV visible, calcula el cambio de la absorbancia con la solución sin reaccionar. Para la obtención de los cálculos se obtuvo una curva de calibración (Anexo B), al utilizar como antioxidante el trolox y finalmente los resultados se expresan como mmol Trolox/g polen en base seca (Bernal, 2012).

#### **2.2.2.5 Determinación de la capacidad antioxidante por el método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> que es menos antioxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado.

Se considera la metodología valorada en el ICTA y por Bernal (2012), al tomar 20  $\mu$ L del extracto, 450  $\mu$ L de reactivo de FRAP y 735  $\mu$ L de agua destilada y se deja reaccionar en la oscuridad durante 30 min a partir de adicionar el extracto. Las mediciones se realizan en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC GENESYS 10S (USA), UV visible, a una longitud de onda de 593 nm. Finalmente los resultados se obtienen mediante la construcción de una curva de calibración al emplear como antioxidante el Trolox (Anexo B). Por tanto, los resultados son expresados en mmol Trolox/g polen en base seca.

#### **2.2.2.6 Determinación de fenoles totales por método de FOLIN – CIOCALTEU**

Se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, al formar complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La

transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), al proporcionar este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Avella, 2008).

La medición se determina mediante lectura en espectrofotometría a una longitud de onda de 765 nm, al tomar 500  $\mu$ L del extracto y 25 mL de agua destilada, al mezclar 2 mL de carbonato de sodio al 10%, después de 10 minutos se adiciona a 500  $\mu$ L del reactivo de Folin, se afora a 50 mL y almacena en oscuridad por 2 h, posteriormente se realiza la lectura en un espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC GENESYS 10S (USA), UV visible, se emplea el blanco con agua destilada. Los resultados se obtienen mediante la construcción de una curva de calibración con ácido gálico (Anexo B), los resultados se expresan como mg ácido gálico/g polen en base seca (Bernal, 2012).

#### **2.2.2.7 Perfil de aminoácidos**

Por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), se determina la composición de ácidos orgánicos provisto por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, siguiendo la metodología establecida en la AOAC 994.12 (AOAC, 1997), se pesa 0,815 g muestra y realiza el proceso de hidrólisis expuesto en la norma, posterior se afora a 50 mL y se diluye la solución 5/25 para ser inyectada en la columna.

#### **Condiciones del equipo:**

- Volumen de inyección: 5 $\mu$ L,
- Flujo: 2 mL/min
- Fase móvil - Solución buffer de monofosfato de sodio, pH 7,8, o solución de acetonitrilo 45%-Metanol 45%-Agua 45%.
- La columna fue Agilent-Zorbax Eclipse AAA Analytical, 4,6 x150 mm, 5 $\mu$ m.

La curva de calibración se obtuvo a partir de los datos de concentración y altura de pico generados del análisis de una serie de diluciones, en un rango de cinco concentraciones de 1; 0,25; 0,1; 0,025; 0,01  $\mu$ mol/mL, cada uno de los 15 aminoácidos estándares. Con los datos anteriores se realizó un análisis de regresión para cada aminoácido estándar, al obtener coeficientes de determinación ( $R^2$ ), los valores de b (ordenada al origen) y m (pendiente de la recta), Anexo C.

#### **2.2.2.8 Determinación de ácidos grasos**

Mediante Cromatografía de Gases (GC) se determina la composición de ácidos grasos provisto por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, al seguir la metodología establecida por las Normas técnicas Colombianas: NTC 4967 y NTC 5013 (ICONTEC, 2001b, 2014). Siendo necesario secar la muestra y extraer la grasa mediante la metodología sohxlet al usar hexano como solvente. A 10 mg de grasa se adiciona 500  $\mu$ L ter butil metil éter, 200  $\mu$ L solución

metanólica al 0,25 M de hidróxido de trimetil sulfonio. La solución que se obtuvo se inyectó en el cromatógrafo. La cromatografía se realiza en un sistema Agilent 6890N con una columna DB-225. Para la curva de calibración se emplearon como patrones Linseed (flaxseed) oil y C4-C24 Even Carbon para cada ácido graso estándar, Anexo C.

#### **Condiciones del equipo:**

- Gas de arrastre: Helio
- Inyector: Split
- Modo: Split 100:1
- Volumen de inyección: 0,2  $\mu$ L
- Temperatura del Inyector: 250°C
- Temperatura Detector: 220°C

#### *Programación horno*

Temperatura inicial 75°C por 1 minuto

Incremento temperatura a razón de 5°C/minuto hasta 150°C y mantuvo por 2 minutos

Incremento temperatura a razón de 5°C/minuto hasta 200°C y mantuvo por 5 minutos

Incremento temperatura a razón de 5°C/minuto hasta 220°C y mantuvo por 13 minutos

Duración corrida: 50 minutos

### **2.2.3 Análisis de propiedades microbiológicas**

#### **2.2.3.1 Determinación del recuento de células viables en las bacterias ácido lácticas (BAL)**

Se realiza conteo y busca obtener un promedio de colonias desarrolladas en las cajas de Petri. Adicional, se considera las cajas que presenten un número de colonias entre 30-300; multiplicar por el factor de dilución y se reporta como el número de Unidades Formadoras de Colonias sobre gramos polen (UFC/g polen) (Ramirez, 2008).

- Se pesa 1 g de muestra en 9 mL de agua peptonada al conservar una proporción de 1:10, posterior agita hasta homogenizar.
- Diluir 1 g de muestra en 9 mL de agua peptonada y se realiza diluciones decimales, se considera la carga microbiológica establecida.
- Se emplea azul de anilina para *Lactobacillus acidophilus* y YO-MIX™® 205 y solo agar MRS para la *Bifidobacterium L.* Se siembran a profundidad 1 mL de muestra por cada dilución.
- Se agita con movimientos circulares, con el fin de obtener una distribución homogénea de la muestra.
- Se lleva a incubación por 48 horas a 37°C, en condiciones aeróbicas para los cultivo *L. acidophilus* y YO-MIX™® 205, mientras *Bifidobacterium lactis* en condiciones anaeróbicas.

Se emplea azul de anilina para obtener colonias de las bacterias lácticas, de color azul brillante que se intensifica, al permitir e identificar fácilmente las bacterias lácticas ya que

las que no son lácticas no toman coloración azul y no alteran la coloración del medio (Velasco, 2002).

## 2.2.4 Análisis de la estructura del polen

### 2.2.4.1 Tinción morfológica del polen

Se evalúa la morfología del polen sin pretratar y el expuesto a los diferentes pretratamientos. Mediante la fijación de la muestra en un portaobjetos y se verifica su microestructura, específicamente la capa externa del polen.

Se usa la metodología expuesta por Ortiz, Cogua (1989) con algunas modificaciones. Se empleo gelatina glicerizada mezclada con fuscina sobre un portaobjetos, se hace observación directa en un microscopio optico.

### 2.2.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Mediante el microscopio electrónico Quanta 200 de FEI en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional de Colombia y recubiertas por pulverización catódica con platino con un metalizador. La metodología está expuesta por Fuenmayor (2009), usada previamente por Human & Nicolson (2006). Se analiza muestras de polen con pretratamiento y fermentado.

## 2.3 Ensayos preliminares

En la tabla 2-3 se presenta las condiciones experimentales para los ensayos preliminares de fermentación del polen apícola pretratado. Se usó polen con pretratamiento térmico seco expuesto por algunos autores como Fuenmayor (2009); Salazar (2014) al cual, se aplicó diferentes relaciones polen: agua (1:1 y 1:2), adecuación de pH con NaOH 5N (neutralizado y sin neutralizar) y se empleó para la fermentación los tres cultivos iniciadores *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205. Se realizó seguimiento a este bioproceso a través del pH y la acidez, con el fin de definir los ensayos definitivos.

**Tabla 2-3.** Condiciones experimentales empleadas para los ensayos preliminares de fermentación del polen.

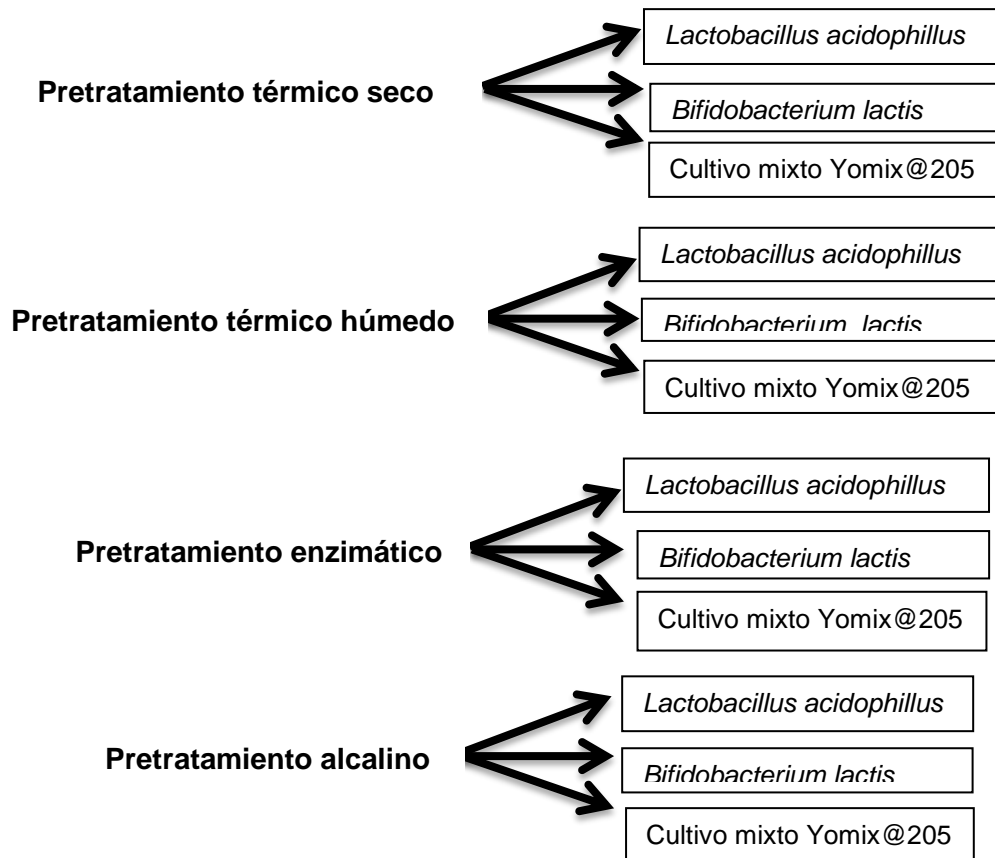
Factor	Nivel
Pretratamiento	Pretratamiento térmico seco
Relación (m/m) Polen:Agua	1:1
	1:2
pH inicial	Neutralizado
	Sin neutralizar
Cultivo	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Bifidobacterium lactis</i>
	Cultivo mixto Yomix@205



Al inicio de la fermentación, se realizó mediciones cada 3 horas durante el día, para medir pH y acidez en el tiempo propuesto en la literatura.

## 2.4 Pretratamientos

A continuación se expone como herramienta un diagrama de árbol, para establecer las dos etapas (pretratamientos y fermentación) del experimento e identificar las interacciones.



### 2.4.1 Adecuación del polen

Antes de someter el polen a los diferentes pretratamientos, se efectuó una etapa de limpieza o retiro de impurezas, mediante tamizado con una serie de tamices Tyler, ordenados según el tamaño de abertura: N° 5, 7, 10, 12, 16, 18 y 30 (Durán, 2014). Posteriormente se efectuó una molienda en un molino comercial marca Black & Decker.

### 2.4.2 Pretratamiento térmico calor seco

Se empleó la metodología expuesta por Fuenmayor (2009); Salazar (2014), al utilizar su mejor tratamiento con una relación 1:1 polen agua, esterilizado a 121°C por 15 minutos

en una autoclave Tuttnauer (presión de 15-18 psi). El procedimiento aplicado se presenta a continuación:

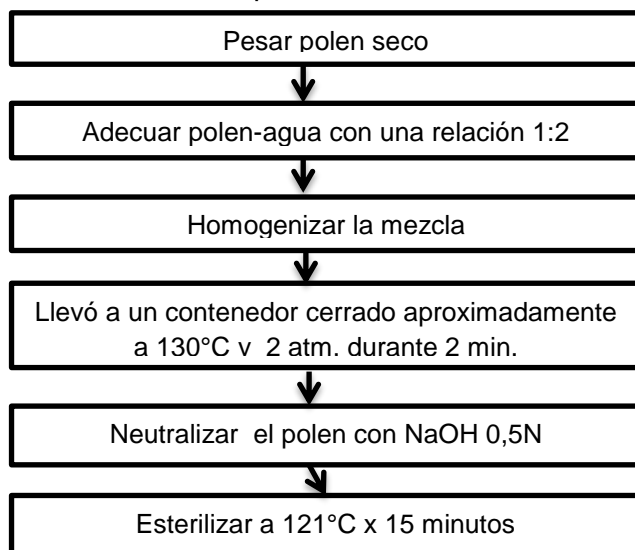
Se pesó el polen, emplearon mezclas de polen y agua (1:1) y (1:2), se evalúan sin neutralización y con neutralización de NaOH a una concentración 5 N. Finalmente estas muestras fueron esterilizadas a 121°C x 15 min.

Se evaluó propiedades nutricionales (digestibilidad, proteína por el método de Bradford, antioxidantes, perfil de aminoácidos y ácidos grasos) y las propiedades estructurales (tinción morfológica, microscopía electrónica de barrido). Este seguimiento se realizó después de aplicar el pretratamiento térmico, la metodología seguida para cada análisis se encuentra descrita en el punto 2.2.

### 2.4.3 Pretratamiento térmico calor húmedo

Se pesó el polen, adecuó una relación polen y agua (1:2), homogeniza la mezcla hasta eliminar grumos, para ser llevado el sustrato a un contenedor cerrado aproximadamente 130°C y 2 atm, durante 2 min después de alcanzar la presión. Posteriormente se neutraliza con NaOH a una concentración de 0,5 N, para medir el pH con potenciómetro y llevar a esterilización.

**Figura 2-1.** Procedimiento pretratamiento térmico calor húmedo.



Se evaluó propiedades nutricionales (digestibilidad, proteína por el método de Bradford, antioxidantes) y las propiedades estructurales (tinción morfológica, microscopía electrónica de barrido). Este seguimiento se realizó después de aplicar el pretratamiento térmico, la metodología seguida para cada análisis se encuentra descrita en el punto 2.2.

#### 2.4.4 Pretratamiento enzimático

Se usó la metodología descrita por Castro, Zuluaga, Quicazann (2014), se realizó algunas modificaciones, y empleó la siguiente enzima comercial, suministrada por Coldaenzimas Ltda.

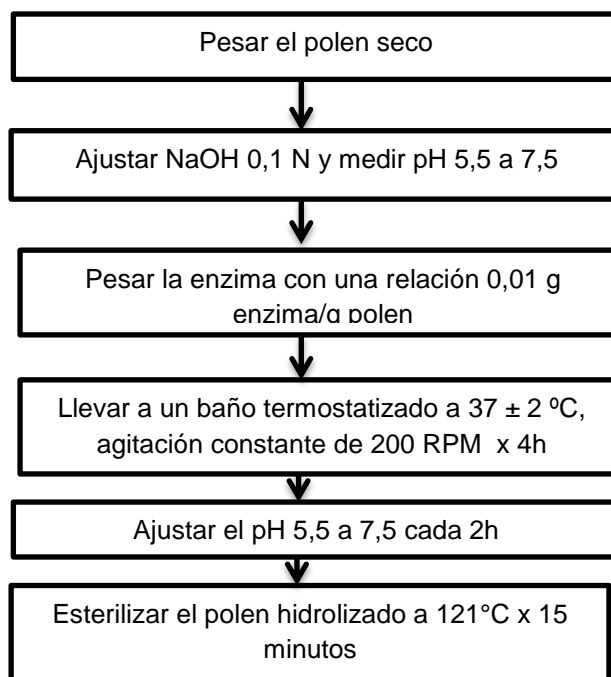
##### **Enzima *Protamex*<sup>TM</sup>**

Se caracteriza por ser un complejo de proteasa de *Bacillus* al emplear en diferentes estudios para la hidrólisis de proteínas de alimentos. Las condiciones de trabajo óptimas para esta enzima proteasa, se presenta a pH 5,5 a 7,5 a una temperatura de 35-60°C y tiene una actividad de 1,5 Unidades Anson (AU-NH)/g enzima (Liaset, Julshamn & Espe, 2003). En el Anexo D se expone la ficha técnica de la enzima.

A continuación se explica el procedimiento para la hidrolisis enzimática:

Se pesó el polen, en una cabina de flujo laminar se ajusta con NaOH a una concentración de 0,1N y ajusta pH 5,5 a 7,5 con potenciómetro SCHOTT pH11/SET (Alemania), pesó la enzima con una relación 0,01 g enzima/g polen, llevó a un baño termostatzado STUART SBS40 (USA) a  $37 \pm 2$  °C, agitación constante de 200 RPM x 4h. Se ajusta el pH 5,5 a 7,5 con potenciómetro SCHOTT pH11/SET (Alemania) cada 2h. Finalmente se esterilizó el polen hidrolizado a 121°C x 15 minutos.

**Figura 2-2.** Procedimiento hidrolisis enzimático.



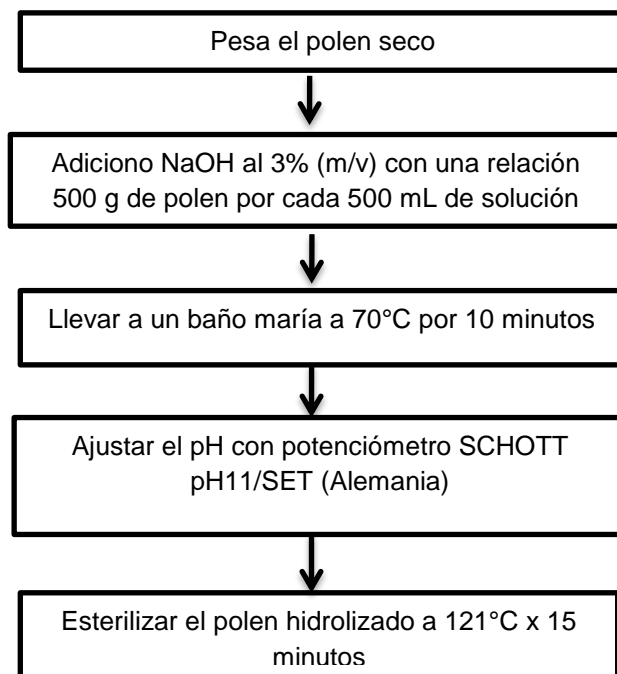
Se evaluó propiedades nutricionales (digestibilidad, proteína por el método de Bradford, antioxidantes, perfil de aminoácidos y ácidos grasos) y las propiedades estructurales (tinción morfológica, microscopía electrónica de barrido). Este seguimiento se realizó después de aplicar el pretratamiento térmico, la metodología seguida para cada análisis se encuentra descrita en el punto 2.2.

#### 2.4.5 Pretratamiento alcalino

Se realizó el procedimiento descrito por Proaños & Castro (2014), con algunas modificaciones en el pretratamiento químico. A continuación se expone las etapas:

Se pesa el polen, en una campana de extracción adicionó el NaOH al 3% (m/v) con una relación 500 g de polen por cada 500 mL de solución, se lleva a un baño maría a 70°C por 10 minutos, se ajusta el pH con potenciómetro SCHOTT pH11/SET (Alemania) y esterilizar el polen hidrolizado a 121°C x 15 minutos.

**Figura 2-3.**Procedimiento pretratamiento alcalino.



Se evaluó propiedades nutricionales (digestibilidad, proteína por el método de Bradford, antioxidantes) y las propiedades estructurales (tinción morfológica, microscopía electrónica de barrido). Este seguimiento se realizó después de aplicar el pretratamiento térmico, la metodología seguida para cada análisis se encuentra descrita en el punto 2.2.

## 2.5 Fermentación del polen

Para los ensayos finales de fermentación, se adicionó el cultivo iniciador de forma directa en frascos de vidrio de 1 litro de polen pretratado térmicamente, enzimática y alcalina, teniendo en cuenta las especificaciones de la ficha técnica de cada cultivo. Posterior se agitó durante 2 minutos al buscar homogenización, para ser distribuido en frascos de vidrio de 30 mL al considerar el triplicado por cada medición, al ser incubados a 37°C en condiciones aeróbicas, durante 45 horas de fermentación.

En la tabla 2-4 se presenta las condiciones experimentales para los ensayos finales de fermentación del polen apícola pretratado. Al inicio de la fermentación se realizó mediciones cada 3 horas durante el día, para medir pH y acidez en el tiempo propuesto según ensayos preliminares. Posteriormente, se tomó tres puntos de la fermentación para verificar la viabilidad recomendada de  $10^6$  UFC/g, y cumplir las características de un producto probiótico, al ajustar a la Norma Técnica Colombiana NTC 805 (ICONTEC, 2005) y la ficha técnica de cada cultivo.

Al final de la fermentación se evaluó propiedades químicas: pH, acidez, azúcares, ácidos orgánicos), propiedades nutricionales: digestibilidad, proteína por el método de Bradford, antioxidantes, bioactivas, perfil de aminoácidos y ácidos grasos, propiedades microbiológicas: recuento de células viables en las bacterias ácido lácticas y las propiedades estructurales: tinción morfología, microscopia electrónica de barrido. Finalmente se esclarece que el perfil de aminoácidos y ácidos grasos, solo se efectuaron para el polen con pretratamiento térmico seco fermentado y el polen con pretratamiento enzimático fermentado. Estos seguimientos se realizaron después de fermentar y se usó la metodología expuesta en el punto 2.2 para cada análisis ya descrito.

**Tabla 2-4.** Condiciones experimentales empleadas en los ensayos de fermentación del polen.

Factor	Nivel
Pretratamientos	Pretratamiento térmico seco
	Pretratamiento térmico húmedo
	Pretratamiento enzimático
	Pretratamiento alcalino
Cultivos	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Bifidobacterium lactis</i>
	Cultivo mixto Yomix@205

Posterior a la fermentación, se eligió el pretratamiento donde se verificó la presencia y viabilidad de alguno de los tres cultivos por conteo de UFC/g, para confirmar su morfología mediante coloración de Gram (Ramírez 2005).

## 2.6 Metodología estadística

Los resultados se analizaron en dos etapas. Cabe mencionar que antes de realizar el análisis estadístico, se comprobaron los supuestos de: independencia, igualdad de matrices de varianzas y normalidad.

En la primera etapa que corresponde a los pretratamientos, se consideró un diseño factorial simple, donde se empleó un análisis de componentes principales para aplicar un análisis univariante o multivariante de la varianza (ANOVA o MANOVA) según los componentes principales obtenidos, mediante el programa estadístico SPSS Statistics versión 22.

En la segunda etapa de fermentación, se consideró un diseño factorial completo, y se aplicó un análisis de componentes principales y MANOVA para las variables de respuesta pH, acidez, viabilidad, antioxidantes, etc, mediante el programa estadístico SPSS Statistics versión 22, Statgraphics Centurion versión 22, MATLAB.

Finalmente se analizaron las dos etapas, al realizar un Análisis de Decisiones por Técnicas de Ordenamiento (DART) para ser comparado con un análisis de componentes principales los valores del polen sometido a diferentes pretratamientos y fermentado, con el fin de obtener el mejor resultado.

Esta técnica se basa en la definición de una función de transformación  $t$ , para cada criterio, con el objetivo de normalizar los valores a analizar a la misma escala. Al ser necesario definir las mejores y peores condiciones según cada criterio, al transformar de forma independiente en utilidad y conveniencia  $t_{ij}$  por una función arbitraria que transforma la  $f_{ij}$  que corresponde al valor real de cada alternativa  $i$ -ésima para el criterio  $j$ -ésimo entre valores de 0 y 1.

Utilidad ( $U_i$ ) de cada alternativa  $i$ -ésimo, se define como Media Aritmética según la ecuación:

$$U_i = \frac{\sum_{j=1}^p t_{ij}}{p} \quad U_i = \frac{\sum_{j=1}^p w_j \cdot t_{ij}}{p} \quad 0 \leq U_i \leq 1$$

Conveniencia ( $D_i$ ) se define como Media Geométrica según la ecuación:

$$D_i = \sqrt[p]{t_{i1} \cdot t_{i2} \dots t_{ip}} \quad D_i = t_{i1}^{w_1} \cdot t_{i2}^{w_2} \dots t_{ip}^{w_p} \quad 0 \leq D_i \leq 1$$

La restricción de peso se asume en todo caso (Pavan & Worth, 2008):

$$\sum_{j=1}^p w_r = 1$$

## 3. Capítulo 3: Resultados y Discusión

### 3.1 Caracterización del polen apícola

En la tabla 3-1 se presentan una caracterización fisicoquímica del polen seco. Los valores obtenidos están dentro del rango que establecen otros estudios para el polen en Colombia (Mesa, Valencia, 2015), sin embargo estos resultados presentan mayor contenido en grasa 7,27% al 4,7% y proteína 25% al 18,9%. Respecto a los valores promedios que establecen en estudios internacionales en base seca por diferentes autores (Kostić et al., 2015; Yang, Wu, Ye, Liu, Chen, 2013) el polen en Colombia concuerda con el contenido máximo establecido.

**Tabla 3-1.** Caracterización fisicoquímica del polen seco empleado en el estudio.

Característica	Polen Seco	Regulación Argentina	Regulación Brasileña
Humedad (%)	4,87±0,02	8 Máximo	4 Máximo
$a_w$	0,27±0,02	---	0,6
pH	4,16±0,18	4-6	4-6
Acidez (meq/kg)	326±8,81	---	300 Máximo
Grasa (%)	7,27±0,02	---	1,8 Mínimo
Proteína (%)	25,362±0,38	15-28	8 Mínimo
FRAP (mmol Trolox/g)	0,029±0,001	---	---
TEAC (mmol Trolox/g)	0,078±0,014	---	---
Fenoles totales (mg Ácido Gálico/g)	15,03±0,57	---	---
Digestibilidad (%)	64,24±0,47	---	---

\*Resultados se expresan en base seca.

Aunque en Colombia no existe una normatividad vigente sobre los parámetros fisicoquímicos del polen para consumo humano, al comparar esta composición con los requisitos establecidos con la legislación internacional como Argentina y Brasil se encuentra en conformidad (Coronel et al., 2004; Instrução, 2001; NMX-FF-094-SCFI, 2008).

En la tabla 3-2 se presenta los resultados microbiológicos del polen seco que se empleó para los diferentes ensayos antes de aplicar los pretratamientos. Se pudo comparar los requisitos que establecen en el Código Alimentario Argentino (artículo 785), (2003), al encontrar que el polen seco alcanzó los límites permitidos para algunas características microbiológicas en la regulación Argentina, excepto para mohos y levaduras.

**Tabla 3-2.** Caracterización microbiológica del polen seco empleado en el estudio.

Característica	Polen Seco	Regulación Argentina
Aerobios Mesófilos (UFC/g)	$3,50 \times 10^2$	$150 \times 10^3$ Máximo
Mohos y levaduras (UFC/g)	$6,70 \times 10^2$	$10^2$ Máximo
Coliformes totales (NMP)	<3	---
Coliformes fecales NMP	<3	---
Estafilococo coagulasa (+) (UFC/g)	Ausencia	---
Presencia de <i>Salmonella sp.</i>	Ausencia	---
Esporas <i>Clostridium sulfito</i> reductor	<10	---

Se encuentra reportes García, Rojas & Sanchez (2006), sobre la composición microbiológica del polen que enfocan su carga al tracto digestivo de las abejas, en todo su proceso de recolección, transporte, almacenamientos en colmena y transformación. Respecto a los microorganismos patógenos no se encontró *Clostridium sulfito* reductor en ninguna de las muestras: para coliformes totales y fecales no se reportó crecimiento o contaminación.

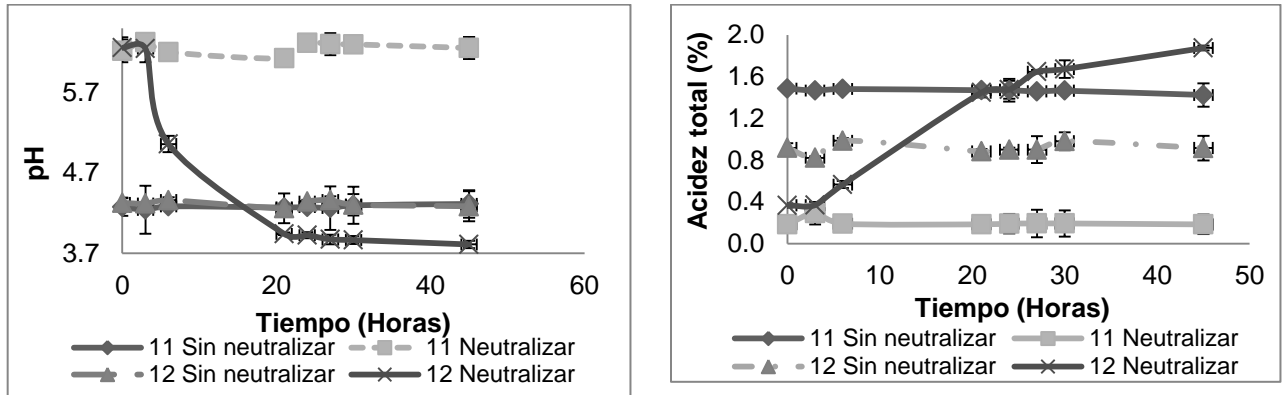
Por otro lado, el estudio de Durán, (2014), evaluó secado del polen en un sistema solar y de cabina modificado, y observó que no se logra cumplir con un nivel de aceptación de mohos y levaduras en las normas internacionales ya que existe deficiencias en las prácticas postcosecha del polen en Colombia para lograr una calidad microbiológica satisfactoria.

### 3.2 Ensayos preliminares

Con el fin de evaluar el efecto de diferentes factores en la fermentación, condiciones expuestas en el punto 2.3, a continuación se presenta en las figuras 3-1, 3-2 y 3-3, el comportamiento del pH y la acidez para cada cultivo que se evaluó en el bioproceso. Destacando que se manejó diferentes relaciones polen:agua (1:1 y 1:2), adecuación del pH del sustrato con NaOH 5 N (Neutralizado) y sin adición NaOH 5 N (Sin neutralizar ).

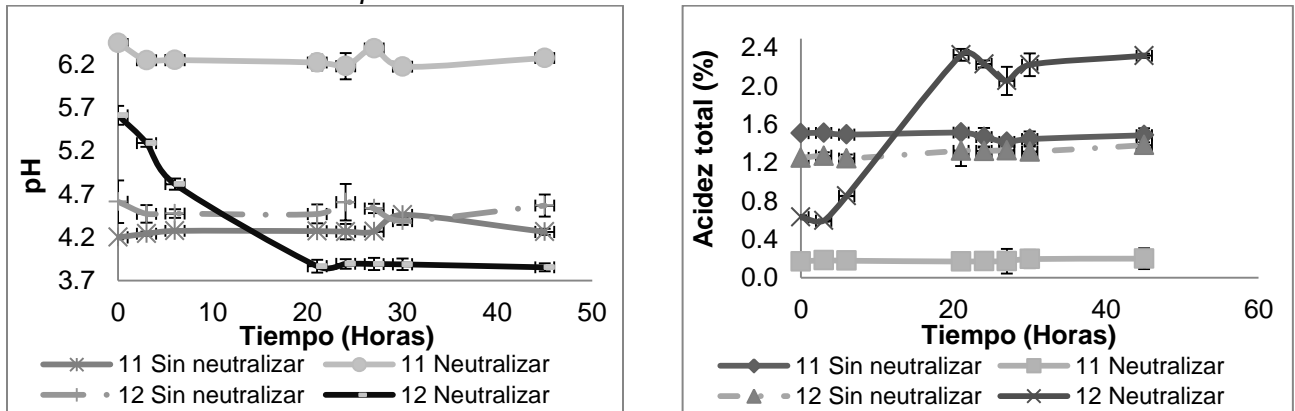


**Figura 3-1.** Comportamiento del pH y la acidez como ensayo preliminar de fermentación con el cultivo *Bifidobacterium lactis*.



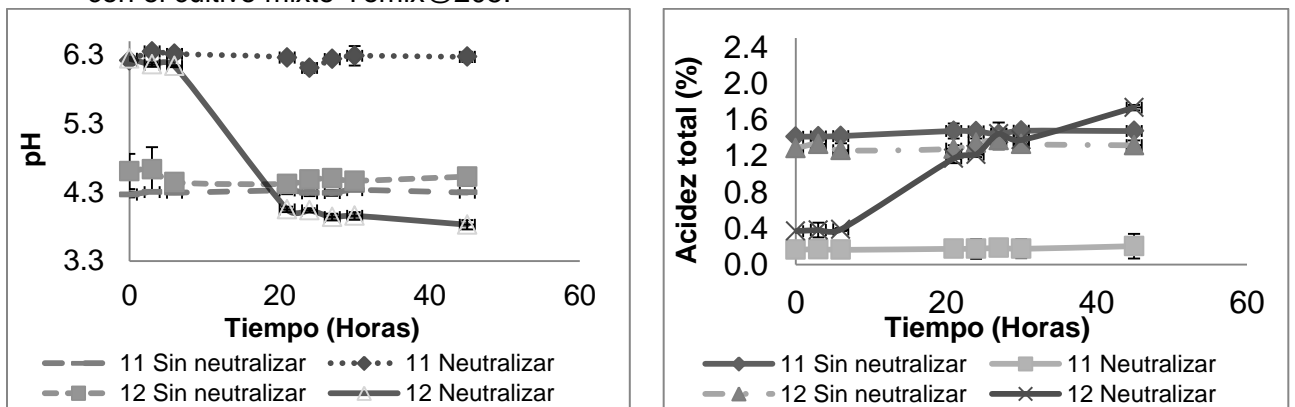
\*Acidez total expresada en ácido láctico.

**Figura 3-2.** Comportamiento del pH y la acidez como ensayo preliminar de fermentación con el cultivo *L.acidophilus*.



\*Acidez total expresada en ácido láctico.

**Figura 3-3.** Comportamiento del pH y la acidez como ensayo preliminar de fermentación con el cultivo mixto Yomix@205.



\*Acidez total expresada en ácido láctico.

En las figuras 3-1, 3-2, 3-3, se mostró el comportamiento para el pH y la acidez a través del tiempo. Se observó que el pH y acidez no presentaron cambio al emplear las diferentes condiciones, relación polen:agua 1:1 sin neutralizar, polen:agua 1:1 neutralizado y polen:agua 1:2 sin neutralizar. Mientras el sustrato con la relación polen:agua 1:2 neutralizado, se encontró un comportamiento típico de fermentación al disminuir el pH e incrementar la acidez para cada uno de los tres cultivos. Estos cambios se pronuncian significativamente hasta las 21 horas.

Este hecho concuerda que los microorganismos dependen de las condiciones de adecuación del sustrato para que puedan crecer apropiadamente, al demostrar que variables como el pH y la relación polen:agua están relacionadas de forma directa con su metabolismo, al destacar que bajos niveles de estas variables dificultan su crecimiento.

Se concluye que la fermentación del polen apícola pretratado solo es posible al considerar las condiciones establecidas en los ensayos preliminares: relación polen:agua 1:2 y neutralización del sustrato con NaOH 5 N.

### **3.3 Evaluación de pretratamientos**

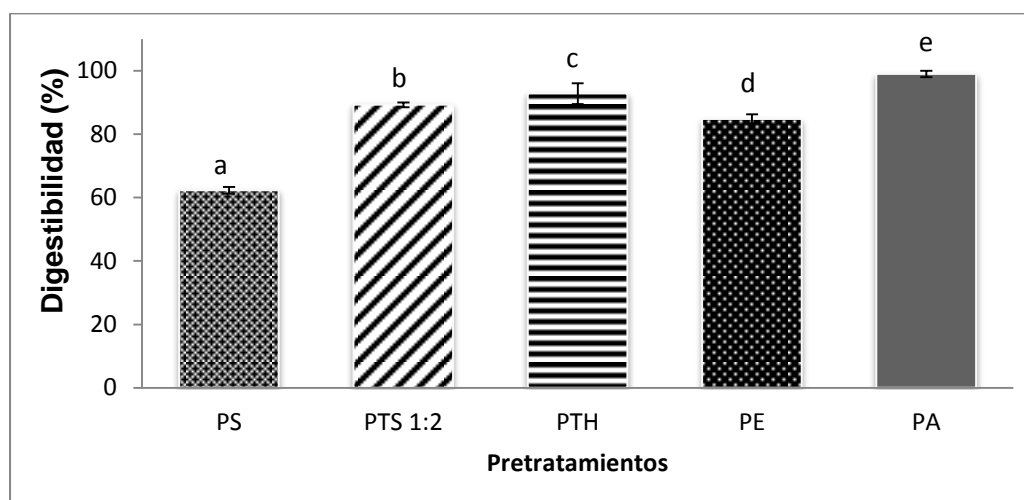
Se evaluó diferentes pretratamientos enzimáticos, térmicos y alcalinos para observar la disponibilidad de nutrientes y estructura del polen apícola.

#### **3.3.1 Disponibilidad de nutrientes del polen apícola**

Son pocos los reportes que exponen sobre el debilitamiento de la pared primaria del polen con fines tecnológicos (Zuluaga, Serrato & Quicazán, 2014) ya que se encontraron en la morfología y en definir la especie, sin centrarse en la búsqueda de un polen más disponible de nutrientes que se incorpore en la alimentación humana. En la figura 3-4, se compara la digestibilidad del polen en su estado natural o sin pretratar, con los diferentes pretratamientos que se aplicaron para esta investigación. Algunos autores estudiaron el pretratamiento térmico seco con esta matriz vegetal, sin embargo se centraron en obtener un polen estable microbiológicamente antes de un bioproceso (Fuenmayor, 2009; Salazar, 2014), al resaltar que aún faltan trabajos que busquen un polen apícola más digerible.

En la figura 3-4, se comparó la digestibilidad obtenida para los diferentes pretratamientos y polen seco sin pretratar.

**Figura 3-4.** Comparación de digestibilidad para polen seco sin pretratamiento y polen pretratado.



\*Letras distintas para cada barra indica diferencias significativas entre pretratamientos, con un nivel de confianza del 95%.

Las muestras se codificaron:

- Polen sin pretratamiento: **PS**
- Polen con pretratamiento térmico seco con una relación polen:agua 1:2: **PTS1:2**
- Polen con pretratamiento térmico húmedo: **PTH**
- Polen con pretratamiento enzimático: **PE**
- Polen con pretratamiento alcalino: **PA**

Se encontró un incremento general en la digestibilidad proteica *in-vitro* para el polen pretratado respecto al polen seco sin tratar de forma significativa al aplicar un análisis de varianza (ANOVA), este hecho puede explicarse para algunos pretratamientos debido a la desnaturalización de las proteínas por las altas temperaturas y las reacciones químicas que se emplean y que favorecen posiblemente a la deformación de la exina. Aunque para el pretratamiento enzimático, la digestibilidad aumento hasta 98%. De hecho se reportan que las abejas no consumen el polen en su estado fresco, al convertirlo el polen a pan de abejas con una digestibilidad del 66% (Castro et al., 2014). La digestibilidad de la proteína del polen pretratado se encuentra muy cercana a la reportada para proteínas animales; lácteas en un 95% y el huevo en un 85%, e incluso se resalta que las leches fermentadas podría presentar una mayor digestibilidad y absorción de las proteínas (Del Castillo Shelly & Lagarriga, 2004).

En la tabla 3-3 se presenta una comparación entre polen sin tratar y pretratado, con los valores de proteína, antioxidantes (ABTS, FRAP) y fenoles. El valor que se obtuvo para la proteína del polen (21,11%), concuerda con el reporte de otra investigación al estar cercano a la variedad chilena *Cryptocarya alba* 22% (Montenegro, Pizarro, Mejías & Rodríguez, 2013).

**Tabla 3-3.** Comparación de proteína, capacidad antioxidante y fenoles totales para polen sin pretratamiento y pretratado.

Muestra	Proteína (%) Método de Bradford	FRAP (mM Trolox/ g polen)	ABTS (mM Trolox/ g polen)	Fenoles (mg ácido gálico/ g polen)
Polen seco sin tratar	21,11±0,09 <sub>a</sub>	0,029±0,001 <sub>a</sub>	0,079±0,014 <sub>a</sub>	15,19±0,58 <sub>a</sub>
Pretratamiento térmico seco 1:2	4,64±0,22 <sub>b</sub>	0,006±0,002 <sub>b</sub>	0,024±0,001 <sub>b</sub>	9,91±0,01 <sub>b</sub>
Pretratamiento térmico húmedo	5,24±0,25 <sub>c</sub>	0,011±0,001 <sub>c</sub>	0,023±0,001 <sub>b</sub>	12,19±0,13 <sub>c</sub>
Pretratamiento enzimático	2,87±0,06 <sub>d</sub>	0,006±0,000 <sub>b</sub>	0,015±0,004 <sub>b</sub>	7,00±0,06 <sub>d</sub>
Pretratamiento alcalino	7,16±0,46 <sub>e</sub>	0,022±0,52 <sub>d</sub>	0,074±0,006 <sub>a</sub>	20,27±0,63 <sub>e</sub>

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

En la tabla 3-3 se puede apreciar que el polen expuesto a diferentes pretratamientos presentó un menor valor de proteína en comparación al polen seco sin tratar, al emplear el método de Bradford, y se evidenció una diferencia significativa entre los pretratamientos, respecto al polen sin tratar. No obstante, el polen hidrolizado enzimáticamente presentó un menor porcentaje en proteína en comparación a los demás pretratamientos, al ser explicado este hecho por diferentes autores (Castro et al., 2014; Sánchez, 2010), a una posible acción conjunta que realizan las enzimas, al proporcionar la ruptura de ciertos enlaces peptídicos que no son cuantificados y liberar determinados aminoácidos, sin embargo otros reportan que el reactivo solo podría reaccionar con los residuos de *arginina* y *lisina*, específicamente (Grintzalis, Georgiou & Schneider, 2015).

Algunos autores destacan que la hidrólisis de las proteínas mejora la digestión pancreática e incrementa la disponibilidad, al lograr romper la estructura de las moléculas, al considerar que la digestión de la proteína en un alimento es más fácil cuando se encuentra desnaturalizada (Gonzalvo, 2001; Martinez, 2006) al mejorar su absorción de nutrientes en el intestino humano.

De hecho al correlacionar los valores de digestibilidad y proteína, se encontró que el pretratamiento alcalino presentó un porcentaje significativo en digestibilidad respecto a los demás pretratamientos, sin embargo no obtuvo el menor porcentaje de proteína como el pretratamiento enzimático, hecho posible a la acción conjunta de las enzimas empleadas, que contribuyeron a una hidrólisis de proteína más efectiva para este tipo matriz compleja.

Respecto a la capacidad antioxidante FRAP y ABTS se observó una disminución para la mayoría de pretratamientos, a excepción del pretratamiento alcalino en ABTS que no

presento diferencia significativa entre polen seco sin tratar. Posiblemente que sean afectados por los diferentes procesos que se aplicaron, al generar una disminución de la capacidad antioxidante del polen (Araya, Clavijo & Herrera, 2006; Salazar, 2014), al coincidir con otros autores, que los procesos tecnológicos pueden disminuir la actividad antioxidante de algunas matrices vegetales (Perea-Villamil, Cadena-Cala & Herrera-Ardila, 2009), no obstante, ciertas investigaciones reportaron que un pretratamiento térmico o un proceso de secado podría afectar favorablemente, con un incremento en la capacidad antioxidante de algunos alimentos, ligado este hecho posiblemente a la reacción de Maillard (Fuenmayor, 2009; Salazar, 2014).

Los valores de fenoles presentaron también una leve disminución para todos los pretratamientos, excepto para el pretratamiento alcalino al manifestar un incremento, en comparación al polen en su estado natural, al ser valores similares a los reportados por Castro, Zuluaga, Quicazan (2014). Este hecho podría explicarse por la estructura compleja que presenta el polen, como la capa externa llamada exina que es un polímero de ácidos grasos y ligninas de compuestos fenólicos, que al aplicar algunos pretratamientos la pared celular de esta matriz se degrada y a su vez genera fractura al polímero lignina y se liberan algunos fenoles (Zuluaga, 2014).

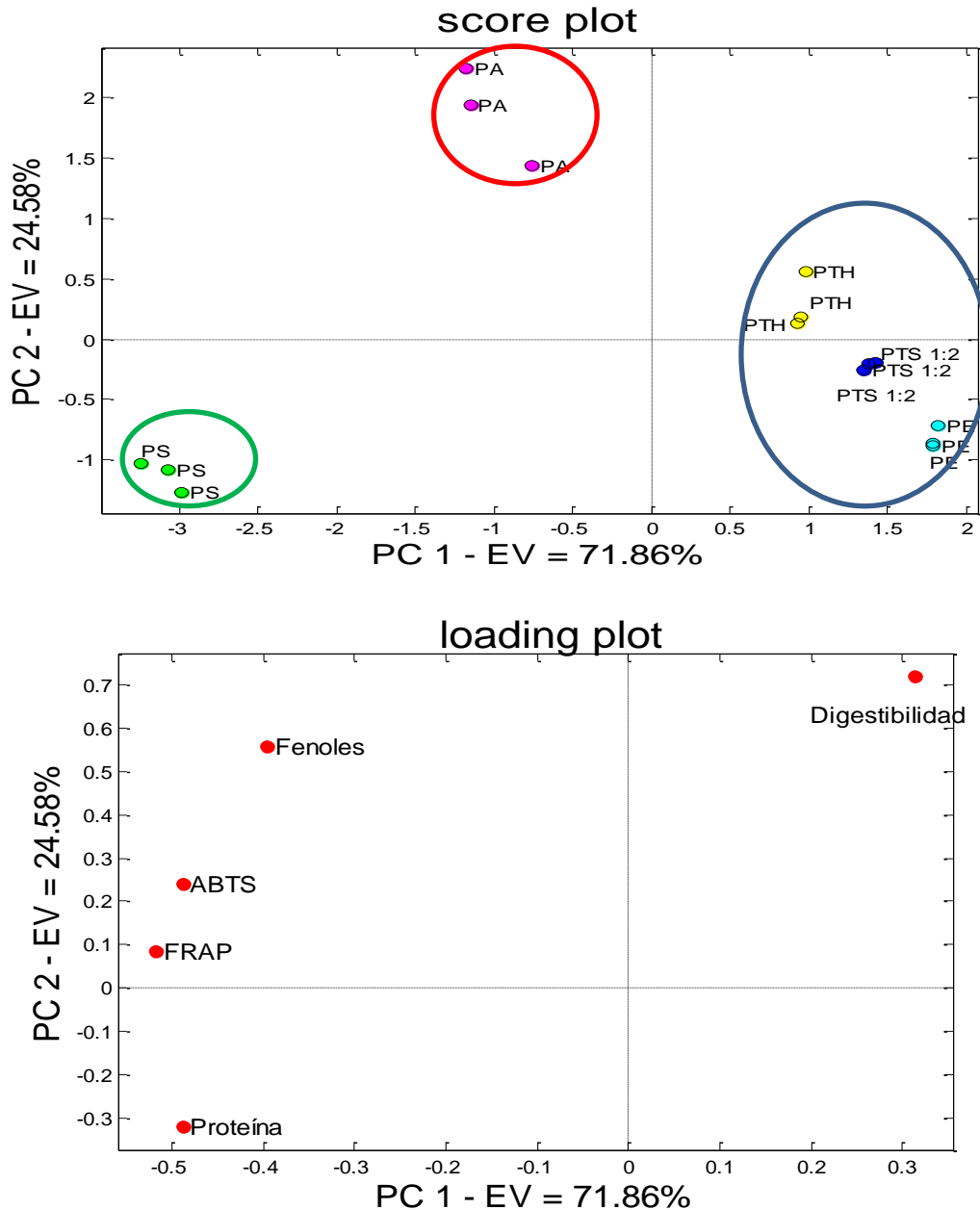
Se concluye que a pesar de evidenciar una disminución en las propiedades antioxidantes del polen pretratado, los valores siguen siendo significativos al compararlos con otras matrices como la mora y el agraz (Bernal, 2012).

Finalmente se demostró que todos los pretratamientos favorecieron la digestibilidad del polen (85% al 98%), como la desnaturalización de la proteína respecto al polen en su estado natural, considerando que podría consumirse sin necesidad de ser fermentado.

### **3.3.2 Estimación estadística de las variables evaluadas en los pretratamientos de forma conjunta**

Para el análisis definitivo de los datos de la figura 3-4 y tabla 3-3, se aplicó un análisis de Componentes Principales (PCA), para evaluar con mayor claridad el efecto de cada variable. En la figura 3-5, se presentó el *score plot* y el *loading plot* del componente principal extraído que explicó un 96% de la varianza de los datos. Se observó diferencias notables sobre el polen seco (PS) y el polen pretratado, al presentar mayor digestibilidad y menor proteína. De forma general se detalló que los antioxidantes, disminuyeron para los diferentes pretratamientos excepto para fenoles.

**Figura 3-5.** *Score plot* y *Loading plot* de los Componentes Principales (PCA) de las variables evaluadas en los diferentes pretratamientos.



**PS:** Polen seco sin pretratamiento, **PTS 1:2:** Polen con pretratamiento térmico seco polen-agua 1:2, **PTH:** Polen con pretratamiento térmico húmedo, **PE:** Polen con pretratamiento enzimático, **PA:** Polen con pretratamiento alcalino.

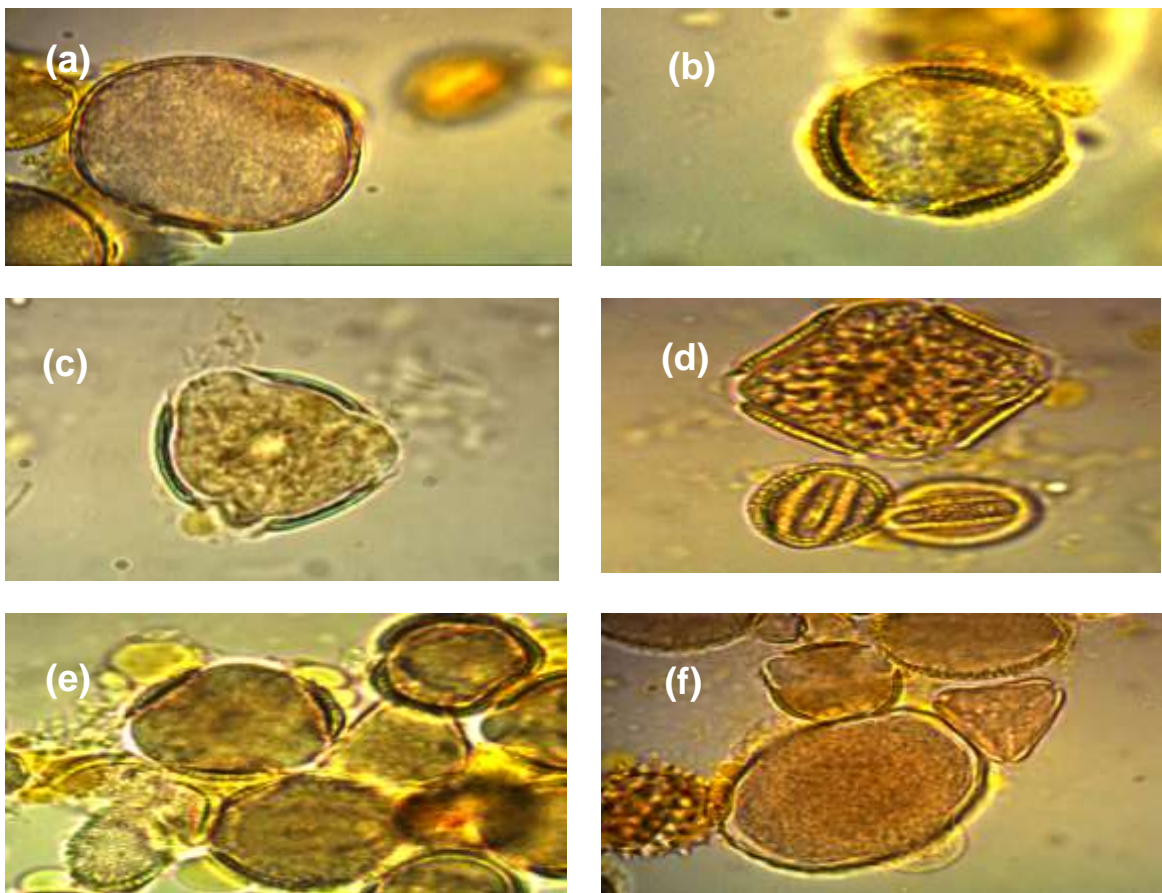
Para el componente principal extraído, se aplicó ANOVA (Anexo E) para evaluar el efecto de los pretratamientos y encontrar mediante Tukey que todos los pretratamientos presentaron vectores de medias diferentes, al indicar que existe diferencia significativa

sobre cada una de las variables mencionadas respecto a los pretratamientos. Excepto para el pretratamiento alcalino y pretratamiento térmico seco 1:2.

### 3.3.3 Tinción morfología del polen

Al tener en cuenta que se desea evaluar la incidencia de los pretratamientos en la estructura del polen, se realizaron medidas de microscopía óptica expuestas en la figura 3-6, para polen seco sin pretratamiento y polen pretratado de forma térmica, enzimática y alcalina, con el fin de observar los cambios estructurales del polen al estar expuesto a diferentes procesos.

**Figura 3-6.** Micrografías con un aumento de 100X de la estructura de polen apícola sin pretratamiento y con pretratamientos.



**En (a) Morfología 1 del polen seco sin pretratamiento, (b) Morfología 2 del polen seco sin pretratamiento, (c) Polen con pretratamiento térmico seco 1:2, (d) Polen con pretratamiento térmico húmedo, (e) Polen con pretratamiento enzimático, (f) Polen con pretratamiento alcalino.**

Se pudo observar en (a) una morfología ovalada, sin aberturas y homogénea, mientras en (b) se diferencia por presentar tres bordes gruesos en la pared primaria y de forma circular, sin embargo las dos morfologías se destacan porque presentan una estructura

definida donde se resalta la exina. En (c) se presenta el polen sometido a tratamiento térmico, al encontrar una deformación en la pared celular de varias morfologías. En la morfología (d) polen con pretratamiento térmico húmedo se evidenció deformación de la estructura. Mientras en la micrografía (e) pretratamiento enzimático, también se observó una degradación en la estructura externa del polen (f) que corresponde al polen tratado de forma alcalina se evidencio una fractura y deformación de la exina, en cuanto a la micrografía.

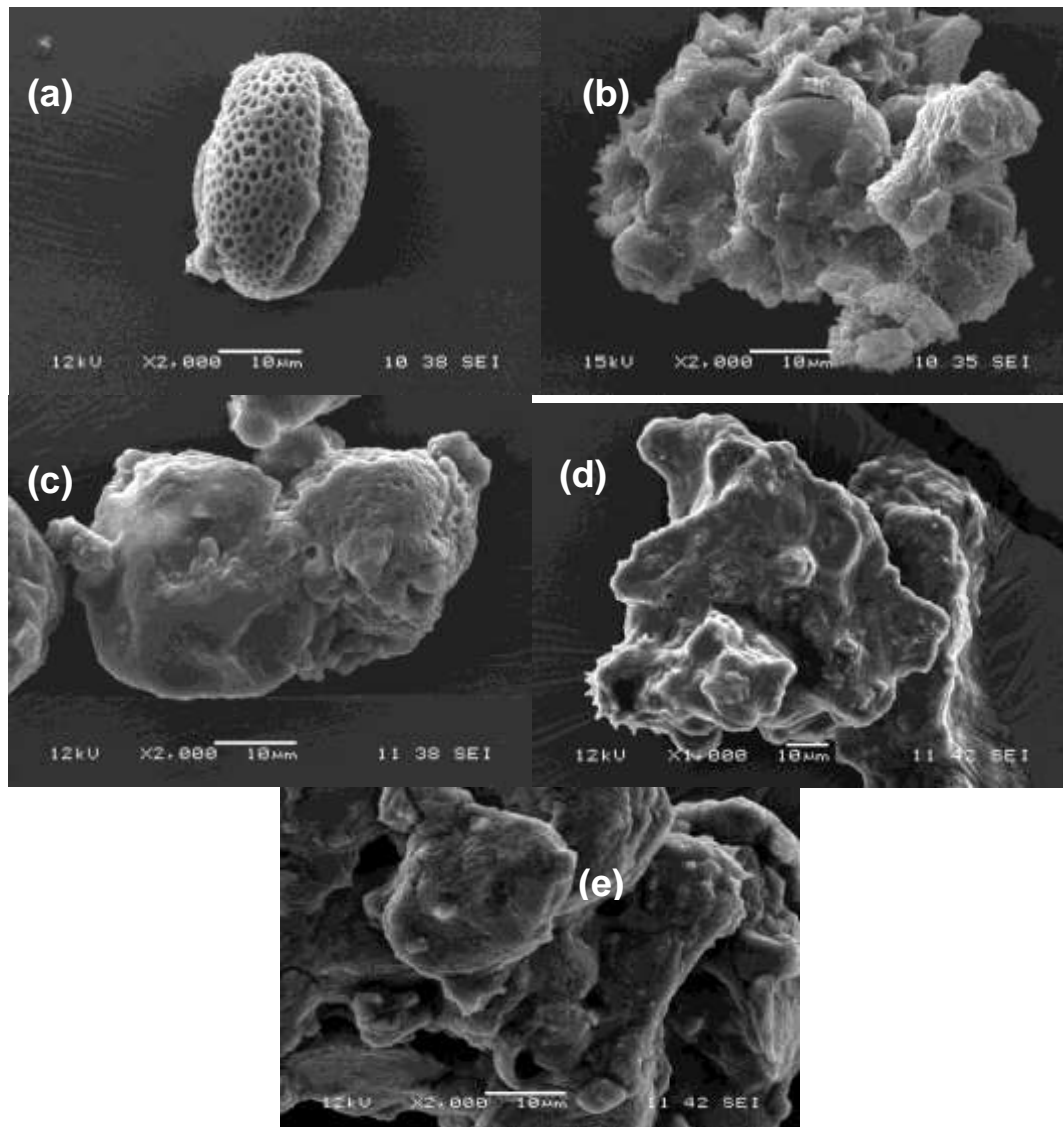
Por otro lado, la mayoría de estudios que reportan en la literatura este tipo de técnica, están enfocados al origen botánico del polen, sin embargo se demostró que puede ser aplicada para otro tipo de análisis.

#### **3.3.4 Morfología del polen sin tratar y pretratado mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).**

En la figura 3-7 se presenta micrografías del polen sin tratar y pretratado mediante MEB al apreciar de forma global para el polen pretratado deformación, hinchazón, abertura y perdida de uniformidad para las diferentes estructuras de los granos de polen excepto para el polen en su estado natural figura 3-7 (a). Se corroboró estos resultados con el análisis de la tinción morfológica del polen expuesto en la figura 3-6, concluyó que la estructura del polen pretratado presentó un cambio prominente para la capa externa, al obtener un polen más digerible y disponible según los resultados expuestos anteriormente.



**Figura 3-7.** Micrografías con un aumento de 2000X y 1000X de la estructura de polen apícola sin pretratamiento y con pretratamientos, por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.



**En (a) Morfología del polen seco sin pretratamiento, (b) polen con pretratamiento térmico seco 1:2, (c) polen con pretratamiento térmico húmedo, (d) polen con pretratamiento enzimático, (e) polen con pretratamiento alcalino.**

Las figuras 3-6 y 3-7 corresponden al polen pretratado térmicamente, que concuerda con las micrografías de microscopía electrónica de barrido, expuesta por otros autores (Fuenmayor, 2009; Salazar, 2014), donde demuestran que este proceso incidió en la estructura del polen, con el fin de ser acondicionado microbiológicamente antes de la fermentación.

De hecho, se puede concluir que los pretratamientos afectan de forma notoria la estructura del polen en comparación al polen seco sin tratamiento, al aplicar microscopía óptica y electrónica de barrido, lo cual coincide con los resultados presentados en la figura 3-4 y la tabla 3-3 sobre la desnaturalización de las proteínas y el incremento en la digestibilidad de esta matriz.

### 3.4 Fermentación láctica del polen apícola con diferentes pretratamientos.

#### 3.4.1 Indicadores de proceso en la fermentación con *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205, para el polen con pretratamiento térmico seco.

En la tabla 3-4, puede evidenciarse para el pretratamiento térmico seco con una relación polen:agua 1:2 neutralizado, un incremento en la acidez para los tres cultivos, sin embargo *L.acidophilus* indicó un mayor crecimiento respecto a los demás, al destacar que a las 21 horas presentó un valor de 2,33% de acidez total, al ser el punto más alto de esta fermentación. Mientras a las 24 horas no presentó cambios apreciables durante el tiempo, para los tres cultivos lácticos. A diferencia de otros estudios (Fuenmayor, 2009), Yomix@205 y *L.acidophilus* presentaron un cambio significativo de acidez al pasar las 45 horas de seguimiento.

**Tabla 3-4.** Comportamiento de la acidez total (%) del polen con pretratamiento térmico seco, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

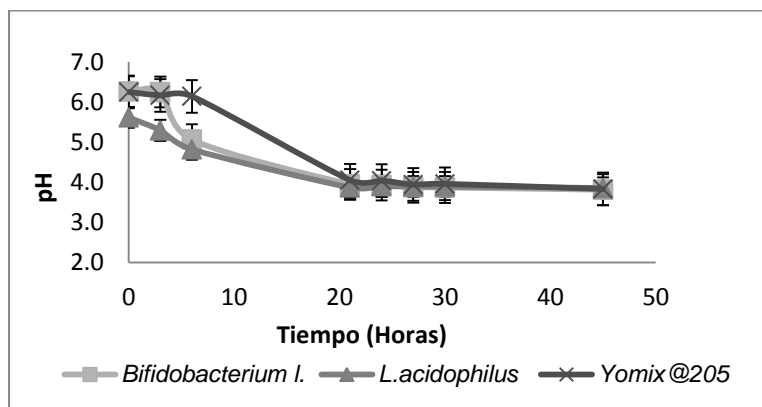
Tiempo (Horas)	Acidez total (%)		
	<i>Bifidobacterium l.</i>	<i>L.acidophilus</i>	Yomix@205
0	0,37±0,02	0,63±0,02	0,37±0,01
3	0,37±0,03	0,75±0,01	0,38±0,01
6	0,57±0,01	0,85±0,01	0,39±0,03
21	1,45±0,01	2,33±0,04	1,17±0,05
24	1,48±0,06	2,23±0,03	1,19±0,02
27	1,65±0,01	2,18±0,04	1,42±0,03
30	1,67±0,02	2,23±0,01	1,38±0,03
45	1,88±0,02	2,34±0,02	1,73±0,02

\*Acidez total expresada en ácido láctico

En la figura 3-8, se establecen los resultados obtenidos de pH para la fermentación del polen con pretratamiento térmico seco. Al apreciar curvas típicas de fermentación láctica, con un decrecimiento notorio de pH para el cultivo puro *L.acidophilus*, al ser un comportamiento que se esperaba al considerar la acidez desarrollada. Se detalla una tendencia más estable a las 24 horas para los tres cultivos al no presentar cambios relevantes en el pH, con valores más constantes hasta las 45 horas.

Para el recuento de bacterias lácticas durante la fermentación del polen, se consideró la normatividad establecida en Colombia como la Norma técnica Colombiana 805 y el reporte de diferentes estudios (Collado Amores, 2004; FAO y OMS, 2006; Heller, 2008), donde destacan que un alimento presenta una carga adecuada de microorganismos probióticos, cuando cumple al menos  $10^6$  UFC/g (número mínimo de microorganismos viables).

**Figura 3-8.** Comportamiento del pH del polen con pretratamiento térmico seco, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.



En la tabla 3-5 se analizó tres puntos en el tiempo al considerar el cambio de pH y acidez total para cada cultivo según los resultados expuestos en la tabla 3-4 y figura 3-8. Se encontró que el cultivo puro *L.acidophilus* presentó mayor concentración de microorganismos  $1,1 \times 10^8$  UFC/g, respecto al cultivo mixto  $9,8 \times 10^7$  UFC/g y *Bifidobacterium lactis*  $1,4 \times 10^7$  UFC/g, después de 21 horas de fermentación. Estos resultados permiten afirmar que se cumplió con los requisitos establecidos con la legislación nacional al cumplir con una concentración mínima de microorganismos para los tres cultivos.

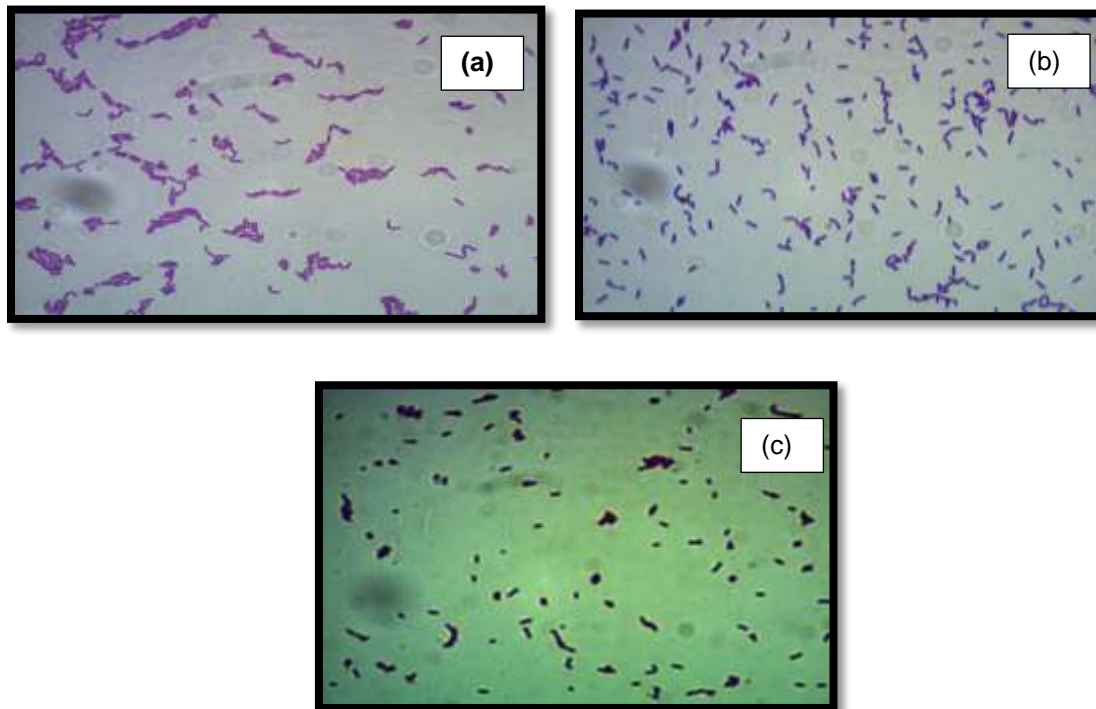
**Tabla 3-5.** Recuento de células viables del polen pretratado térmico seco y fermentado con *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Cultivos	UFC/g
0	<i>L.acidophilus</i>	$4,0 \times 10^7$ <sup>a</sup>
6		$4,6 \times 10^7$ <sup>b</sup>
21		$1,1 \times 10^8$ <sup>c</sup>
0	Yomix@205	$2,6 \times 10^6$ <sup>a</sup>
6		$8,0 \times 10^6$ <sup>b</sup>
21		$9,8 \times 10^7$ <sup>c</sup>
0	<i>Bifidobacterium lactis</i>	$8,6 \times 10^6$ <sup>a</sup>
6		$1,8 \times 10^7$ <sup>b</sup>
21		$1,4 \times 10^7$ <sup>c</sup>

\*Letras distintas para cada recuento de células viables indican diferencias significativas en cada cultivo, con un nivel de confianza del 95%.

Para este pretratamiento se verificó la morfología de los diferentes microorganismos empleados para fermentar. En la figura 3-9, se logró identificar mediante tinción de Gram en (a) *Lactobacillus acidophilus* al encontrar efectivamente bacilos agrupados (b) bacilos más cortos y en forma de Y o T, en (c) se encontró diferentes morfologías, como cocos y bacilos.

**Figura 3-9.** Morfología los cultivo puros a) *Lactobacillus acidophilus* y b) *Bifidobacterium Lactis* y el cultivo mixto c) Yomix@205, mediante tinción de Gram.



Al contrastar este resultado con reportes de diferentes autores (Arenas, Zapata, Gutierrez, 2012), es claro que existen otros factores como la concentración, tipo de proteína, azúcares, contenido de grasa, pH que pueden afectar el desarrollo y supervivencia de los diferentes cultivos iniciadores con características probióticas.

En la tabla 3-6, se presenta una cuantificación de análisis de azúcares para tres tiempos 0, 6 y 21 horas, al considerar las curvas de pH y acidez total, con el fin de obtener más información sobre la fermentación. Se observó que la glucosa y fructosa disminuyeron al pasar las horas de fermentación, al ser posible por el metabolismo de los microorganismos para obtener energía a través de su ruta fermentativa. Estos resultados concuerdan con el estudio de (Fuenmayor, 2009), sin embargo, la maltosa presentó un bajo porcentaje al inicio de la fermentación con el cultivo Yomix@205 y *Bifidobacterium l.*, y desaparece a las 6 horas, mientras en el cultivo *L.acidophilus* solo presenta a las 21 horas, hecho posible por la estructura compleja del polen que libera algunos compuestos nutricionales durante el pretratamiento y que son de consumo inmediato al inicio de la fermentación, no obstante existe un agotamiento de estos compuestos al pasar el tiempo y

algunos microorganismos tienen que iniciar a liberar diferentes enzimas digestivas (proteasas, lipasas, carbohidrasas) a través de su metabolismo, para terminar de degradar la exina y acelerar el metabolismo, para generar ruptura en la macromolécula y tener disponibles algunos compuestos nutricionales como la maltosa (Puerta, 2010).

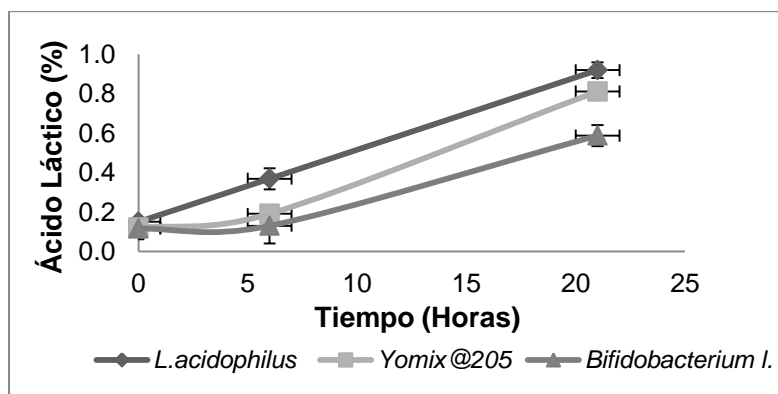
**Tabla 3-6.** Perfil de azúcares para el polen con pretratamiento térmico seco sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Cultivos	Glucosa (%)	Fructosa (%)	Maltosa (%)
0	<i>L.acidophilus</i>	2,90	10,9	---
6		2,17	8,90	---
21		1,00	8,98	1,00
0	Yomix@205	2,79	10,52	0,28
6		2,74	11,06	---
21		1,26	10,52	---
0	<i>Bifidobacterium l.</i>	3,87	10,66	0,30
6		1,99	9,86	---
21		1,93	10,15	---

--- No fueron detectados

En la figura 3-10, se observó para los tres cultivos un incremento en las concentraciones de ácido láctico al pasar el tiempo de fermentación. Este hecho concuerdan con el comportamiento típico de las BAL, al producir de manera predominante ácido láctico, principalmente por la fermentación de carbohidratos simples (Holzapfel, Haberer, Geisen, Bjorkroth & Shcillinger, 2001). Estos resultados no coinciden con otros estudios (Fuenmayor, 2009), ya que se comprobó un incremento de ácido láctico progresivo hasta las 21 horas, hecho que se esperaba debido a la ruta metabólica y la acidez desarrollada. En el Anexo F, se destacó que existen otros ácidos generados en la fermentación, sin embargo no son predominantes en el tiempo en comparación al ácido láctico.

**Figura 3-10.** Producción de ácido láctico para el polen con pretratamiento térmico seco sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.



En la tabla 3-7, se recopiló las variables nutricionales para el polen fermentado con los tres cultivos. Al evidenciar una disminución de la proteína a partir de las 6 horas para los tres cultivos, debido al consumo inmediato de aminoácidos liberados durante el pretratamiento sin embargo a las 21 horas presentó un ligero incremento para *L.acidophilus* y *Bifidobacterium L.*, hecho posible por el metabolismo de los microorganismos al liberar enzimas como proteasas para actuar sobre los enlaces peptídicos de las macromoléculas proteicas que no fueron liberadas durante el pretratamiento (Castro et al., 2014; Sánchez, 2010). Mientras la digestibilidad fluctúan para *L.acidophilus* y *Bifidobacterium L.*, hecho posible al metabolismo de los microorganismos en esta matriz vegetal, liberando algunos compuestos nutricionales durante la fermentación, sin embargo la actividad antioxidante permaneció constante para los tres tiempos de cada cultivo. En cambio el cultivo Yomix@205 presentó un incremento de fenoles a las 21 horas, debido a la deformación de la pared celular del polen compuesta por ligninas, donde se liberan fenoles después de la fermentación (Zuluaga, 2014).

**Tabla 3-7.** Valores de proteína, digestibilidad, capacidad antioxidante y fenoles, para el polen fermentado con los tres cultivos después de aplicar pretratamiento térmico seco.

Tiempo (Horas)	CULTIVOS	Proteína (%) método de Bradford	Digestibilidad (%)	FRAP (mM Trolox/ g polen)	ABTS (mM Trolox/ g polen)	Fenoles (mg ácido gálico/ g polen)
0	<i>L.acidophilus</i>	4,419±0,070 <sub>a</sub>	88,293±0,014 <sub>a</sub>	0,007±0,005 <sub>a</sub>	0,021±0,001 <sub>a</sub>	14,765±0,669 <sub>a</sub>
6		2,994±0,008 <sub>b</sub>	86,720±0,083 <sub>b</sub>	0,007±0,005 <sub>a</sub>	0,018±0,002 <sub>a</sub>	11,447±0,561 <sub>a</sub>
21		3,040±0,023 <sub>c</sub>	89,453±0,054 <sub>a</sub>	0,007±0,005 <sub>a</sub>	0,020±0,002 <sub>a</sub>	10,382±0,846 <sub>a</sub>
0	Yomix@205	4,419±0,141 <sub>a</sub>	89,798±0,078 <sub>a</sub>	0,007±0,005 <sub>a</sub>	0,021±0,002 <sub>a</sub>	9,986±0,614 <sub>a</sub>
6		3,021±0,016 <sub>b</sub>	84,837±0,105 <sub>b</sub>	0,007±0,004 <sub>a</sub>	0,022±0,001 <sub>a</sub>	11,012±0,987 <sub>a</sub>
21		2,861±0,008 <sub>b</sub>	89,538±0,006 <sub>a</sub>	0,008±0,004 <sub>a</sub>	0,024±0,001 <sub>a</sub>	17,304±1,210 <sub>b</sub>
0	<i>Bifidobacterium L.</i>	4,420±0,007 <sub>a</sub>	88,290±0,004 <sub>a</sub>	0,008±0,003 <sub>a</sub>	0,022±0,001 <sub>a</sub>	10,517±1,252 <sub>a</sub>
6		3,090±0,008 <sub>b</sub>	88,300±0,028 <sub>a</sub>	0,007±0,004 <sub>a</sub>	0,023±0,001 <sub>a</sub>	10,881±1,480 <sub>a</sub>
21		3,101±0,003 <sub>c</sub>	89,045±0,301 <sub>b</sub>	0,007±0,004 <sub>a</sub>	0,024±0,001 <sub>a</sub>	10,792±0,078 <sub>a</sub>

\*Los valores experimentales que presentan letras distintas en cada cultivo, indican diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%.

En la tabla 3-8, se observó para el polen pretratado un leve incremento de aminoácidos esenciales (Fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano, valina) en comparación al polen sin tratar. Mientras el polen fermentado presentó una leve disminución de aminoácidos en comparación al pretratado y polen seco sin tratar. Este resultado corrobora con otros estudios de BAL, al destacar que cuando se agota los carbohidratos como fuente de energía, los microorganismos pueden aprovechar otros nutrientes como proteínas y grasas del sustrato (Agudelo, 2010).

**Tabla 3-8.** Perfil de aminoácidos para el polen con pretratamiento térmico seco, y fermentado con *L.acidophilus* a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas.

Aminoácidos	Polen seco (%)	Polen pretratamiento térmico seco (%)	Polen Fermentado con <i>L.acidophilus</i> (%)	Polen Fermentado con Yomix@205 (%)
Aspartato	1,54	1,87	1,70	1,55
Glutamato	<b>1,66</b>	<b>2,20</b>	1,92	1,81
Serina	0,56	0,93	0,69	0,59
<b>Histidina</b>	1,59	2,64	1,90	1,73
Glicina	0,43	0,52	0,37	0,50
<b>Treonina</b>	0,21	0,31	<b>0,61</b>	0,26
Arginina	0,49	0,69	0,53	0,44
Alanina	0,59	0,89	0,65	0,63
Tirosina	0,30	0,56	0,45	0,40
<b>Valina</b>	0,42	0,66	0,48	0,47
<b>Fenilalanina</b>	0,45	0,71	0,56	0,42
<b>Isoleucina</b>	0,52	0,66	0,54	0,57
<b>Leucina</b>	0,65	1,05	<b>0,73</b>	<b>0,74</b>
<b>Lisina</b>	0,24	0,33	0,24	0,25
Prolina	0,56	0,84	0,56	0,48
Glutamina	***	***	***	***

\*\*\* No fueron detectados. La escala de color hace referencia el tono más oscuro mayor concentración y el más claro el de menor concentración.

**Fuente:** Perfil de aminoácidos generados por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. En el Anexo G, se reporta el informe del Laboratorio.

En la tabla 3-9, se logró evidenciar un incremento de ácidos grasos para el polen pretratado y fermentado respecto al polen en su estado natural, destacando dos ácidos grasos esenciales para la salud de las personas: ácido linoleico (omega 6) y ácido linolénico (omega 3). Destacando un incremento de ácido linoleico 318,5 mg/100gr del polen en su estado natural al polen pretratado 534,4 mg/100gr y un comportamiento similar para el ácido linolénico de 1.302,2 mg/100gr a 2.497,7 mg/100gr en polen pretratado, sin embargo el polen fermentado presentó una disminución de ácidos grasos esenciales en comparación al polen pretratado, hecho posible al metabolismo de los microorganismos para su crecimiento. Estos resultados son de gran interés ya que los ácidos grasos son suministrados eventualmente por otros alimentos como plantas y pescados grasos.

**Tabla 3-9.** Composición de ácidos grasos para el polen con pretratamiento térmico seco, y fermentado con *L.acidophilus* a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas.

Ácidos grasos	Polen (mg/100gr)	Polen pretratamiento térmico seco (mg/100gr)	Polen Fermentado con <i>L.acidophilus</i> (mg/100gr)	Polen Fermentado con Yomix@205 (mg/100gr)
Ácido hexanóico	---	8,6	---	---
Ácido octanóico	---	7,4	---	---
Ácido Cáprico	---	---	---	---
Ácido Láurico	121,8	147,8	108,0	77,1
Ácido Mirístico	28,0	34,1	25,8	15,8
Ácido Palmítico	344,1	636,2	517,8	391,8
Ácido Esteárico	36,4	46,7	33,0	21,4
Ácido Oleico	151,3	187,1	129,4	88,6
<b>Ácido Linoleico</b>	318,5	534,4	379,6	260,9
<b>Ácido Linolénico</b>	1.302,2	2.497,7	2.204,9	1.661,3
Ácido Araquídico	---	---	---	---
Ácido Behénico	---	---	---	---
Ácido Lignocérico	---	---	---	---

--- No fueron detectados. La escala de color hace referencia el tono más oscuro mayor concentración y el más claro el de menor concentración.

**Fuente:** Determinación ácidos grasos generados por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. En el Anexo G, se reporta el informe del Laboratorio.

### 3.4.2 Indicadores de proceso en la fermentación con *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205, para el polen con pretratamiento térmico húmedo.

En la tabla 3-10 se presentan los resultados para acidez total durante la fermentación, con *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205, del polen con pretratamiento térmico húmedo. Al observar las curvas típicas de fermentación láctica para el cultivo puro *L. acidophilus* y el cultivo mixto Yomix@205, mientras el cultivo puro *Bifidobacterium lactis* no presentó ningún cambio significativo. Diferentes autores reportan que la *Bifidobacterium* requiere para su crecimiento aminoácidos disponibles y un pH adecuado (Arenas, Zapata & Gutierrez, 2012; Collado, 2004; Farnworth, Mainville, Desjardins, Gardner, Fliss & Champagne, 2007), esto indica que depende de la disponibilidad de nutrientes el microorganismos cumplirá con sus necesidades.



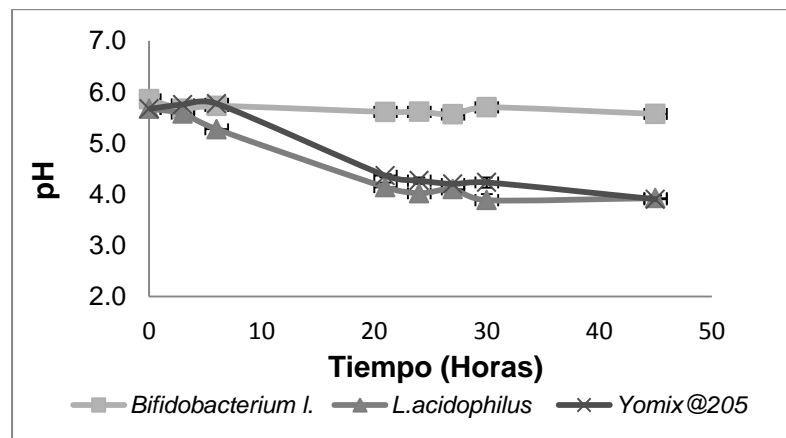
**Tabla 3-10.** Comportamiento de la acidez total del polen con pretratamiento térmico húmedo, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Acidez total (%)		
	<i>Bifidobacterium l.</i>	<i>L.acidophilus</i>	Yomix@205
0	0,48±0,02	0,50±0,05	0,52±0,02
3	0,52±0,04	0,54±0,01	0,49±0,04
6	0,50±0,02	0,61±0,05	0,46±0,06
21	0,52±0,05	1,55±0,01	1,10±0,05
24	0,53±0,02	1,75±0,08	1,23±0,08
27	0,54±0,03	1,78±0,13	1,32±0,09
30	0,53±0,01	1,88±0,03	1,40±0,03
45	0,54±0,01	2,14±0,01	1,98±0,05

\*Acidez total expresada en ácido láctico

Como se puede observar en la figura 3-11, el polen con pretratamiento térmico húmedo y fermentado con dos cultivos puros y uno mixto, presenta un pH con un decrecimiento después de las 6 horas para *L.acidophilus* y Yomix@205 para mantenerse constante hasta las 45 horas, sin embargo esta conducta no la presentó *Bifidobacterium lactis*, ya que algunos estudios (Collado, 2004) resaltan que el pH requerido para el crecimiento de estos microorganismos oscila entre 6,5 – 7, mientras a pH menores presenta un crecimiento lento o incluso nulo, sin presentar fermentación y desarrollo de acidez.

**Figura 3-11.** Comportamiento del pH para el polen con pretratamiento térmico húmedo, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.



En la tabla 3-11 se presenta que el cultivo mixto inicia con una concentración de microorganismo de  $10^6$  UFC/g, sin embargo a las 6 horas presentó un crecimiento  $10^{10}$  UFC/g, al llegar a disminuir su concentración  $10^8$  UFC/g a las 21 horas, mientras el cultivo puro *L. acidophilus* inició con una concentración de  $10^8$  UFC/g, al alcanzar obtener  $10^9$  UFC/g a las 6 y mantenerse hasta las 21 horas. Mientras *Bifidobacterium lactis* no

creció al ser coherente con las cinéticas de acidez desarrollada y pH, principales factores para perder la viabilidad para algunas bacterias lácticas, al disminuir el pH del medio y acumular ácidos orgánicos como resultado del crecimiento de los microorganismos y la fermentación ácido láctica (Collado, 2004)

**Tabla 3-11.** Recuento de células viables del polen con pretratamiento térmico calor húmedo, fermentado con *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Cultivos	UFC/g
0	<i>L.acidophilus</i>	1,0x10 <sup>8a</sup>
6		1,2x10 <sup>9b</sup>
21		1,2x10 <sup>9b</sup>
0	Yomix@205	5,0x10 <sup>6a</sup>
6		1,5x10 <sup>10b</sup>
21		8,5x10 <sup>8c</sup>
0	<i>Bifidobacterium L.</i>	<10
6		<10
21		<10

\*Letras distintas para cada recuento de células viables indican diferencias significativas en cada cultivo, con un nivel de confianza del 95%.

Mediante este pretratamiento se comprueba que los cultivos expuestos en la tabla 3-11, fueron capaces de utilizar los nutrientes del polen pretratado y alcanzar recuentos significativos de células viables que los pretratamientos anteriores, al lograr 1,2x10<sup>9</sup> UFC/g con *L.acidophilus* y 1,5x10<sup>10</sup> UFC/g con Yomix@205 después de las 6 horas de fermentación, mientras *Bifidobacterium L.* no presentó un recuento significativo, al ser resultados que concuerdan con el comportamiento de la acidez y el pH. De hecho se encontró un conteo superior 10<sup>9</sup> a 10<sup>10</sup> al reportado por (Arenas, Zapata, Gutierrez, 2012), para fermentar leche con adición de quinua.

Se pudo observar en la tabla 3-12 un incremento de glucosa a las 6 horas y una disminución a las 21 horas, mientras la fructosa presentó un leve incremento a las 6 horas para los dos cultivos. Sin embargo la mayoría de microorganismos por su naturaleza utilizan glucosa para sus actividades metabólicas. Mientras la maltosa presentó un incremento a las 21 horas con el cultivo Yomix@205, comportamiento similar al perfil de azúcares del pretratamiento térmico seco, ya que los compuestos nutricionales fluctúan por el metabolismo de los microorganismos y la matriz compleja del polen.

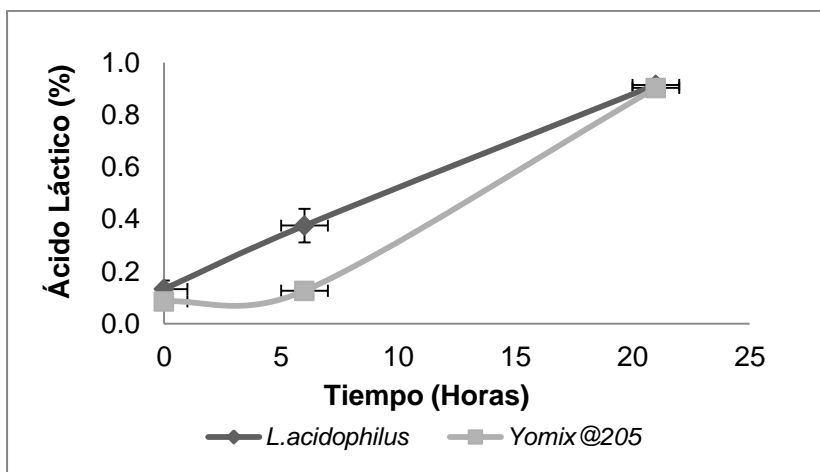
**Tabla 3-12.** Perfil de azúcares para el polen con pretratamiento térmico calor húmedo sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus* - Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Cultivos	Glucosa (%)	Fructosa (%)	Maltosa (%)
0	<i>L.acidophilus</i>	1,00	13,74	---
6		5,13	14,35	---
21		3,22	12,86	---
0	Yomix@205	4,62	10,55	0,53
6		4,88	12,97	---
21		3,63	12,01	1,43

--- No fueron detectados

En la figura 3-12 se encontró que el cultivo puro *L.acidophilus*, generó un porcentaje alto de ácido láctico en comparación al cultivo mixto Yomix. Al ser el ácido más relevante respecto a cualquier otro ácido que fuera expuesto en el Anexo F, comportamiento que se espera por el metabolismo de los diferentes microorganismos.

**Figura 3-12.** Producción de ácido láctico para el polen con pretratamiento térmico húmedo sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.



En la tabla 3-13, se pudo encontrar una disminución de la proteína para los diferentes tiempos y un incremento para la digestibilidad a las 21 horas, comportamiento similar a los demás pretratamientos que se analizaron anteriormente. Sin embargo, presentó una disminución para *L.acidophilus* y Yomix@205 a las 6 y 21 horas en FRAP, en ABTS fluctúa los valores, con una diferencia entre las 6 y 21 horas para *L.acidophilus*, mientras Yomix@205 no manifestó diferencia. Respecto a los fenoles presentó un incremento para *L.acidophilus* a las 6 horas y una disminución para Yomix@205.

**Tabla 3-13.** Capacidad antioxidante y fenoles en el polen con pretratamiento térmico calor húmedo, fermentado con *L.acidophilus* - Yomix@205.

Tiempo (Horas)	CULTIVOS	Proteína (%) Método de Bradford	Digestibilidad (%)	FRAP (mM Trolox/ g polen)	ABTS (mM Trolox/ g polen)	Fenoles (mg ácido gálico/ g polen)
0	<i>L.acidophilus</i>	5,352±0,259 <sub>a</sub>	90,407±0,062 <sub>a</sub>	0,007±0,006 <sub>a</sub>	0,025±0,001 <sub>ab</sub>	15,961±0,723 <sub>a</sub>
6		3,371 ±0,016 <sub>b</sub>	89,600±0,094 <sub>b</sub>	0,007±0,005 <sub>a</sub>	0,028±0,002 <sub>b</sub>	25,953±1,030 <sub>b</sub>
21		3,598 ±0,064 <sub>b</sub>	92,304±0,970 <sub>c</sub>	0,007±0,006 <sub>a</sub>	0,023±0,002 <sub>a</sub>	18,464±1,234 <sub>c</sub>
0	Yomix@205	5,362±0,127 <sub>a</sub>	91,413±0,072 <sub>a</sub>	0,007±0,008 <sub>a</sub>	0,026±0,002 <sub>a</sub>	16,365±1,140 <sub>a</sub>
6		3,550±0,018 <sub>b</sub>	92,398±0,566 <sub>b</sub>	0,007±0,004 <sub>a</sub>	0,025±0,001 <sub>a</sub>	12,518±0,940 <sub>b</sub>
21		3,441±0,114 <sub>c</sub>	96,984±0,066 <sub>c</sub>	0,007±0,005 <sub>a</sub>	0,025±0,001 <sub>a</sub>	15,704±0,658 <sub>a</sub>

\*Los valores experimentales que presentan letras distintas en cada cultivo, indican diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%.

### 3.4.3 Indicadores de proceso en la fermentación con *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205, para el polen con pretratamiento enzimático.

En la tabla 3-14 se presenta los resultados obtenidos para la acidez durante la fermentación del polen con los tres cultivos lácticos a diferentes tiempos. Se encontró que la acidificación inicia a partir de las 6 horas para los tres cultivos, un crecimiento exponencial hasta las 21 horas, con un mayor incremento para *L.acidophilus* y Yomix@205, se observó diferencia pronunciadas para estos dos cultivos después de las 30 horas. Este comportamiento depende de las características de cada microorganismo que influye en la fermentación, ya que los cultivos mixtos se caracterizan por presentar una simbiosis que se basa principalmente en el beneficio del arranque de cada microorganismo que contribuye a la fermentación en comparación a cultivos puros. Mientras la *Bifidobacterium lactis* se caracterizó en todo el proceso de fermentación por desarrollar una baja acidez, hecho que es reportado por diferentes autores para diferentes matrices vegetales (Arenas, Zapata & Gutierrez, 2012).

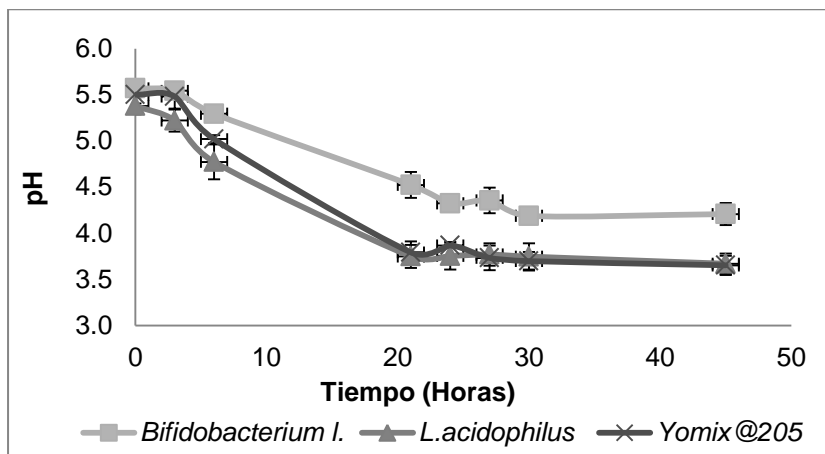
**Tabla 3-14.** Comportamiento de la acidez total del polen con pretratamiento enzimático, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Acidez libre (%)		
	<i>Bifidobacterium l.</i>	<i>L.acidophilus</i>	Yomix@205
0	0,25±0,01	0,28±0,01	0,27±0,06
3	0,27±0,01	0,29±0,01	0,27±0,08
6	0,29±0,01	0,26±0,01	0,26±0,01
21	0,57±0,02	0,86±0,02	0,78±0,01
24	0,52±0,01	0,84±0,01	0,76±0,02
27	0,53±0,04	0,77±0,03	0,87±0,04
30	0,64±0,02	0,85±0,04	0,86±0,03
45	0,67±0,01	1,02±0,07	0,84±0,13

\*Acidez total expresada en ácido láctico

En la figura 3-13 se observaron los resultados obtenidos para el pH del polen durante la fermentación con dos cultivos puros y un cultivo mixto. Al apreciar un comportamiento similar a la curva de acidez desarrollada, se nota hasta las 6 horas un cambio lento de pH para los tres cultivos, y a partir de este tiempo sucede un decrecimiento de pH hasta las 21 horas para *L.acidophilus* y *Yomix@205* con valores finales de 3,7 y 3,7 en comparación a *Bifidobacterium lactis* con un valor final de 4,2.

**Figura 3-13.** Comportamiento del pH del polen con pretratamiento enzimático, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Yomix@205*.



En la tabla 3-15, se observó que al inicio de la fermentación el cultivo puro *L.acidophilus* inicia  $10^7$  UFC/g, al presentar un incremento a  $10^8$  UFC/g a las 6 horas, mientras *Bifidobacterium lactis* inicia con  $10^7$  UFC/g con un incremento de  $10^8$  UFC/g a las 21 horas y el cultivo mixto *Yomix@205*, inicio con  $10^8$  UFC/g manifiesta decrecimiento a las 6 horas y crecimiento a las 21 horas con un valor de  $10^8$  UFC/g, estos valores superan el valor que se estableció en las normas nacionales.

**Tabla 3-15.** Recuento de células viables del polen pretratado enzimáticamente y fermentado con *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y *Yomix@205*.

Tiempo (Horas)	Cultivos	UFC/g
0	<i>L.acidophilus</i>	$5,0 \times 10^{7a}$
6		$3,6 \times 10^{8b}$
21		$9,1 \times 10^{7c}$
0	<i>Yomix@205</i>	$1,8 \times 10^{8a}$
6		$2,1 \times 10^{7b}$
21		$4,9 \times 10^{8c}$
0	<i>Bifidobacterium l.</i>	$8,0 \times 10^{7a}$
6		$9,0 \times 10^{7b}$
21		$3,5 \times 10^{8c}$

\*Letras distintas para cada recuento de células viables indican diferencias significativas en cada cultivo, con un nivel de confianza del 95%.

Este hecho podría explicarse por la alta disponibilidad de nutrientes del polen hidrolizado enzimáticamente y adecuación de parámetros para la actividad de la enzima hidrolasa como pH y la alta relación de agua que beneficiaría de forma indirecta a las bacterias empleadas en la fermentación.

En la tabla 3-16, se presentó un perfil de azúcares, con el fin de generar una idea del consumo para el crecimiento de cada microorganismo. Al encontrar que existe un agotamiento de glucosa para *L.acidophilus* y *Bifidobacterium L.*, a las 21 horas, hecho posible por ser microorganismos que necesitan de la glucosa, mientras Yomix@205 presento un leve incremento. En cambio para la fructosa se evidenció un alto crecimiento para *L.acidophilus* y *Bifidobacterium L.*, comportamiento que podría explicarse por otros autores debido al consumo inmediato de los azúcares reductores como la glucosa y fructosa, al ser necesario degradar otros carbohidratos complejos (Fuenmayor, 2009) e incluso algunos autores (Quicazán, 2012) destacan que los cultivos puros *L. acidophilus* y *S.thermophilus*, tienen la capacidad de degradar la sacarosa e incrementar los monosáridos por una acción catalítica de la  $\alpha$ - y  $\beta$ - galactosidasa, después de 24 horas de fermentación para una bebida de soya. Respecto a la fluctuación que presentó la maltosa para los tres cultivos, se debe a la deformación que manifestó la exina a través del pretratamiento enzimático, liberando algunos nutrientes (Dong, Gao, Wang, Xu, & Zhang, 2015), comportamiento similar al perfil de azúcares en los anteriores pretratamientos.

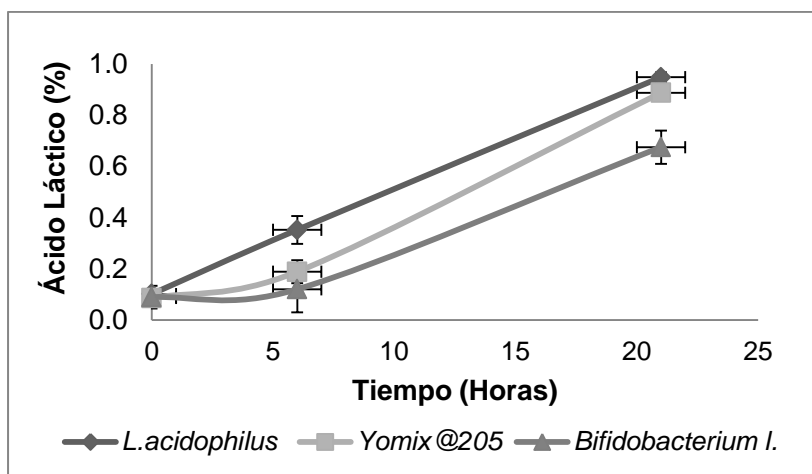
**Tabla 3-16.** Perfil de azúcares para el polen con pretratamiento enzimático sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Cultivos	Glucosa (%)	Fructosa (%)	Maltosa (%)
0	<i>L.acidophilus</i>	1,27	11,27	0,21
6		1,27	12,85	1,31
21		0,90	9,79	---
0	Yomix@205	0,94	11,00	0,86
6		0,91	11,51	---
21		1,31	10,80	---
0	<i>Bifidobacterium l.</i>	0,65	8,83	0,83
6		0,87	11,96	---
21		0,45	12,02	0,24

--- No fueron detectados

En la figura 3-14 se observó un incremento de ácido láctico para los tres cultivos. Se destacó que *L.acidophilus* desarrolló un mayor crecimiento que los otros dos cultivos, sin embargo a las 21 horas alcanzó un valor similar al cultivo Yomix@205. Hecho que podría estar asociado al metabolismo del microorganismo y estar en su punto máximo de crecimiento, donde existe una oxidación notoria de los carbohidratos disponibles, para formar ácido láctico como principal metabolito de la fermentación, sin embargo *Bifidobacterium L.* produce en menor porcentaje ácido láctico (Collado, 2004; Holzapfel, Geisen, Bjorkroth & Shcillinger, 2001). Respecto a los otros ácidos Anexo F, se obtuvo un comportamiento similar a los anteriores procesos expuestos.

**Figura 3-14.** Producción de ácido láctico para el polen con pretratamiento enzimático sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.



En la tabla 3-17 se expone los valores obtenidos de proteína, digestibilidad, FRAP, ABTS y fenoles. En proteína se observó un descenso a las 6 horas y un incremento de proteína a las 21 horas, hecho que podría explicarse al considerar que estos microorganismos no solo requiere carbohidratos, sino otro tipo de nutrientes como aminoácidos (Arenas, Zapata & Gutierrez, 2012). Mientras otros nutrientes como FRAP y ABTS no manifestaron cambios notorios al pasar el tiempo, mientras los fenoles presentaron un incremento para los tres cultivos.

**Tabla 3-17.** Valores de proteína, digestibilidad, capacidad antioxidante y fenoles, para el polen fermentado con los tres cultivos después de aplicar pretratamiento enzimático.

Tiempo (Horas)	Cultivos	Proteína (%) método de Bradford	Digestibilidad (%)	FRAP (mM Trolox/ g polen)	ABTS (mM Trolox/ g polen)	Fenoles (mg ácido gálico/ g polen)
0	<i>L.acidophilus</i>	2,760±0,007 <sub>a</sub>	86,438±0,185 <sub>a</sub>	0,005±0,001 <sub>a</sub>	0,009±0,001 <sub>a</sub>	7,065±0,120 <sub>a</sub>
6		2,705±0,053 <sub>b</sub>	90,883±0,078 <sub>b</sub>	0,005±0,002 <sub>a</sub>	0,011±0,007 <sub>a</sub>	9,843±0,220 <sub>b</sub>
21		3,017±0,045 <sub>b</sub>	92,015±0,570 <sub>c</sub>	0,004±0,001 <sub>a</sub>	0,008±0,002 <sub>a</sub>	9,825±0,057 <sub>b</sub>
0	Yomix@205	2,861±0,002 <sub>a</sub>	83,852±0,953 <sub>a</sub>	0,005±0,002 <sub>a</sub>	0,010±0,005 <sub>a</sub>	7,002±0,599 <sub>a</sub>
6		2,656±0,045 <sub>b</sub>	91,063±0,662 <sub>b</sub>	0,005±0,001 <sub>a</sub>	0,009±0,002 <sub>a</sub>	9,424±0,028 <sub>b</sub>
21		3,067±0,017 <sub>c</sub>	92,647±0,205 <sub>c</sub>	0,005±0,001 <sub>a</sub>	0,010±0,001 <sub>a</sub>	10,751±0,168 <sub>c</sub>
0	<i>Bifidobacterium l</i>	2,861±0,001 <sub>a</sub>	83,939±0,319 <sub>a</sub>	0,004±0,002 <sub>a</sub>	0,009±0,003 <sub>a</sub>	6,939±0,424 <sub>a</sub>
6		2,526±0,051 <sub>b</sub>	95,882±0,228 <sub>b</sub>	0,005±0,001 <sub>a</sub>	0,009±0,005 <sub>a</sub>	8,642±0,101 <sub>b</sub>
21		2,716±0,008 <sub>c</sub>	95,506±0,186 <sub>c</sub>	0,004±0,004 <sub>a</sub>	0,009±0,003 <sub>a</sub>	9,486±0,012 <sub>b</sub>

\*Los valores experimentales que presentan letras distintas en cada cultivo, indican diferencias significativas, con un nivel de confianza del 95%.

En la tabla 3-18, se expone un perfil de aminoácidos al polen con pretratamiento enzimático y fermentado con *L.acidophilus* a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas. Se cuantificó 16 aminoácidos y resalta que 10 son los esenciales para los seres humanos.

**Tabla 3-18.** Perfil de aminoácidos para el polen con pretratamiento enzimático, y fermentado con *L.acidophilus* a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas.

Aminoácidos	Polen seco (%)	Polen pretratamiento térmico seco (%)	Polen Fermentado con <i>L.acidophilus</i> (%)	Polen Fermentado con Yomix@205 (%)
Aspartato	1,54	1,73	1,70	1,77
Glutamato	1,66	2,33	1,97	2,21
Serina	0,56	1,33	1,05	1,19
<b>Histidina</b>	1,59	0,29	0,35	0,31
Glicina	0,43	0,58	0,58	0,63
<b>Treonina</b>	0,21	1,32	1,41	1,45
Arginina	0,49	0,74	0,82	0,77
Alanina	0,59	0,59	0,91	0,94
Tyrosina	0,30	0,55	0,54	0,63
<b>Valina</b>	0,42	0,60	0,59	0,62
<b>Fenilalanina</b>	0,45	0,60	0,60	0,62
<b>Isoleucina</b>	0,52	0,61	0,95	0,97
<b>Leucina</b>	0,65	0,70	0,75	1,50
<b>Lisina</b>	0,24	0,48	0,47	0,80
Prolina	0,56	0,76	0,62	1,01
Glutamina	***	***	***	***

\*\*\* No fueron detectados. La escala de color hace referencia el tono más oscuro mayor concentración y el más claro el de menor concentración.

**Fuente:** Perfil de aminoácidos generados por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. En el Anexo G, se reporta el informe del Laboratorio.

Se observó un incremento de leucina, lisina y prolina para el polen fermentado con Yomix@205, siendo este hecho importante al brindar un valor agregado a este producto al ser aminoácidos esenciales para el ser humano.

En la tabla 3-19, se reporta el efecto del pretratamiento enzimático y la fermentación con *L.acidophilus* a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas, al considerar sus puntos máximos de viabilidad en cada fermentación, esta fracción de grasa en el polen, se analizaron mediante cromatografía de gases.

Se encontró que la fermentación con el cultivo mixto Yomix@205, afecto de forma notoria al presentar una mayor concentración de ácidos grasos que el polen fermentado con el cultivo puro *L.acidophilus*. Sin embargo, las dos fermentaciones presentaron un incremento de todos los ácidos grasos respecto al polen seco y pretratado.



**Tabla 3-19.** Composición de ácidos grasos para el polen con pretratamiento enzimático, y fermentado con *L.acidophilus* a las 6 horas y Yomix@205, a las 21 horas.

Ácidos grasos	Polen seco (mg/100gr)	Polen pretratamiento enzimático (mg/100gr)	Polen Fermentado con <i>L.acidophilus</i> (mg/100gr)	Polen Fermentado con Yomix@205 (mg/100gr)
Ácido hexanóico	---	---	9,9	42,4
Ácido octanóico	---	---	8,7	39,1
Ácido Cáprico	---	---	---	---
Ácido Láurico	121,8	68,7	126,7	508,1
Ácido Mirístico	28,0	14,7	27,8	96,1
<b>Ácido Palmítico</b>	344,1	348,1	567,6	1.976,7
Ácido Esteárico	36,4	22,0	39,0	184,7
Ácido Oleico	151,3	86,3	146,1	440,0
<b>Ácido Linoleico</b>	318,5	283,4	462,9	1.612,1
<b>Ácido Linolénico</b>	1.302,2	1.343,7	2.100,0	6.154,9
Ácido Araquídico	---	---	16,9	73,8
Ácido Behénico	---	---	13,5	52,4
Ácido Lignocérico	---	---	9,6	47,6

--- No fueron detectados. La escala de color hace referencia el tono más oscuro mayor concentración y el más claro el de menor concentración.

**Fuente:** Determinación ácidos grasos generados por el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. En el Anexo G, se reporta el informe del Laboratorio.

Al hacer una comparación sobre los ácidos grasos de la tabla 3-9 y 3-19 se pudo observar un incremento notorio para el polen pretratado enzimáticamente y fermentado con el cultivo mixto Yomix@205 en comparación al polen con pretratamiento térmico seco. Al encontrar las tres familias omega: al ser el principal representante del polen fermentado el omega- 3 que corresponde al ácido linolénico (6.154 mg/100g), omega-6 ácido linoleico (1.612 mg/100g) y omega-9 ácido oleico (440 mg/100g), generalmente reconocidos como benéficos desde el punto de vista nutricional, al ejercer una acción funcional, especialmente al poder adquirir omega-3 y omega-6 que se consideran como esenciales, al no ser sintetizados por el cuerpo humano, siendo necesario consumirlos en cantidades adecuadas (Valenzuela & Sanhueza, 2009).

#### **3.4.4 Indicadores de proceso en la fermentación con *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205, para el polen con pretratamiento alcalino.**

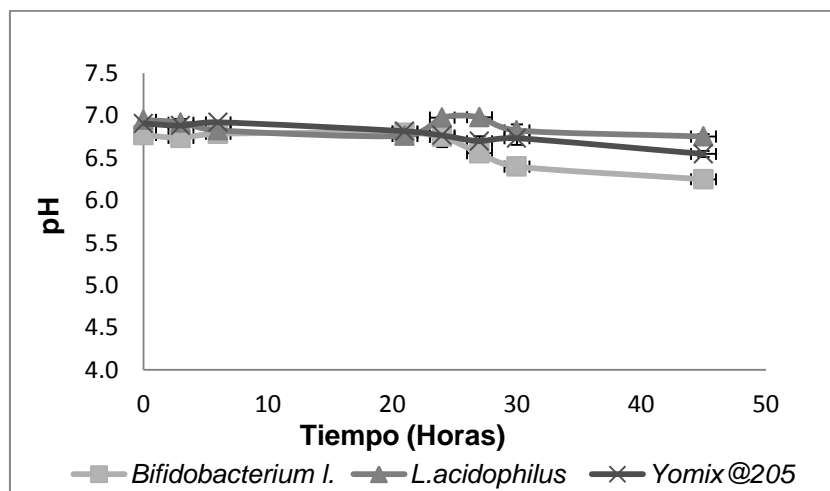
En la tabla 3-20 y figura 3-15, no se encontró diferencias significativas en pH, acidez durante las 45 horas, para el pretratamiento alcalino y los diferentes cultivos, Anexo E. De igual manera no se evidencio recuento de células en la tabla 3-21.

**Tabla 3-20.** Comportamiento de acidez total del polen con pretratamiento alcalino, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Acidez libre (%)		
	<i>Bifidobacterium l.</i>	<i>L.acidophilus</i>	Yomix@205
0	0,18±0,01	0,15±0,03	0,16±0,01
3	0,20±0,04	0,18±0,02	0,17±0,01
6	0,19±0,01	0,18±0,02	0,16±0,02
21	0,19±0,02	0,17±0,01	0,17±0,01
24	0,19±0,01	0,17±0,03	0,17±0,01
27	0,19±0,03	0,17±0,06	0,19±0,05
30	0,19±0,02	0,18±0,02	0,17±0,03
45	0,20±0,01	0,20±0,01	0,21±0,03

\*Acidez total expresada en ácido láctico

**Figura 3-15.** Comportamiento del pH del polen con pretratamiento alcalino, sometido a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.



Otros estudios (Piñeros, Velasco, Proaños, Cortes, Ballesteros, 2011) corroboran estos resultados ya que algunos pretratamientos pueden ser fuertes para la matriz vegetal, y conllevan a la aparición de compuestos tóxicos para todos los microorganismos como furfural o hidroximetil furfural, que se forma por la degradación brusca de la hemicelulosa que inhiben el crecimiento de los microorganismos y se refleja al presentar inhibición en la fermentación para los tres cultivos.

**Tabla 3-21.** Recuento de células viables del polen con pretratamiento alcalino, fermentado con *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	Cultivos	UFC/g
0	<i>L.acidophilus</i>	<10
6		<10
21		<10
0	Yomix@205	<10
6		<10
21		<10
0	<i>Bifidobacterium L.</i>	<10
6		<10
21		<10

Finalmente se comprobó que el polen pretratado no debe prolongarse más 21 horas de fermentación, al considerar los indicadores típicos de fermentación y las propiedades nutricionales. Destacando que los tres cultivos lograron fermentar el polen con el pretratamiento térmico seco y enzimático, mientras el pretratamiento térmico húmedo no fermentó con *Bifidobacterium L.* y el pretratamiento alcalino con ninguno de los cultivos, posiblemente al no contar con un pH adecuado, los componentes nutricionales disponibles o compuestos tóxicos desarrollados.

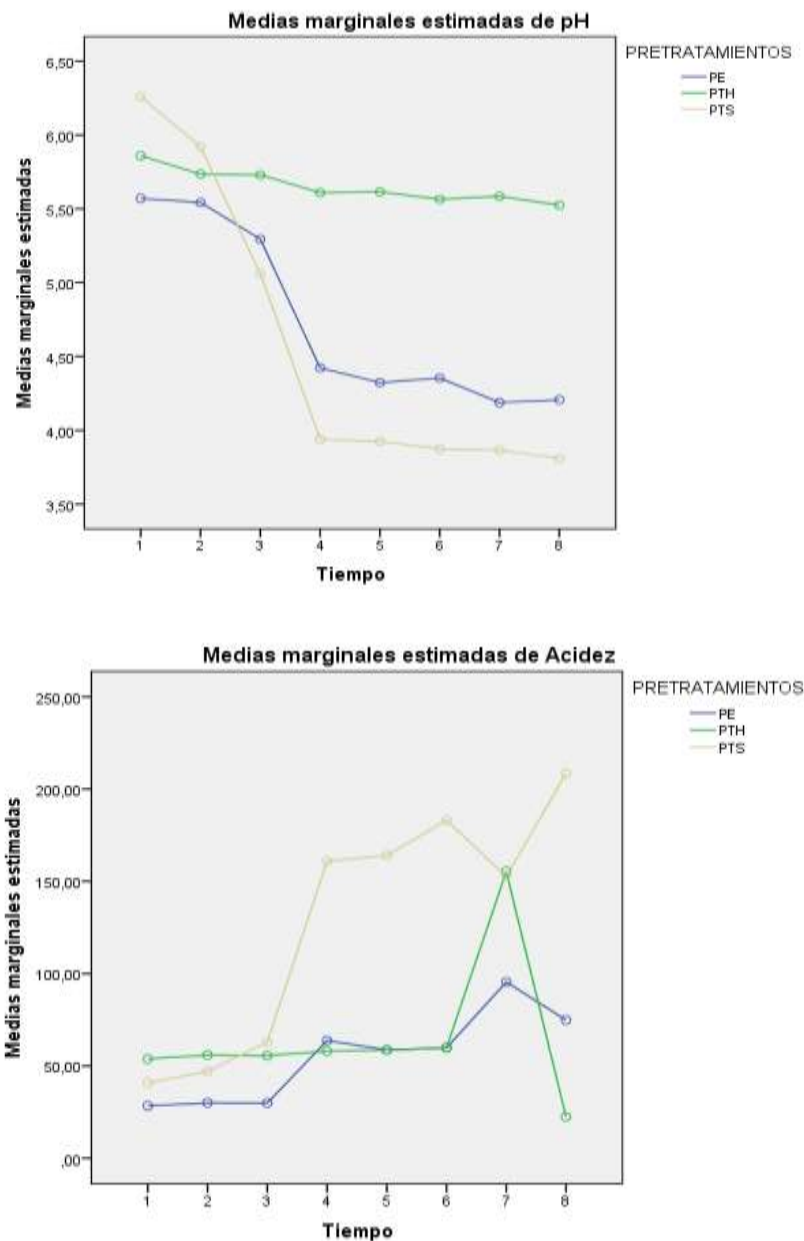
### 3.5 Estimación estadística para el polen fermentado con los diferentes cultivos

En el anexo E, se presenta un análisis de medidas repetidas para pH y acidez, con el fin de determinar estadísticamente el efecto de cada uno de los cultivos sobre el polen pretratado en el tiempo. Se encontró un valor p menor 0,05 para todos los estadísticos multivariados, siendo un nivel crítico (sig) asociados a cada uno de ellos, por tanto se rechazó la hipótesis de igualdad de medias y se concluyó que los pretratamientos son diferentes en cada tiempo de la fermentación.

Siendo necesario evaluar mediante un análisis de perfiles para pH y acidez, al buscar comparar los tres supuestos, horizontalidad, paralelismo y concordancia para los diferentes pretratamientos con cada cultivo. Al encontrar de forma general en la figura 3-16, 3-17, 3-18, el no cumplimiento para los supuestos, al ser diferentes cada polen pretratado y fermentado con un mismo cultivo.

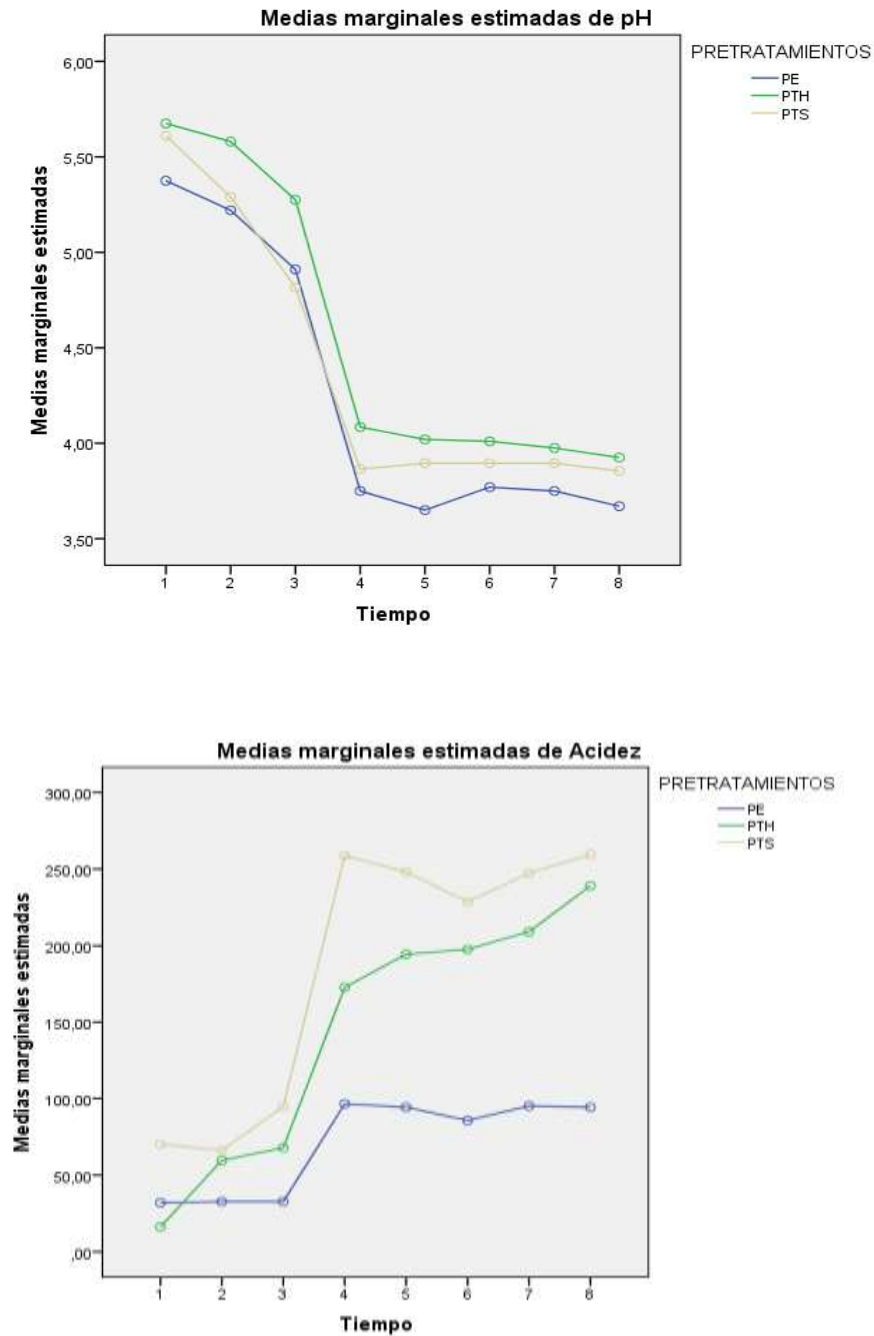
Se codificó los pretratamientos PA: Pretratamiento alcalino, PE: Pretratamiento enzimático, PTS: Pretratamiento térmico calor seco, PTH: Pretratamiento térmico calor húmedo.

**Figura 3-16.** Análisis de perfiles para el pH y acidez del polen fermentado con *Bifidobacterium Lactis*



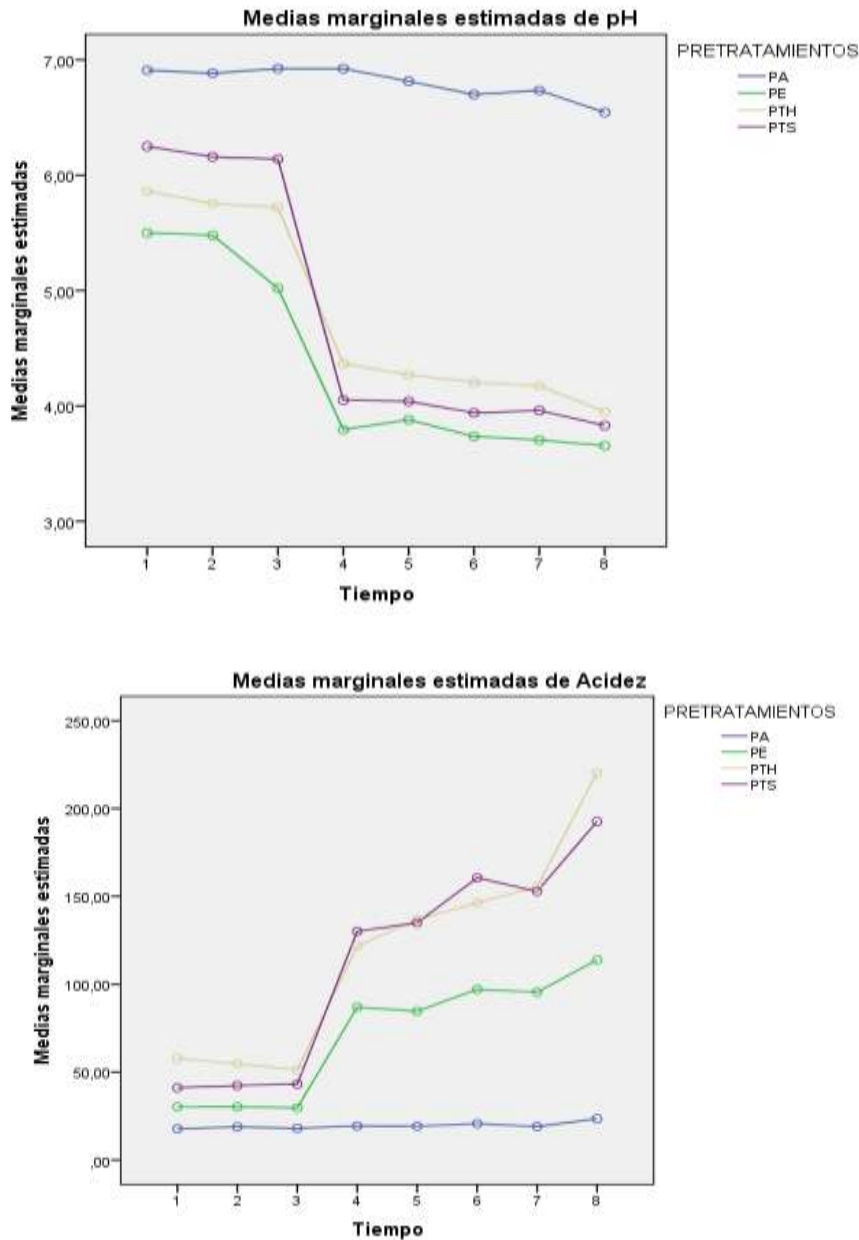
En la figura 3-16, se comparó el pH y acidez de cada pretratamiento fermentado con el cultivo puro *Bifidobacterium Lactis*. Al destacar que todos los pretratamientos presentaron cambios desde el tercer tiempo, a excepción del pretratamiento térmico seco: PTS, que presentó un efecto desde el segundo tiempo.

**Figura 3-17.** Análisis de perfiles para el pH y acidez del polen fermentado con *L.acidophilus*.



En la figura 3-17, se comparó el pH y acidez de cada pretratamiento fermentado con el cultivo puro *L.acidophilus*. Al destacar que el pretratamiento enzimático:PE presenta cambio después del tercer tiempo, mientras el pretratamiento térmico seco: PTS y pretratamiento térmico húmedo: PTH, presentó cambio desde el segundo tiempo que se analizó, al considerar que no cumplen los supuestos.

**Figura 3-18.** Análisis de perfiles para el pH y acidez del polen fermentado con Yomix@205.

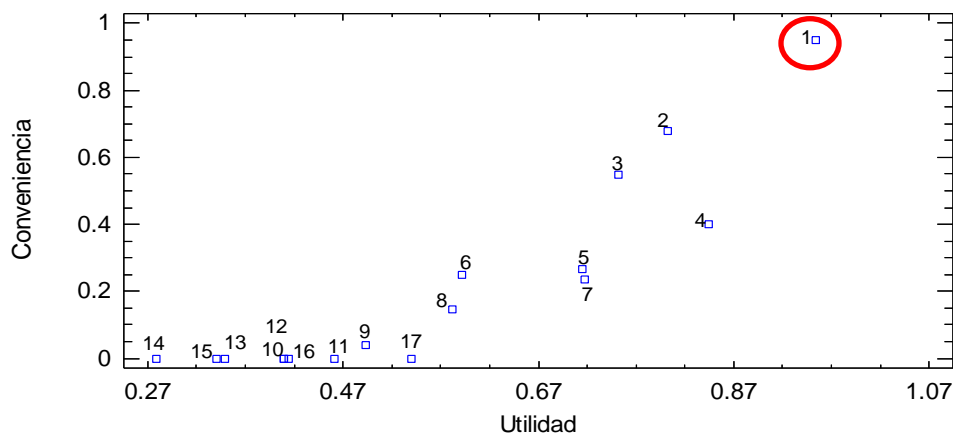


En la figura 3-18, se comparó el pH y acidez de cada pretratamiento fermentado con el cultivo mixto Yomix@205. Se destacó que el Pretratamiento Alcalino: PA se mantuvo constante para pH y acidez, mientras los demás pretratamientos decrecen con cada medición de pH e incremento en la acidez, al encontrar que después del cuarto tiempo tiende a mostrar un cambio pronunciado para el pretratamiento térmico húmedo: PTH y Pretratamiento térmico seco: PTS, al considerar que no cumplen los supuestos.

### 3.6 Estimación estadística para comparar el polen sin tratar, pretratado y fermentado a las 21 horas de forma conjunta.

Mediante la aplicación de un análisis de decisiones por técnicas de ordenamiento, figura 3-19, se recopilan los parámetros más influyentes en los pretratamientos y la fermentación con los tres cultivos, con el fin de obtener el pretratamiento y el cultivo más útil y conveniente.

**Figura 3-19.** Análisis de decisiones por técnicas de ordenamiento para el polen sometido a diferentes pretratamientos y fermentado con el cultivo *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.



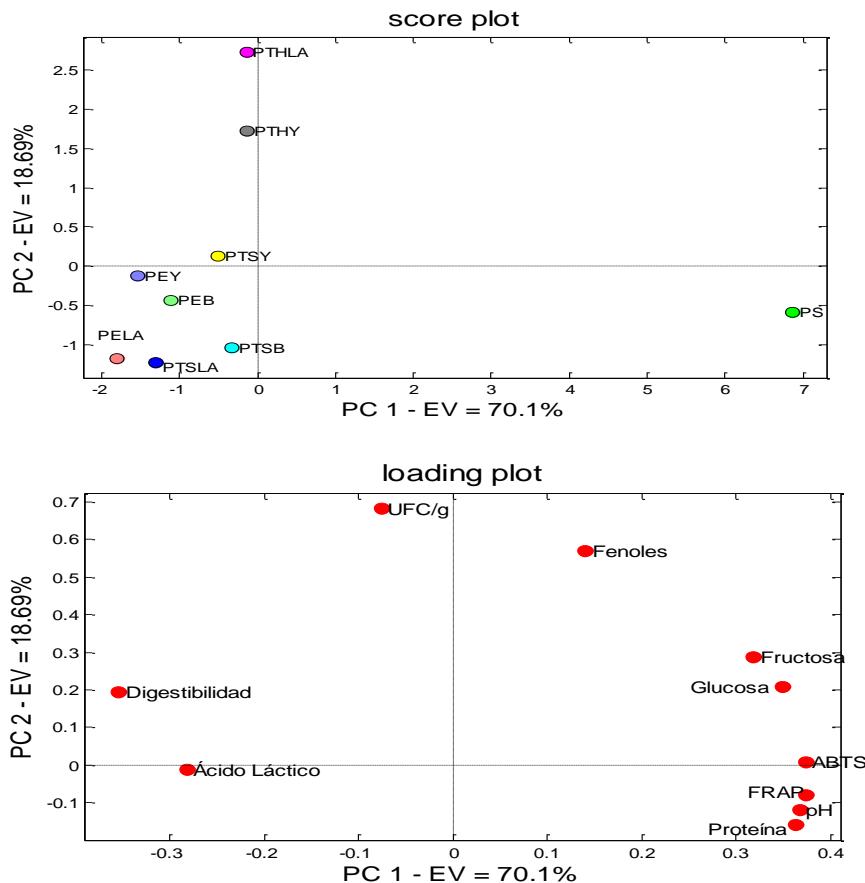
Las muestras se codificaron:

1. Pretratamiento térmico húmedo fermentado con *L.acidophilus* a las 21 horas
2. Pretratamiento térmico húmedo fermentado con Yomix@205, a las 21 horas
3. Pretratamiento enzimático fermentado con Yomix@205, a las 21 horas
4. Pretratamiento térmico seco fermentado con Yomix@205, a las 21 horas
5. Pretratamiento térmico seco fermentado con *L.acidophilus* a las 21 horas
6. Pretratamiento enzimático fermentado con *Bifidobacterium L.* a las 21 horas
7. Pretratamiento enzimático fermentado con *L.acidophilus* a las 21 horas
8. Pretratamiento térmico seco fermentado con *Bifidobacterium L.* a las 21 horas
9. Pretratamiento enzimático con *L.acidophilus* al tiempo cero
10. Pretratamiento enzimático con *Bifidobacterium L.* al tiempo cero
11. Pretratamiento térmico seco con *L.acidophilus* al tiempo cero
12. Pretratamiento enzimático con Yomix@205, al tiempo cero
13. Pretratamiento térmico seco con *Bifidobacterium L.* al tiempo cero
14. Polen sin pretratamiento
15. Pretratamiento térmico húmedo con Yomix@205, al tiempo cero
16. Pretratamiento térmico seco con Yomix@205, al tiempo cero
17. Pretratamiento térmico seco con *L.acidophilus* al tiempo cero

Mediante esta técnica de ordenamiento se encontró que el pretratamiento térmico húmedo fermentado con *L.acidophilus* fue el más conveniente y útil respecto al polen en su estado natural, pretratado y fermentado con otros cultivos, al encontrar valores entre 0,986-0,986 considerado aceptable y según lo expuesto por (Pavan & Worth, 2008). De hecho se considera que el pretratamiento térmico húmedo fermentado con Yomix@205, a las 21 horas puede ser otra alternativa aceptable y buena al estar en un rango de 0,703 para conveniencia y 0,844 para utilidad.

Por otro lado, mediante un análisis de componentes principales figura 3-20, se puede encontrar que variables (UFC/g, Fenoles, Digestibilidad, acidez total, etc.) presentaron una alta correlación para el pretratamiento termico húmedo fermentado con *L.acidophilus* y Yomix@205, en comparación a los demás pretratamientos.

**Figura 3-20.** Score plot y Loading plot de los Componentes Principales (PCA) para el polen sometido a diferentes pretratamientos y fermentado a las 21 horas.



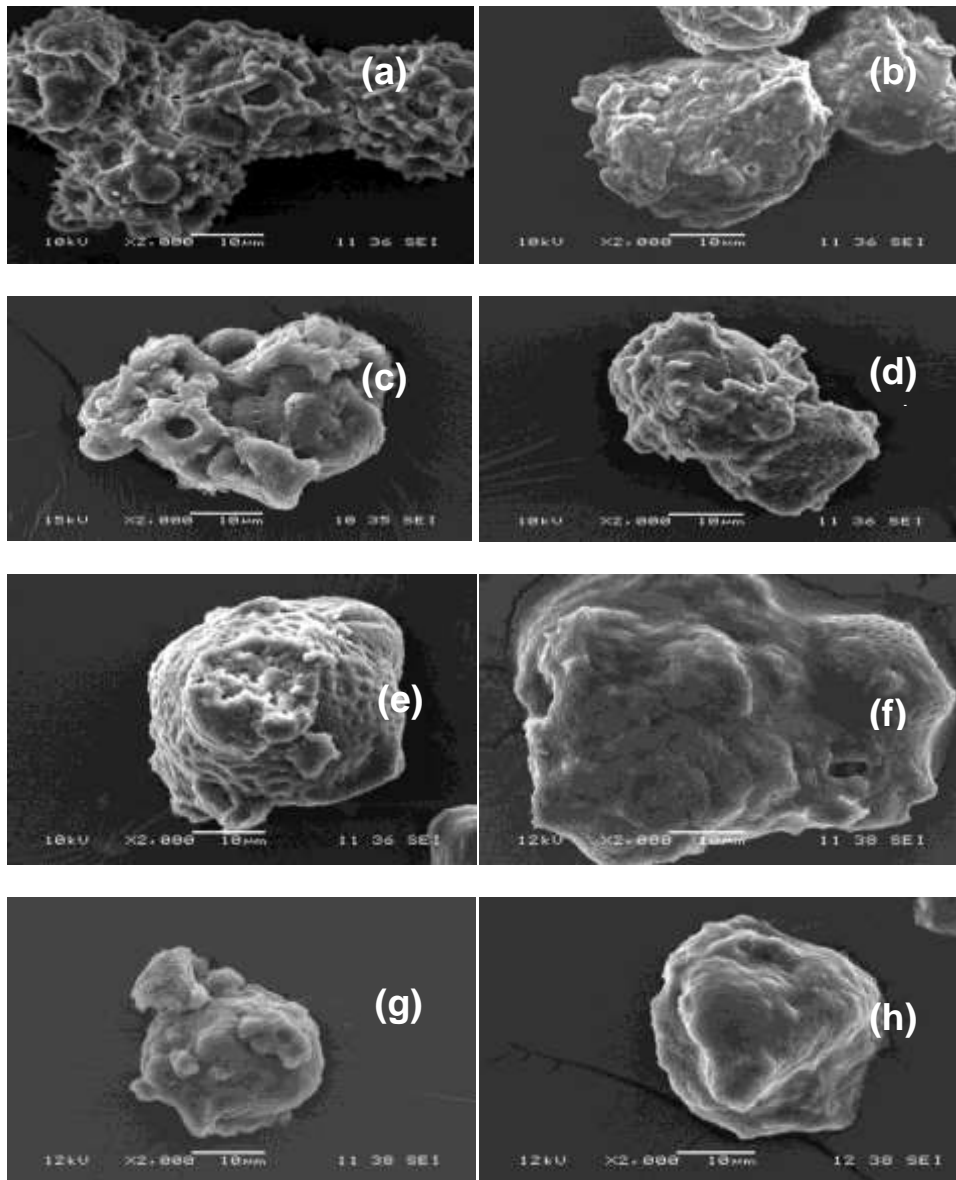
Componentes	Eigenvalor	Varianza explicada
1	7,10	70,10
2	1,86	18,68



### 3.7 Morfología del polen fermentado con *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205 mediante Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Con el fin de apreciar el cambio estructural del polen fermentado con los tres cultivos se realizó fotografías con MEB.

**Figura 3-21.** Micrografías con un aumento de 2000X sobre los cambios estructurales del polen fermentado hasta las 21 horas, por medio de Microscopía Electrónica de Barrido.



Las muestras se codificaron:

- (a)** Morfología del polen con pretratamiento térmico seco a las 21 horas de fermentación con *L.acidophilus*.
- (b)** Morfología del polen con pretratamiento térmico seco a las 21 horas de fermentación con Yomix@205.
- (c)** Morfología del polen con pretratamiento térmico seco a las 21 horas de fermentación con *Bifidobacterium lactis*.
- (d)** Morfología del polen con pretratamiento térmico húmedo a las 21 horas de fermentación con *L.acidophilus*.
- (e)** Morfología del polen con pretratamiento térmico húmedo a las 21 horas de fermentación con Yomix@205.
- (f)** Morfología del polen con pretratamiento enzimático a las 21 horas de fermentación con *Bifidobacterium lactis*.
- (g)** Morfología del polen con pretratamiento enzimático a las 21 horas de fermentación con Yomix@205.
- (h)** Morfología del polen con pretratamiento enzimático a las 21 horas de fermentación con *L.acidophilus*.

En la figura 3-21 se presentó micrografías del polen fermentado mediante MEB a las 21 horas de fermentación. Se observó de forma general que el polen fermentado mostró una estructura no definida, con cambios notorios como deformación, grumos y rompimiento de la exina para todas las figuras de polen de la (a) a la (h), este hecho podría liberar y dejar disponibles los nutrientes de esta matriz vegetal para ser metabolizados por las bacterias ácido lácticas en el bioproceso.

## 4 Conclusiones y recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

- Se comprobó que en la fermentación del polen apícola debe considerarse una relación polen:agua (1:2) y adecuación de pH del sustrato, para adaptar a los cultivos lácticos y permitir la fermentación.
- Al comparar la digestibilidad del polen en su estado natural 62%, con el pretratado se encontró un incremento significativo del 85% para el pretratamiento enzimático, 89% para el pretratamiento térmico seco, 92% para el pretratamiento térmico húmedo y 98% pretratamiento alcalino, lo que permite obtener una matriz más aprovechada nutricionalmente y con mejores características respecto al polen inicial y que podría consumirse sin fermentación.
- Los diferentes pretratamientos térmicos, químico y enzimático aplicados al polen apícola generaron cambios significativos en la proteína por el método de Bradford. Se pudo destacar que el pretratamiento enzimático afectó de forma notoria al polen apícola, al presentar una disminución notoria de proteína (2,87%) y nutrientes más disponibles.
- Los pretratamientos enzimáticos, térmicos y químicos, ejercieron un efecto notorio en la microestructura del polen, al observar deformación en la exina mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido.
- Las propiedades antioxidantes fueron afectadas para el polen pretratado respecto al polen sin pretratamiento, no obstante estos cambios no fueron pronunciados al comparar estos resultados con diferentes matrices vegetales.
- En las diferentes fermentaciones, las propiedades antioxidantes no manifestaron cambios significativos, excepto para los fenoles al presentar un crecimiento para el polen con pretratamiento térmico calor seco fermentado hasta las 21 horas con Yomix@205 (17,304 mg ácido gálico/g polen), y el polen con pretratamiento térmico húmedo fermentado hasta las 6 horas con *L.acidophilus* (25,953 mg ácido gálico/g polen) y Yomix@205 (12,548 mg ácido gálico/g polen). En cambio el polen pretratado enzimáticamente y fermentado hasta las 21 horas manifestó un incremento de estos compuestos para *L.acidophilus* (9,825 mg ácido gálico/g polen), Yomix@205 (9,486 mg ácido gálico/g polen) y *Bifidobacterium lactis* (10,751 mg ácido gálico/g polen), este fenómeno podría explicarse por los compuestos fenólicos que presenta la pared celular externa del polen que son liberados durante la fermentación y que son valores favorables para esta matriz vegetal.

- Se confirmó la adaptación de los tres cultivos para el polen con pretratamiento térmico calor seco y enzimático, al presentar un conteo de microorganismos ( $10^7$  a  $10^8$ UFC/g polen) superiores a la establecida por la normatividad  $10^6$  UFC/ g. Sin embargo, el pretratamiento térmico calor húmedo presentó un conteo de microorganismos significativo ( $10^9$  a  $10^{10}$ UFC/g polen), en comparación a los demás pretratamientos, a pesar de no manifestar cambios con el cultivo *Bifidobacterium lactis*. Mientras el pretratamiento alcalino no presentó crecimiento de microorganismos, posiblemente a compuestos que se generaron en el pretratamiento que inhiben la fermentación.
- Se consideró que la fermentación del polen pretratado no debe prolongarse más de 21 horas ya que puede verse agotado el sustrato y perder sus características nutricionales.
- Se comprobó que el mejor producto durante la fermentación fue el polen con pretratamiento térmico calor húmedo fermentado por 21 horas con *L.acidophilus*. Este hecho se fundamenta por la alta correlación que presentó con variables como  $10^9$  UFC/g, digestibilidad (92%), fenoles (18,46 mg ácido gálico/ g polen) y acidez total (1,55%).
- El polen con pretratamiento enzimático y fermentado con Yomix@205 hasta las 21 horas, presentó mayor contenido de aminoácidos (Treonina, isoleucina, leucina y lisina) y ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y ácido linoléico) que el polen en su estado natural o pretratado enzimáticamente. Mientras el polen con pretratamiento térmico calor seco presentó mejores características que el polen fermentado o en su estado natural.

## 4.2 Recomendaciones

- Establecer el método y las condiciones para mantener la vida útil del producto y realizar un seguimiento para que pueda ser incorporado en la alimentación humana, y aprovechar estos avances tecnológicos.
- Evaluar diferentes concentraciones de NaOH para el pretratamiento alcalino y hacer seguimiento algunos compuestos generados como hidroximetil furfural que pueden inhibir la fermentación.
- Evaluar otros métodos de análisis de proteína diferente al método de Bradford.
- Estudiar cinéticas continuas de azúcares totales, reductores y biomasa, al inocular el cultivo directo en el polen pretratado, con el fin de obtener mayor información sobre el metabolismo de los microorganismos en esta matriz compleja.
- Evaluar la generación de ácidos grasos y aminoácidos en el pretratamiento térmico húmedo y durante la fermentación.
- Buscar aplicaciones para incorporar este producto en mezclas de alimentos y evaluar su aceptación mediante pruebas sensoriales.

### 4.3 Socialización de resultados

- ✓ Congreso nacional de avances en alimentación y biotecnología 2016, expositor oral – Mérida, Yucatán, México 29 de Enero de 2016 y participación en el congreso 27 al 29 de Enero 2016.
- ✓ Investigación y desarrollo en productos apícolas, oportunidad de proceso social, ambiental y económico para Colombia dentro de la escuela internacional de investigación con la ponencia práctica titulada “Fermentación de polen apícola” del 03 al 13 de Noviembre de 2015, Universidad Nacional de Colombia
- ✓ Programa Estímulos a la Investigación Thomas Van der Hammen - Jardín Botánico José Celestino Mutis – Enero 2015:
  - Ponencia oral, 11 Junio 2015  
<https://www.youtube.com/watch?v=MWT8li7eBqw> Jardín Botánico José Celestino Mutis.
  - Poster 28 Mayo 2015, Jardín Botánico José Celestino Mutis.
- ✓ Proceso de revisión “Evaluación de digestibilidad de nutrientes del polen apícola al aplicar diferentes pretratamientos”, en la revista Ingeniería y Competitividad, Universidad del Valle.
- ✓ Ponencia oral Seminario avances del programa estratégico en alternativas para la generación de valor en productos apícolas en Colombia a través de la innovación y el desarrollo tecnológico del 10 al 12 de Diciembre 2014.



# A. Anexo: Especificaciones de los cultivos lácticos utilizados (Danisco).

CULTURES DIVISION  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 1 / 2

Valid from: February 10, 2009



First you add knowledge ...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 223810-2.0EN

Material no. 1248156

**HOWARU™ Dophilus LYO 40 DCU**  
HOWARU™ Premium Probiotics

## Description

Freeze-dried concentrated probiotic culture for dairy and beverages applications.

## Directions for use

Disinfect opening area with ethanol (approx. 70 %) before opening package. Cut open and add culture to process milk under aseptic conditions. We do not accept any liability in case of undue application.

## Composition

Lactobacillus acidophilus NCFM®

## Microbiological specifications

Microbiological quality control - standard values and methods  
Examination of culture:

Cell count:	>= 1.0E+11 / DCU
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 personal hygiene.

## Storage

18 months from date of production at <= -18 °C  
6 months from shipment date at +4°C

## Packaging

PE, PET, Al laminated foil

## Purity and legal status

HOWARU™ Dophilus LYO 40 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

## Halal status

certified by Islamic Food Council of Europe

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

CULTURES DIVISION  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 2 / 2

Valid from: February 10, 2009

**DANISCO**

First you add knowledge...

**PRODUCT DESCRIPTION - PD 223810-2.0EN**

**Material no. 1248156**

**HOWARU™ Dophilus LYO 40 DCU**  
HOWARU™ Premium Probiotics

**Allergens**

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**

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.

**GMO status**

HOWARU™ Dophilus LYO 40 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) 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.



CULTURES DIVISION  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 1 / 2

Valid from: July 7, 2008

**DANISCO**

First you add knowledge...

## PRODUCT DESCRIPTION - PD 232055-1.0EN

Material no. 1261264

### HOWARU™ Bifido LYO 40 DCU-S HOWARU™ Premium Probiotics

#### Description

A single strain of freeze-dried probiotic culture in powder form for food application.

#### Usage levels

Choose an inoculation level to reach at least  $5.0 \times 10^9$  cfu / serving in the finished product at the end of product shelf life.

#### Directions for use

Sanitize sachet with appropriate sanitizer before opening.  
Once sachet has been opened add culture directly to the product. Agitate or mix for approx. 30 minutes on low speed.

#### Composition

*Bifidobacterium lactis* HNO19  
carrier: dextrose

#### Properties

*Bifidobacterium lactis* HNO19 has been selected from over 2000 strains. This strain has been shown in several animal and human studies to strengthen important aspects of the immune system and to ensure a healthy intestinal microflora.

#### Microbiological specifications

Microbiological quality control - standard values and methods

Examination of culture:

Cell count:	$\geq 1.0E+11$ / DCU
non-lactic acid bacteria	< 500 / g [UM-030]
enterobacteriaceae	< 10 / g [UM-031]
yeasts and moulds	< 10 / g [UM-017]
enterococci	< 100 / g [UM-033]
Staphylococci coagulase positive	< 10 / g [UM-034]
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.  
Analytical methods available upon request.

#### Storage

Refrigerate upon receipt.

Shelf life is 12 months when stored in the original, sealed package at or below 4°C.

#### Packaging

PE, PET, Al laminated foil

#### Purity and legal status

HOWARU™ Bifido LYO 40 DCU-S 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.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

CULTURES DIVISION  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 2 / 2

Valid from: July 7, 2009

**DANISCO**

First you add knowledge...

**PRODUCT DESCRIPTION - PD 232055-1.0EN**

**Material no. 1261264**

**HOWARU™ Bifido LYO 40 DCU-S**  
HOWARU™ Premium Probiotics

**Allergens**

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		rapeseed	
X		molluscs	

Local regulation has always to be consulted as allergen labeling requirements may vary from country to country.

**GMO status**

HOWARU™ Bifido LYO 40 DCU-S 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) 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

Danisco Cultures  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 1 / 3

**DANISCO**

First you add knowledge...

## PRODUCT DESCRIPTION - PD 205559-4.0EN

Material no. 50583

### YO-MIX™ 205 LYO 250 DCU YO-MIX™ Yogurt Cultures

#### Description

Freeze-dried concentrated lactic starter for the direct vat inoculation of milk and milk bases.

#### Usage levels

Product	Dose
Fermented milk	15 - 25 DCU / 100 l of vat milk

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. bulgaricus  
Lactobacillus acidophilus  
Bifidobacterium lactis

#### Properties

- Freeze dried form facilitates the storage and handling of cultures.

- YO-MIX™ 205 LYO 250 DCU is a blend of selected strains for direct vat inoculation of manufacturing milk, these strains have been carefully chosen and combined to answer your specific needs in term of acidification, texture and taste. They are specially developed to provide a minimum of 10E6 of L.acidophilus + Bifidobacterium lactis strains per ml of fermented milk.

- YO-MIX™ 205 LYO 250 DCU gives quick acidification to pH 4.80 - 4.70 and then, a slow acidification to reach lower pH. This characteristic allows perfect pH control during the processing time and the shelf life. They provide thick texture and clean yogurt taste.

A phage alternative is available on request.

#### Physical/chemical specifications

Quantitative/Activity standard

Test medium:

Sterilised reconstituted milk (12% solids)  
Heated 20 min at 110 °C. Standardised to pH 6.60

Temperature: 42 °C

Inoculation rate: 25 DCU / 100 l

Delta pH: 1.80

Time to reach the delta pH: <-> 6 hours

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

**PRODUCT DESCRIPTION - PD 205559-4.0EN****Material no. 50583****YO-MIX™ 205 LYO 250 DCU**  
YO-MIX™ Yogurt Cultures**Microbiological specifications**

Microbiological quality control - standard values and methods

Coliforms	< 10 / g [1]
Enterococci	< 20 / g [2]
Yeasts	< 10 / g [3]
Moulds	< 10 / g [3]
Staphylococci coagulase positive	< 10 / g [4]
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g [5]
Salmonella	neg. / 25 g [6]

[1] NF V08-015, IDF 73A-1985

[2] Gelose bile esculine sodium azide / 48 h at 37 °C

[3] NF V08-022, IDF 94B-1991

[4] NF V08-057, IDF 145A-1997

[5] NF V08-055, IDF 143A-1990

[6] NF V08-052, IDF 93B-1995

**Storage**

12 months from date of production at &lt;= 4°C

**Packaging**

Sachets made with three layers of material (polyethylene, aluminium, polyester). The following information is printed on each sachet: product name, pack size, batch n° and shelf life.

**Quantity**

Shipment cartons each containing 50 sachets

**Purity and legal status**

YO-MIX™ 205 LYO 250 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**

KOSHER O-U-D

**Halal status**

AHA certified

**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)	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	

**Additional information**

ISO 9001 certified



Danisco Cultures  
cultures@danisco.com  
www.danisco.com

Page 3 / 3

**DANISCO**

First you add knowledge...

**PRODUCT DESCRIPTION - PD 205559-4.0EN**

**Material no. 50583**

**YO-MIX™ 205 LYO 250 DCU**  
YO-MIX™ Yogurt Cultures

#### GMO status

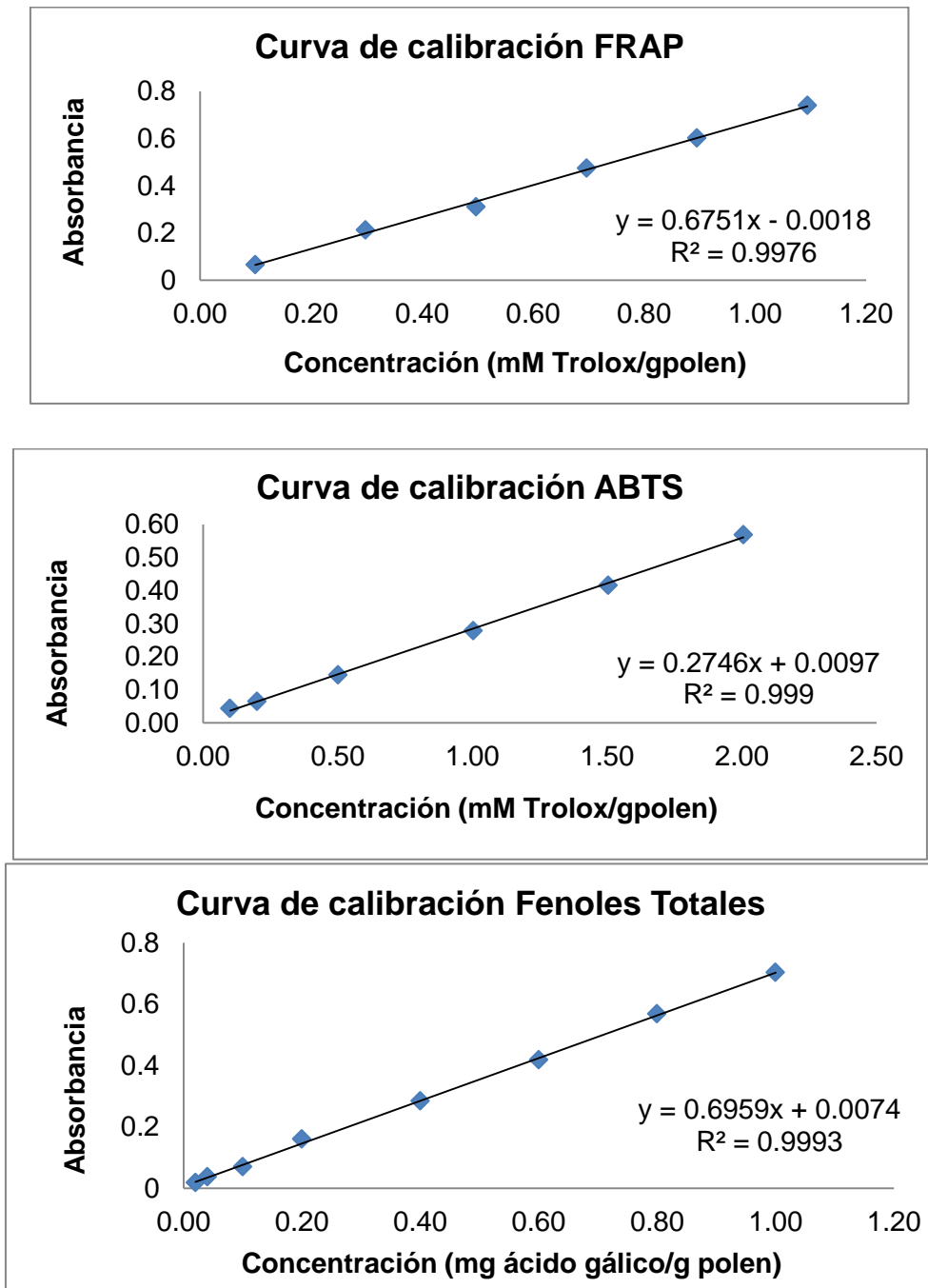
YO-MIX™ 205 LYO 250 DCU does not consist of, nor contains, nor is produced from genetically modified organisms according to the definitions of Regulation (EC) 1829/2003 and Regulation (EC) 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

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.

The information contained in this publication is based on our own research and development work and is to the best of our knowledge reliable. Users should, however, conduct their own tests to determine the suitability of our products for their own specific purposes and the legal status for their intended use of the product. Statements contained herein should not be considered as a warranty of any kind, expressed or implied, and no liability is accepted for the infringement of any patents.

## B. Anexo: Curvas de calibración actividad antioxidante y fenoles.

**Figura B - 1** Curva de calibración para la capacidad antioxidante y fenoles totales para el polen sin tratar, pretratado y fermentado con los tres cultivos.



## C. Anexo: Curvas de calibración aminoácidos y ácidos grasos.

Formula:  $y = mx + b$

x : Amount

y : Area

**Tabla C-1.** Coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de la curva de calibración de los 15 estándares de aminoácidos.

Aminoácidos (AA)	Curva de calibración		
	m	b	Coeficiente $R^2$
ASP	1.13477e-1	-1.52201	0.99895
GLU	8.79069e-2	7.47660e-1	0.99953
SER	1.01308e-1	-5.67842e-1	0.99978
HIS	5.09705e-2	4.00033e-1	0.99978
GLY	9.65086e-2	-3.55237e-1	0.99963
THR	1.32495e-1	-1.39196	0.99902
ARG	9.79747e-2	1.78132	0.99886
ALA	1.34845e-1	-5.24557e-1	0.99934
TYR	9.96433e-2	-9.93612e-1	0.99930
VAL	1.29312e-1	-2.54267	0.99765
PHE	7.73978e-2	-1.64770e-1	0.99994
ILE	1.28325e-1	-1.72251	0.99905
LEU	1.07806e-1	-1.09188	0.99949
LYS	1.15837e-1	-3.31771	0.99529
PRO	9.50333e-2	-2.49269e-1	0.99908

**Tabla C-2.** Coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de la curva de calibración de los estándares de ácidos grasos.

Ácidos grasos	Curva de calibración		
	m	b	Coeficiente $R^2$
C6:0	3.87121e-2	4.06004e-1	0.99962
C8:0	4.33184e-2	4.18146e-1	0.99968
C10:0	4.59854e-2	4.49352e-1	0.99966
C12:0	4.79127e-2	4.04205e-1	0.99975
C14:0	4.71616e-2	2.15243e-1	0.99992
C16:0	4.36841e-2	1.72194e-1	0.99988
C18:0	3.70026e-2	1.24986e-1	0.99988
C18:1	3.61456e-2	7.38074e-1	0.99951
C18:2	2.70758e-2	6.41423e-1	0.99947
C18:3	2.17674e-2	1.94238	0.99945
C20:0	3.13141e-2	1.17114e-1	0.99995
C22:0	2.88698e-2	8.57727e-2	0.99994
C24:0	2.86198e-2	1.12170e-1	0.99993

## D. Anexo: Especificaciones de la enzima Protamex.



### 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 flujo, suento 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.

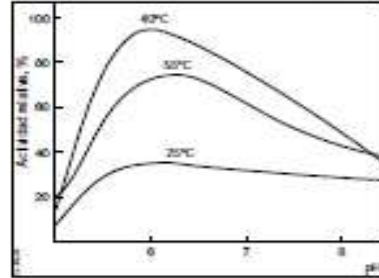


Fig. 1. Influencia del pH a varias temperaturas sobre la actividad de Protamex.

Método: Anson N° 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.

Revee 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.

Úsese 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.

*Novozymes Latin America Limited*  
 Rua Professor Francisco Riberto 683  
 CEP 83707-000 - Araucária - Paraná  
 Brazil

Tel. +55 41 641 1000

Fax +55 41 6 42 1442

*Novozymes AS*  
 Kroghsvej 36  
 2880 Søborg  
 Denmark

Tel. +45 8824 9999

Fax +45 8824 9998

info@novozymes.com

www.novozymes.com

Novozymes es un proveedor líder y se dedica a  
 ofrecer productos y servicios que ayudan a mejorar  
 procesos, reducir el desperdicio y producir  
 alimentos más saludables y seguros. Nuestra  
 misión es mejorar la vida de las personas y el  
 planeta. Nos comprometemos a ser líderes en  
 innovación, sostenibilidad y excelencia. Nos  
 esforzamos por ser el mejor lugar para trabajar  
 y aprender.

© 2012 Novozymes A/S. Todos los derechos reservados.

## E. Anexo: ESTADÍSTICA

- Tabla ANOVA para el componente principal extraído

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	14.4623	5	2.89246	193.19	0.0000
Intra grupos	0.179667	12	0.0149722		
Total (Corr.)	14.642	17			

### Pruebas de Múltiple Rangos para el componente principal extraído

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Muestra</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
PTH	3	0.766667	X
PTS12	3	1.21333	X
PA	3	1.31667	X
PE	3	1.66	X
PS	3	3.53667	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
PA - PE	*	-0.343333	0.335626
PA - PS	*	-2.22	0.335626
PA - PTH	*	0.55	0.335626
PA - PTS12		0.103333	0.335626
PE - PS	*	-1.87667	0.335626
PE - PTH	*	0.893333	0.335626
PE - PTS12	*	0.446667	0.335626
PS - PTH	*	2.77	0.335626
PS - PTS12	*	2.32333	0.335626
PTH - PTS12	*	-0.446667	0.335626

\* indica una diferencia significativa.

- Análisis de medidas repetidas para el pH y la acidez del polen pretratado y fermentado con *Bifidobacterium L*, *L.acidophilus* y Yomix@205.

<b>Efecto inter sujetos <i>Bifidobacterium Lactis</i></b>		<b>Valor</b>	<b>F</b>	<b>Sig</b>
Tiempo	Traza de Pillai	1,933	115,389	0,000
	Lambda de Wilks	0,000	480,252	0,000
	Traza de Hotelling	1053, 55	1956,601	0,000
	Raíz mayor de Roy	1039,41	4157,653	0,000
Tiempo*Pretratamientos	Traza de Pillai	1,971	90,715	0,000
	Lambda de Wilks	0,000	108,993	0,000
	Traza de Hotelling	211,131	130,700	0,000
	Raíz mayor de Roy	168,806	225,074	0,000
<b>Efecto inter sujetos <i>L.acidophilus</i></b>		<b>Valor</b>	<b>F</b>	<b>Sig</b>
Tiempo	Traza de Pillai	1,664	19,822	0,000
	Lambda de Wilks	,001	125,551	0,000
	Traza de Hotelling	376,016	698,315	0,000
	Raíz mayor de Roy	374,014	1496,057	0,000
Tiempo*Pretratamientos	Traza de Pillai	1,940	43,072	0,000
	Lambda de Wilks	,000	62,782	0,000
	Traza de Hotelling	147,113	91,070	0,000
	Raíz mayor de Roy	129,015	172,019d	0,000

<b>Efecto inter sujetos Yomix@205,</b>		<b>Valor</b>	<b>F</b>	<b>Sig</b>
Tiempo	Traza de Pillai	1,905	80,419	0,000
	Lambda de Wilks	,000	328,479	0,000
	Traza de Hotelling	701,513	1302,809	0,000
	Raíz mayor de Roy	691,797	2767,188	0,000
Tiempo*Pretratamientos	Traza de Pillai	1,929	36,144	0,000
	Lambda de Wilks	,000	71,836	0,000
	Traza de Hotelling	228,152	141,237	0,000
	Raíz mayor de Roy	214,116	285,487	0,000

## F. Anexo: Datos de ácidos orgánicos durante la fermentación del polen por HPLC.

**Tabla F-1.** Perfil de ácidos orgánicos para el polen con pretratamiento térmico calor seco expuesto a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	CULTIVOS	Cítrico	Tartárico	Málico	Succínico	Acético
0	<i>L.acidophilus</i>	0,099	0,242	0,350	0,335	0,033
	Yomix@205	0,118	0,105	0,163	0,356	---
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	0,342	0,328	0,403	0,478	
6	<i>L.acidophilus</i>	0,204	0,203	0,351	0,321	---
	Yomix@205	0,064	0,160	0,187	0,355	0,021
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	0,201	0,198	0,300	0,547	0,164
21	<i>L.acidophilus</i>	0,081	0,234	0,322	0,184	0,040
	Yomix@205	0,043	0,207	0,271	0,197	---
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	0,212	0,472	0,478	0,456	0,221

**Tabla F-2.** Perfil de ácidos orgánicos para el polen con pretratamiento térmico calor húmedo expuesto a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus* y Yomix@205.

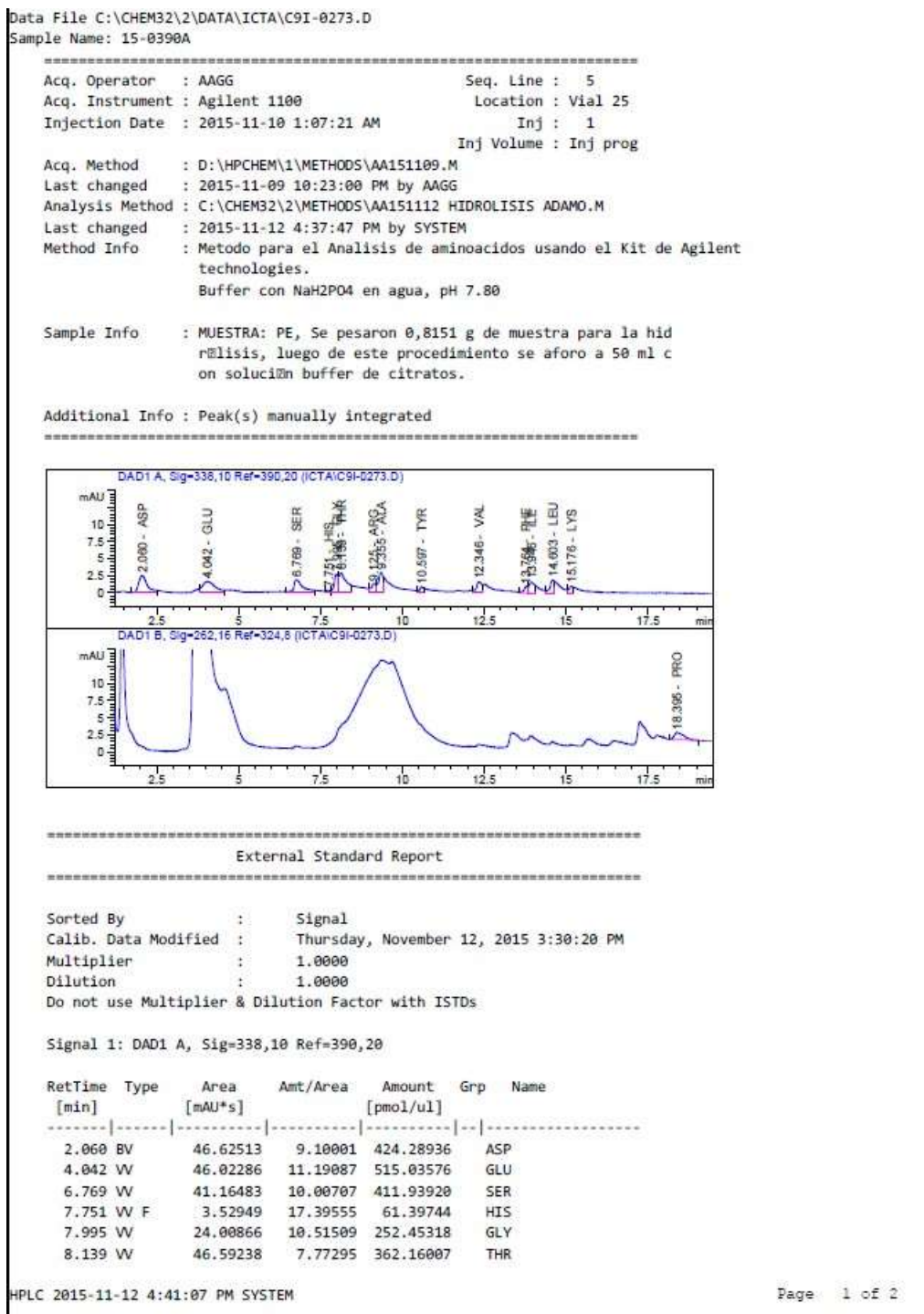
Tiempo (Horas)	CULTIVOS	Cítrico	Tartárico	Málico	Succínico	Acético
0	<i>L.acidophilus</i>	0,057	0,138	0,220	0,129	0,019
	Yomix@205	0,126	0,287	0,344	0,135	0,039
6	<i>L.acidophilus</i>	0,356	0,279	0,472	0,359	0,036
	Yomix@205	0,114	0,259	0,400	0,348	0,034
21	<i>L.acidophilus</i>	0,088	0,270	0,439	0,179	0,032
	Yomix@205	0,109	0,258	0,399	0,233	0,037

**Tabla F-3.** Perfil de ácidos orgánicos para el polen con pretratamiento enzimático expuesto a fermentación con diferentes cultivos *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

Tiempo (Horas)	CULTIVOS	Cítrico	Tartárico	Málico	Succínico	Acético
0	<i>L.acidophilus</i>	0,097	0,178	0,220	0,179	0,017
	Yomix@205	0,098	0,202	0,308	0,211	0,020
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	0,217	0,205	0,283	0,295	---
6	<i>L.acidophilus</i>	0,104	0,246	0,348	0,179	0,023
	Yomix@205	0,106	0,215	0,275	0,382	0,021
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	0,196	0,208	0,292	0,381	0,023
21	<i>L.acidophilus</i>	0,095	0,181	0,280	0,194	0,019
	Yomix@205	0,098	0,202	0,308	0,211	0,020
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	0,135	0,250	0,331	0,402	0,030

## G. Anexo: CROMATOGRAMAS

### Perfil de aminoácidos para el pretratamiento enzimático





ata File C:\CHEM32\2\DATA\ICTA\C9I-0273.D  
 Sample Name: 15-0390A

```

=====
Acq. Operator   : AAGG                               Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Agilent 1100                         Location  : Vial 25
Injection Date  : 2015-11-10 1:07:21 AM                Inj       :    1
                                                    Inj Volume: Inj prog

Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\AA151109.M
Last changed    : 2015-11-09 10:23:00 PM by AAGG
Analysis Method : C:\CHEM32\2\METHODS\AA151112 HIDROLISIS ADAMO.M
Last changed    : 2015-11-12 4:37:47 PM by SYSTEM
Method Info     : Metodo para el Analisis de aminoacidos usando el Kit de Agilent
                  technologies.
                  Buffer con NaH2PO4 en agua, pH 7.00
  
```

Sample Info : MUESTRA: PE, Se pesaron 0,8151 g de muestra para la hidrolisis, luego de este procedimiento se aforo a 50 ml con solución buffer de citratos.

Additional Info : Peak(s) manually integrated

```

=====
RetTime Type      Area      Amt/Area      Amount      Grp  Name
 [min]  [min]  [mAU*s]  [mAU*s]  [pmol/ul]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
  9.125 W F      15.32658    9.02045    138.25269    ARG
  9.355 W         28.75090    7.55125    217.10511    ALA
 10.597 W         8.92435    11.15315    99.53458     TYR
 12.346 W        19.18304    8.75828    168.01039    VAL
 13.764 W F       9.07584    13.15483    119.39108    PHE
 13.946 W        17.80742    8.54650    152.19104    ILE
 14.603 W        17.61631    9.85083    173.53525    LEU
 15.176 W         9.18706    11.75043    107.95193    LYS
  
```

Totals : 3203.24708

Signal 2: DAD1 B, Sig=262,16 Ref=324,8

```

RetTime Type      Area      Amt/Area      Amount      Grp  Name
 [min]  [min]  [mAU*s]  [mAU*s]  [pmol/ul]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
 18.395 BB      20.26890    10.65203    215.90500    PRO
  
```

Totals : 215.90500

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Perfil de aminoácidos para el pretratamiento enzimático fermentado con *L.acidophilus* a las 6 horas.**

Data File C:\CHEM32\2\DATA\ICTA\C9I-0275.D  
 Sample Name: 15-0391A

```

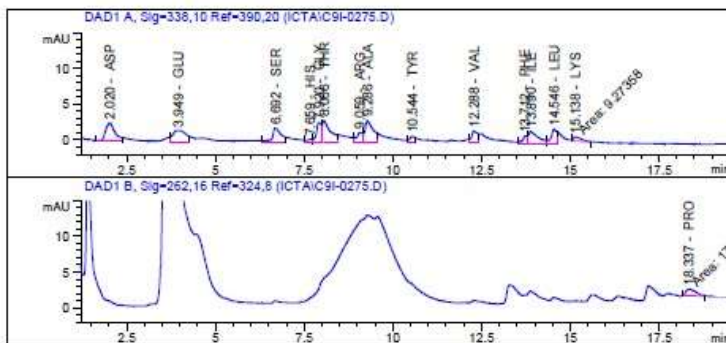
=====
Acq. Operator   : AAGG                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Agilent 1100                 Location  : Vial 26
Injection Date  : 2015-11-10 12:09:56 PM   Inj       :    1
                                           Inj Volume: Inj prog

Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\AA140411.M
Last changed    : 2015-11-10 12:00:19 PM by AAGG
                 (modified after loading)

Analysis Method : C:\CHEM32\2\METHODS\AA151112 HIDROLISIS ADAMO.M
Last changed    : 2015-11-12 4:37:47 PM by SYSTEM
Method Info     : Metodo para el Analisis de aminoacidos usando el Kit de Agilent
                 technologies.
                 Buffer con NaH2PO4 en agua, pH 7.80
    
```

Sample Info : MUESTRA: PET2LA, Se pesaron 0,8456 g de muestra para la hidrólisis, luego de este procedimiento se aforo a 50 ml con solución buffer de citratos.

Additional Info : Peak(s) manually integrated



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, November 12, 2015 3:30:20 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=338,10 Ref=390,20

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [pmol/ul]	Grp	Name
2.020	BV	47.44945	9.09502	431.55354	ASP	
3.949	WV	40.46511	11.16549	451.81270	GLU	
6.692	WV	33.53564	10.03804	336.63215	SER	
7.659	WV F	4.28728	17.78858	76.26456	HIS	
7.920	WV	24.74988	10.51050	260.13352	GLY	
8.066	WV	51.47014	7.75158	398.97474	THR	

Data File C:\CHEM32\2\DATA\ICTA\C9I-0275.D  
 Sample Name: 15-0391A

```

=====
Acq. Operator   : AAGG                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Agilent 1100                Location  : Vial 26
Injection Date  : 2015-11-10 12:09:56 PM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: Inj prog

Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\AA140411.M
Last changed    : 2015-11-10 12:00:19 PM by AAGG
                 (modified after loading)

Analysis Method : C:\CHEM32\2\METHODS\AA151112 HIDROLISIS ADAMO.M
Last changed    : 2015-11-12 4:37:47 PM by SYSTEM
Method Info     : Metodo para el Analisis de aminoacidos usando el Kit de Agilent
                 technologies.
                 Buffer con NaH2PO4 en agua, pH 7.80
  
```

Sample Info : MUESTRA: PET2LA, Se pesaron 0,8456 g de muestra para la hidrólisis, luego de este procedimiento se aforo a 50 ml con solución buffer de citratos.

Additional Info : Peak(s) manually integrated

```

=====
RetTime Type      Area      Amt/Area   Amount   Grp  Name
 [min]  [mAU*s]      [pmol/ul]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
  9.059 W F      17.35973   9.15939   159.00449 ARG
  9.286 W V      46.07679   7.50037   345.59291 ALA
 10.544 W V       8.99294   11.14463   100.22303 TYR
 12.288 W V      19.45988   8.74370   170.15131 VAL
 13.712 W F       9.41532   13.14637   123.77728 PHE
 13.890 W V      29.73233   8.24417   245.11842 ILE
 14.546 W V      19.78719   9.78775   193.67204 LEU
 15.138 M M       9.27358   11.72135   108.69880 LYS

Totals :                               3401.60948
  
```

Signal 2: DAD1 B, Sig=262,16 Ref=324,8

```

RetTime Type      Area      Amt/Area   Amount   Grp  Name
 [min]  [mAU*s]      [pmol/ul]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
 18.337 M M      17.06736   10.67631   182.21641 PRO

Totals :                               182.21641
  
```

1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Perfil de aminoácidos para el pretratamiento enzimático fermentado con Yomix@205, a las 21 horas.**

Data File C:\CHEM32\2\DATA\ICTA\C9I-0276.D  
 Sample Name: 15-0392A

```

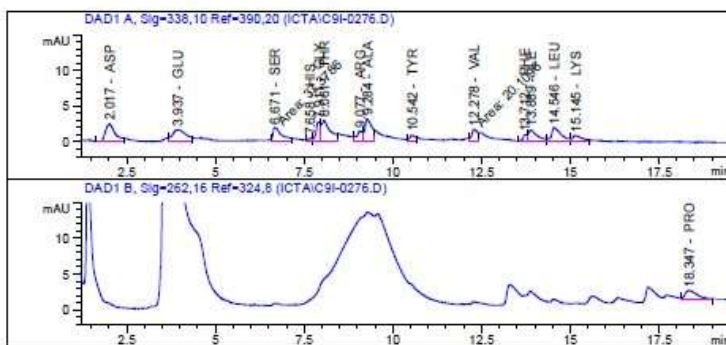
=====
Acq. Operator   : AAGG                      Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Agilent 1100              Location  : Vial 27
Injection Date  : 2015-11-10 12:49:40 PM   Inj       :    1
                                           Inj Volume: Inj prog

Acq. Method    : D:\HPCHEM\1\METHODS\AA140411.M
Last changed   : 2015-11-10 12:00:19 PM by AAGG
                (modified after loading)

Analysis Method : C:\CHEM32\2\METHODS\AA151112 HIDROLISIS ADAMO.M
Last changed   : 2015-11-12 4:37:47 PM by SYSTEM
Method Info    : Metodo para el Analisis de aminoacidos usando el Kit de Agilent
                technologies.
                Buffer con NaH2PO4 en agua, pH 7.80
    
```

Sample Info : MUESTRA: PET 3Y, Se pesaron 0,8236 g de muestra para la hidrólisis, luego de este procedimiento se aforo a 50 ml con solución buffer de citratos.

Additional Info : Peak(s) manually integrated



External Standard Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Thursday, November 12, 2015 3:30:20 PM
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: DAD1 A, Sig=338,10 Ref=390,20

RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [pmol/ul]	Grp	Name
2.017	BV	48.07185	9.09136	437.03839	ASP	
3.937	WV	44.25381	11.18348	494.91171	GLU	
6.671	FM	37.37856	10.02086	374.56526	SER	
7.658	WV F	3.80388	17.55595	66.78081	HIS	
7.911	WV	26.42712	10.50106	277.51268	GLY	
8.061	WV	51.90058	7.74988	402.22346	THR	

Data File C:\CHEM32\2\DATA\ICTA\C9I-0276.D  
 Sample Name: 15-0392A

```

=====
Acq. Operator   : AAGG                      Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Agilent 1100              Location  : Vial 27
Injection Date  : 2015-11-10 12:49:40 PM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: Inj prog

Acq. Method     : D:\HPCHEM\1\METHODS\AA140411.M
Last changed    : 2015-11-10 12:00:19 PM by AAGG
                 (modified after loading)

Analysis Method : C:\CHEM32\2\METHODS\AA151112 HIDROLISIS ADAMO.M
Last changed    : 2015-11-12 4:37:47 PM by SYSTEM
Method Info     : Metodo para el Analisis de aminoacidos usando el Kit de Agilent
                 technologies.
                 Buffer con NaH2PO4 en agua, pH 7.80

Sample Info     : MUESTRA: PET 3Y, Se pesaron 0,8236 g de muestra para la
                 hidrólisis, luego de este procedimiento se aforo a 50
                 ml con solución buffer de citratos.
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated

```

=====
RetTime Type      Area      Amt/Area   Amount   Grp  Name
 [min]   [mAU*s]      [pmol/ul]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
  9.077 W      16.05139    9.07402   145.65057 ARG
  9.284 W      46.20870    7.50013   346.57117 ALA
 10.542 W      10.35343   10.99892   113.87662 TYR
 12.278 FM     20.10961    8.71105   175.17577 VAL
 13.712 W F     9.44696   13.14561   124.18609 PHE
 13.889 W      29.51111    8.24756   243.39450 ILE
 14.546 W      39.61409    9.53156   377.58429 LEU
 15.145 W      17.67024   10.25374   181.18602 LYS

Totals :                               3760.65734
  
```

Signal 2: DAD1 B, Sig=262,16 Ref=324,8

```

RetTime Type      Area      Amt/Area   Amount   Grp  Name
 [min]   [mAU*s]      [pmol/ul]
-----|-----|-----|-----|-----|-----
 18.347 BB     27.34776   10.61854   290.39322 PRO

Totals :                               290.39322
  
```

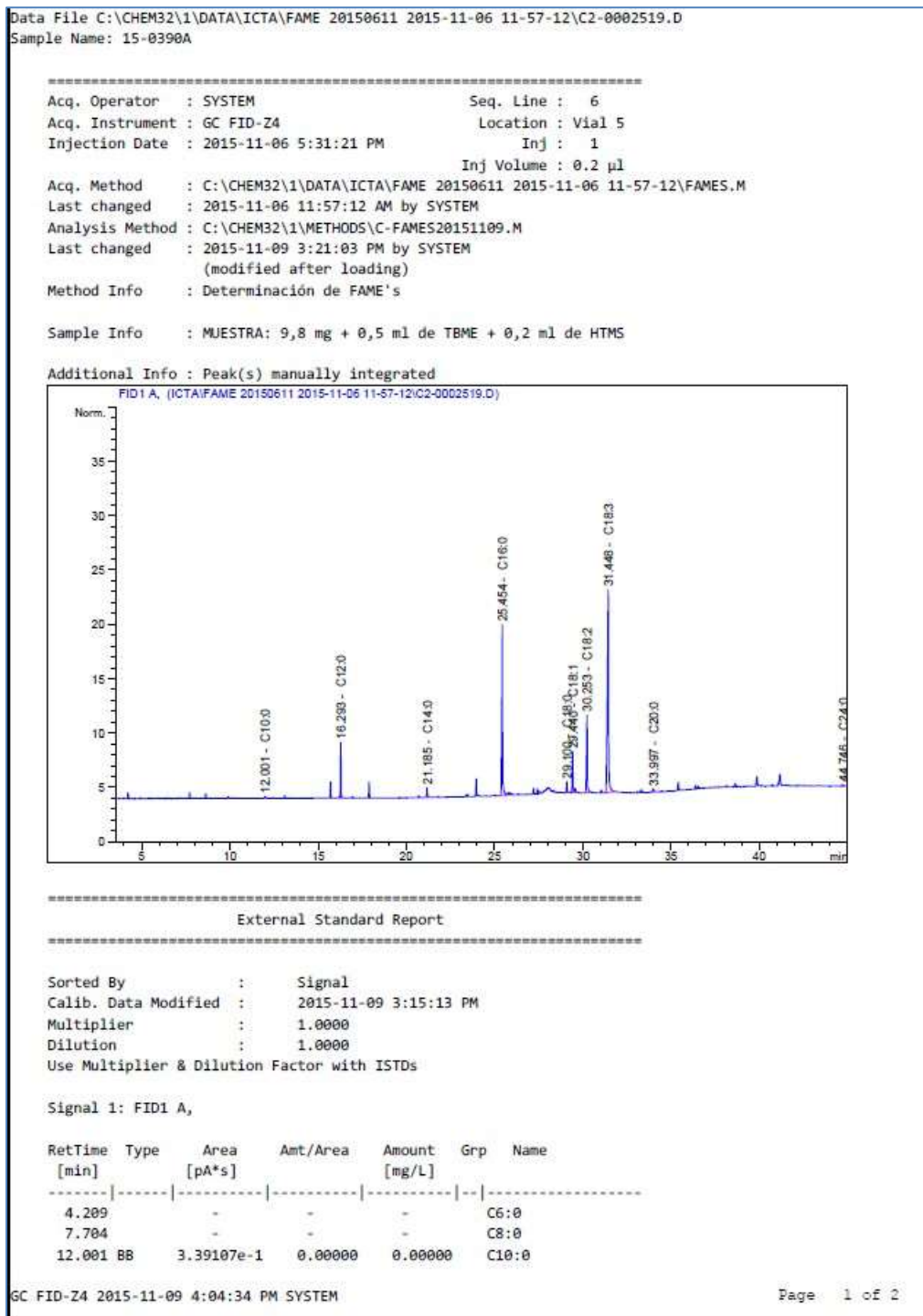
1 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

\*\*\* End of Report \*\*\*



**Perfil de ácidos grasos para el pretratamiento enzimático**



Data File C:\CHEM32\1\DATA\ICTA\FAME 20150611 2015-11-06 11-57-12\C2-0002519.D  
 Sample Name: 15-0390A

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
16.293	VB	10.96058	20.10162	220.32544		C12:0
21.185	BB	2.42583	19.32231	46.87264		C14:0
25.454	BB	48.22696	22.80989	1100.05159		C16:0
29.100	BB	2.68117	25.76534	69.08137		C18:0
29.440	BV	10.55152	25.73065	271.49761		C18:1
30.253	BB	24.78483	35.97756	891.69768		C18:2
31.448	BB	93.99272	44.99080	4228.80769		C18:3
33.997	VB	1.09491	28.51876	31.22561		C20:0
38.730		-	-	-		C22:0
44.746	BB	6.22674e-1	28.64653	17.83745		C24:0
Totals :				6877.39708		

3 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)  
 Warning : Calibrated compound(s) not found  
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (C10:0)

Summed Peaks Report

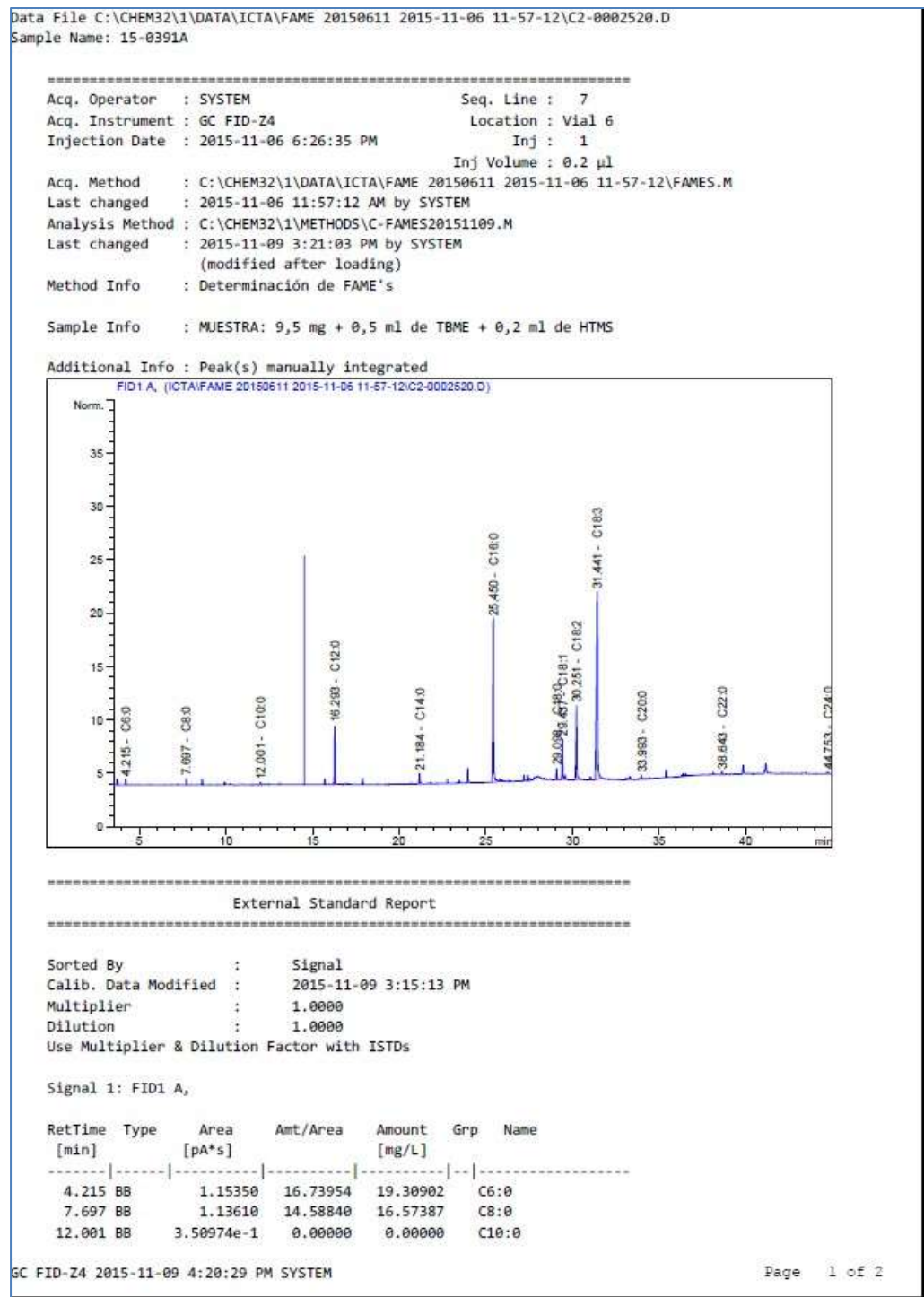
Signal 1: FID1 A,

Final Summed Peaks Report

Name	Total Area [pA*s]	Amount [mg/L]
C6:0	0.00000	0.0000
C8:0	0.00000	0.0000
C10:0	3.39107e-1	0.0000
C12:0	10.96058	220.3254
C14:0	2.42583	46.8726
C16:0	48.22696	1.100e3
C18:0	2.68117	69.0814
C18:1	10.55152	271.4976
C18:2	24.78483	891.6977
C18:3	93.99272	4.229e3
C20:0	1.09491	31.2256
C22:0	0.00000	0.0000
C24:0	6.22674e-1	17.8374
Totals :		6877.3971

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Perfil de ácidos grasos para el pretratamiento enzimático fermentado con *L. acidophilus* a las 6 horas**





Data File C:\CHEM32\1\DATA\ICTA\FAME 20150611 2015-11-06 11-57-12\C2-0002520.D  
 Sample Name: 15-0391A

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
16.293	VB	11.68798	20.14952	235.50711		C12:0
21.184	BB	2.63054	19.46872	51.21318		C14:0
25.450	BB	45.59850	22.80518	1039.88196		C16:0
29.098	BB	2.75611	25.79960	71.10653		C18:0
29.437	BV	10.36706	25.69622	266.39429		C18:1
30.251	BB	23.50105	35.92534	844.28324		C18:2
31.441	BB	85.36023	44.89479	3832.22962		C18:3
33.993	VB	1.07545	28.45694	30.60400		C20:0
38.643	BB	7.91966e-1	30.88680	24.46129		C22:0
44.753	BB	6.05664e-1	28.46976	17.24312		C24:0
Totals :				6448.80724		

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)  
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (C10:0)

=====

Summed Peaks Report

=====

Signal 1: FID1 A,

=====

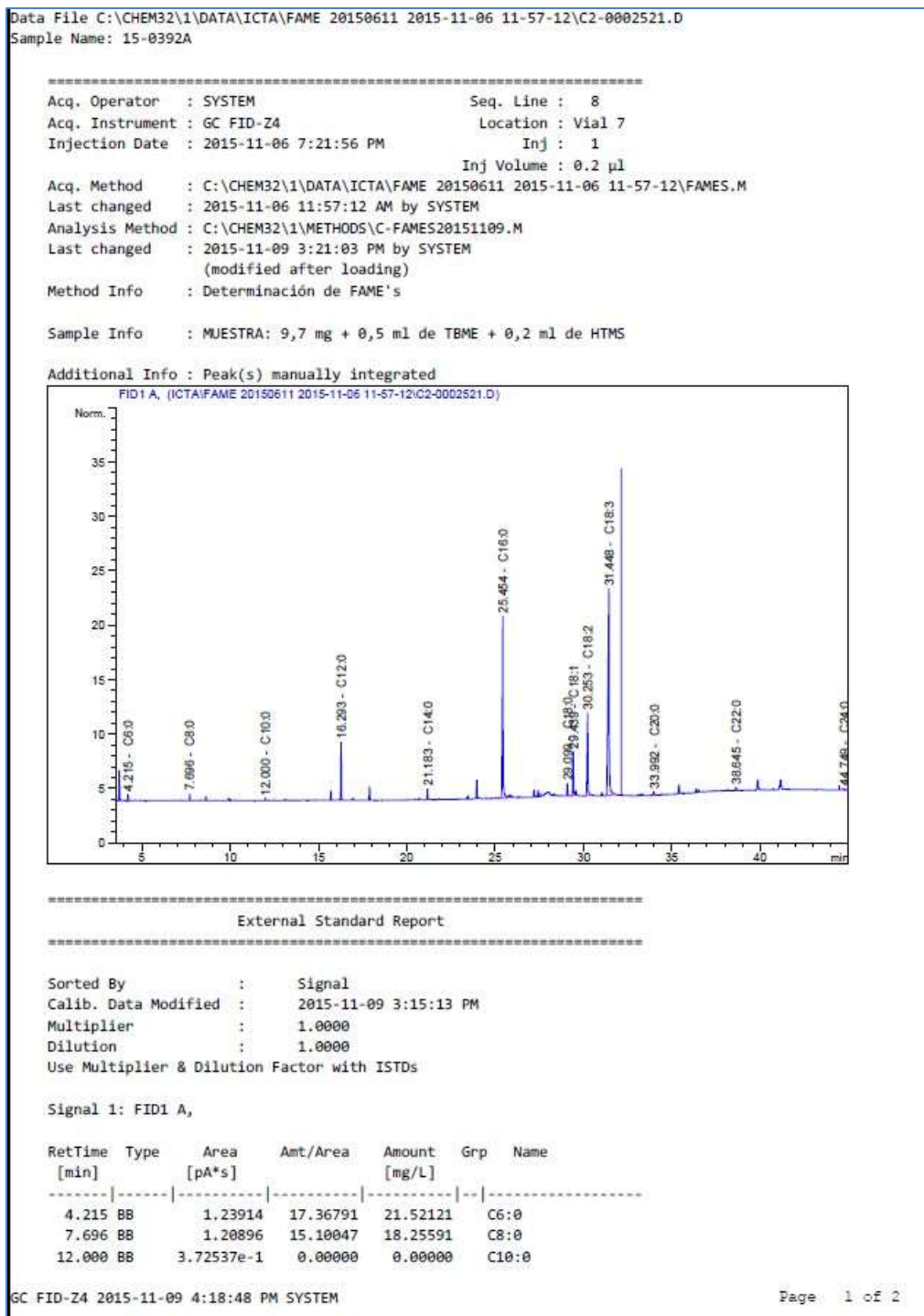
Final Summed Peaks Report

=====

Name	Total Area [pA*s]	Amount [mg/L]
C6:0	1.15350	19.3090
C8:0	1.13610	16.5739
C10:0	3.50974e-1	0.0000
C12:0	11.68798	235.5071
C14:0	2.63054	51.2132
C16:0	45.59850	1.040e3
C18:0	2.75611	71.1065
C18:1	10.36706	266.3943
C18:2	23.50105	844.2832
C18:3	85.36023	3.832e3
C20:0	1.07545	30.6040
C22:0	7.91966e-1	24.4613
C24:0	6.05664e-1	17.2431
Totals :		6448.8072

\*\*\* End of Report \*\*\*

**Perfil de ácidos grasos para el pretratamiento enzimático fermentado con Yomix@205, a las 21 horas**



Data File C:\CHEM32\1\DATA\ICTA\FAME 20150611 2015-11-06 11-57-12\C2-0002521.D  
 Sample Name: 15-0392A

RetTime [min]	Type	Area [pA*s]	Amt/Area	Amount [mg/L]	Grp	Name
16.293	VB	11.52580	20.13936	232.12230		C12:0
21.183	BB	2.60842	19.45401	50.74430		C14:0
25.454	BV	50.77305	22.81399	1158.33579		C16:0
29.099	BB	2.89376	25.85790	74.82663		C18:0
29.439	BV	11.29510	25.85805	292.06939		C18:1
30.253	BB	25.43639	36.00204	915.76205		C18:2
31.448	BB	96.06982	45.01133	4324.23012		C18:3
33.992	BB	1.13367	28.63552	32.46309		C20:0
38.645	BB	8.84854e-1	31.28061	27.67876		C22:0
44.749	BB	6.55115e-1	28.95823	18.97097		C24:0
Totals :				7166.98054		

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)  
 Warning : Negative results set to zero (cal. curve intercept), (C10:0)

Summed Peaks Report

Signal 1: FID1 A,

Final Summed Peaks Report

Signal 1: FID1 A,

Name	Total Area [pA*s]	Amount [mg/L]
C6:0	1.23914	21.5212
C8:0	1.20896	18.2559
C10:0	3.72537e-1	0.0000
C12:0	11.52580	232.1223
C14:0	2.60842	50.7443
C16:0	50.77305	1.158e3
C18:0	2.89376	74.8266
C18:1	11.29510	292.0694
C18:2	25.43639	915.7621
C18:3	96.06982	4.324e3
C20:0	1.13367	32.4631
C22:0	8.84854e-1	27.6788
C24:0	6.55115e-1	18.9710
Totals :		7166.9805

\*\*\* End of Report \*\*\*



## Bibliografía

- Agudelo C., Ortega R., H. J. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos *Lactobacillus plantarum* A6E y bacterias ácido lácticas de yogurt. *Facultad de Ciencia Agropecuarias, Vol.8*, 8–16.
- Alvear, G. (2010). *Estudio de factibilidad para el procesamiento y comercialización de yogur en Pedro Vicente Maldonado - Pichincha. Trabajo de grado (Ingeniero en Agroempresas)*. Universidad San Francisco de Quito.
- AOAC. (1997). Association of Analytical Chemists. Official Method 994.12. AOAC International.
- AOAC. (1998a). Association of Analytical Chemists. Official Method 925.10. AOAC International.
- AOAC. (1998b). Association of Analytical Chemists. Official Method 942.05. AOAC International.
- AOAC. (1998c). Association of Analytical Chemists. Official Method 950.15. AOAC International.
- AOAC. (1998d). Association of Analytical Chemists. Official Method 960.52. AOAC International.
- AOAC. (1998e). Association of Analytical Chemists. Official Method 981.12. AOAC International.
- Araya L., H., Clavijo R., C., & Herrera, C. (2006). Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 56(4), 361–365.
- Arenas, C., Zapata, R., Gutierrez, C. (2012). Evaluación de la fermentación láctica de leche con adición de quinua (*Chenopodium quinoa*). *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 19(August).
- Avella, D. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. In *Universidad Autónoma de Querétaro* (pp. 1–5).
- Avilez M., J. (2009). *Enzimas*. Argentina: El Cid.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. 4ta Ed. México, Pearson Educación.

- Barboza-Corona, J .E., Vázquez-Acosta, H., Salcedo, R., Bautista-Justo, M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*, 14(3), 32–38.
- Battcock, M. Azam-Ali, S. (1998). Fermented fruits and vegetables: a global perspective. In *FAO 134*.
- Bernal, L. (2012). *Evaluación de las Propiedades Bioactivas de Mora (Rubus glaucus) y Agraz (Vaccinium meridionale Swartz), en Fresco y Durante Procesos de Transformación*. Tesis. Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Bogdanov, S. (2012). The Bee Pollen Book. *Chapter 1*. Retrieved from Available at: [www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net)
- Bogotá, A., & Giovanni, R. (2002). El polen de la subclase Asteridae en el Páramo de Monserrate. In *Universidad Distrital Francisco José de Caldas - Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico* (p. 128).
- Buitrago, J. (2007). *Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado (Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana.
- Cabeza, E. (2006). Bacterias ácido-lácticas ( BAL ): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. *Conferencia Dada En: Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes En El Sector Productivo”, Universidad Libre, Barranquilla – Colombia*.
- Caicedo, M. (2010). *Estudio de la viabilidad de la incorporación de bacterias probióticas micro encapsuladas en helados*. Trabajo de grado. Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations : role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 131–149.
- Castro, L., Zuluaga, C., & Quicazan, M. (2014). Contenido protéico y digestibilidad aparente de polen apícola y pan de abejas del Altiplano Cundiboyacense. *Congreso Ciencia, Investigación Y Tecnología IICTA 2014*, pp. 97–102, Colombia, Medellín,.
- Castro, L., Zuluaga, C., Quicazan, M. (2014). Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. *Encuentro Nacional de Investigadores. Universidad Nacional*.
- Cóccaro, G. C. (2010). Desarrollo de Nuevos Productos. *Alimentos Funcionales*, 4–54.
- Collado Amores, M. C. (2004). *Caracterización de cepas del genero bifidobacterium con*

- caracter probiotico. Tesis Universidad Politecnica de valencia. Departamento de Biotecnología.*
- CONPES, 3527. (2008). Política Nacional de Competitividad y Productividad. Consejo Nacional de Política Económica y Social. *Cundinamarca. Bogotá*, pp. 87–135.
- Coronel, B. B., Grasso, D., Pereira, S. C., & Fernández, G. (2004). *Caracterización bromatológica apícola argentino. Concepción del Uruguay, Argentina. ISSN:0327-5566* (Vol. 29).
- Cortes, W. (2011). Lignocellulosic materials as source of biofuels and chemical. *Ciencia Y Tecnología Aeronáutica*, 16, 41–46.
- Cortínez, V. (2010). *Comparación De Pretratamientos En Residuos Forestales Para La Producción De Bioetanol De Segunda Generación: Hidrólisis Ácida Y Líquidos Iónicos. Universidad de Chile. Universidad de Chile.*
- CPAA. (2011). Plan estratégico de acción 2011 – 2025. In *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá* (pp. 3–39).
- Crueger, M. (1993). *Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Zaragoza, España: Acribia.*
- Cuenca, M. (2014). *Desarrollo de una herramienta instrumental de gusto artificial aplicable a bebidas alcohólicas a base de miel de abejas Desarrollo de una herramienta instrumental de gusto artificial aplicable a bebidas alcohólicas a base de miel de abejas. Tesis. Doctorado en Ingeniería Química y Ambiental. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.*
- Del Castillo Shelly, R. R., & Lagarriga, J. M. (2004). Productos lácteos. Tecnología. In *Univ. Politèc. de Catalunya. (Vol. 161., p. 228). Barcelona.*
- Del Risco, C. A. (2002). Polen-Pan de Abejas: Composición, Nutrición, Acción en la Salud Humana y Microbiología. In *Conferencia de polen. Estación experimental Apícola de la Habana, Cuba* (pp. 1–7).
- Domínguez, E., Mercado, J. A., Quesada, M. A., & Heredia, A. (1999). Pollen sporopollenin : degradation and structural elucidation. *Springer-Verlag*, 12, 171–178.
- Dong, J., Gao, K., Wang, K., Xu, X., & Zhang, H. (2015). Cell Wall Disruption of Rape Bee Pollen Treated with Combination of Protamex Hydrolysis and Ultrasonication. *Food Research International*, 75, 123–130. doi:10.1016/j.foodres.2015.05.039
- Durán, A. (2014). *Diseño de un sistema de secado y separación de impurezas para polen apícola en Colombia. Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional, sede Bogotá.*
- Dussart, E., & Bartholomé, Y. (2007). Taller elaboración de subproductos de la miel y las

colmenas. IICA. Managua, Nicaragua.

FAO y OMS. (2006). Probióticos en los alimentos propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.

Farnworth, E.R., Mainville, I., Desjardins, M.-P., Gardner, N., & Fliss, I., Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 174–181.

Fuenmayor, C. (2009). *Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico*. Tesis. Magíster Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

Fuenmayor, C., Zuluaga D, et al. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del polen apícola colombiano. *Revista MVZ Córdoba*, 19(1), 4003–4014.

Fuenmayor, C.A., M.C. Quicazán, and J. F. (2011). *Desarrollo de un Suplemento Nutricional mediante la Fermentación en Fase Sólida de Polen de Abejas empleando Bacterias Ácido Lácticas Probióticas*. Tesis. Magíster en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

García, D., & Rojas, M.A., Sanchez, J. (2006). Del Tracto Intestinal y Polen Almacenado de *Apis mellifera* ( Hymenoptera : Apidae ) Cultured Microbiological Content of the Intestinal Tract and Stored Pollen of *Apis mellifera* ( Hymenoptera : Apidae ). *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 123–129.

Garzon, A. (2007). *Evaluación de la cinética de crecimiento para Escherichia coli ATCC 25922, y estandarización de un método alternativo de preservación a corto plazo empleando Buffer Fosfatos*. Trabajo de grado (Microbiología Industrial).

Gasparotto, J. (2013). Quantificação das vitaminas antioxidantes E, C (ácido ascórbico), pró-vitamina A e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil. *Universidade de Sao Paulo*.

Gavarayeba, N. (1996). Sporoderm development in *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae): a probable role of the endoplasmic reticulum. *Nordic Journal of Botany*, 16(3), 307–323.

Geankoplis, C. (2006). *Procesos de transporte y principios de procesos de separación*. 4<sup>a</sup> Ed., México: Continental.

Gilliam, M. (1979). Microbiology of Pollen and Bee Bread: The Yeasts. *Apidologie*, 10(1), 43–53.

González-Montiel, L., Bravo-Delgado, C., Pimentel-González, D., Campos-Montiel, R.



- (2010). Viabilidad de cepas probióticas en leche fermentada almacenada en refrigeración. *Universidad de Guanajuato - XII Congreso Nacional de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 81–90.
- Gonzalez, A., & Gisell, C. (2000). Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(3), 281–285. Retrieved from Available at: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222000000300011&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000300011&lng=es&nrm=iso)
- Gonzalvo, S. (2001). Métodos para la determinación de la digestibilidad in vitro de alimentos para animales monogástricos. *Revista Computarizada de Producción Porcina.*, 8(2), 70–79.
- Grintzalis, K., Georgiou, C. D., & Schneider, Y.-J. (2015). An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination. *Analytical Biochemistry*, 480(1), 28–30.
- Guern, J. L. (1995). Microbiología Alimentaria. In *Capítulo 7: Los vegetales fermentados*. Zaragoza, España: Acribia.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N., & Scannell, A. G. M. (2011). Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds. *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 346–355.
- Heller, K. J. (2008). Bacterias Probióticas en Alimentos Fermentados. Características de los Productos y Microorganismos Iniciadores, 23–30.
- Hernandez, J. (2014). Estudio comparativo de las propiedades Fisicoquímicas y Valor Nutricional del Polen Corbicular de *Apis mellífera* L. (HYMENOPTERA: APOIDAE) de algunas zonas Geográficas Colombianas. *Universidad Del Tolima*.
- Hesse M, Halbritter H, Zetter R, Weber M, Buchner R, Frosch-Radivo A, et al., E. (2009). *Pollen terminology - an illustrated handbook*. Wien: Springer-Verlag.
- Holzappel, W., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J, and Shcillinger, U., W. H. (2001). Taxonomy and importante features of probiotic microorganisms in fodd and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S–73S.
- Hülya, Ö., Sevil, P., Ahmet, K., Musa, D., Ferhat C., Birol, B., Ahter, Y., y S. B. (2011). Pollen morphology of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae) in Turkey. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(4), 316–327.
- Human, H., & Nicolson, S. W. (2006). Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67(14), 1486–92.

- ICONTEC. (1994). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Alimentos para animales. Determinación de la digestibilidad con pepsina de la proteína de origen animal., *NTC 719*, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (1997). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología Guía general para el recuento de mohos y levaduras. Técnica de recuento de colonias a 25 °C, *NTC 4132*, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (2000). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de alimentos y alimentos para animales Método horizontal para el recuento de *Clostridium sulfito reductores* e identificación de *Clostridium perfringens*. Técnica de recuento de colonias, *NTC 4834*, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (2001a). *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Calidad de agua Enumeración de Coliformes y Escherichia coli. Técnica con tubos de fermentación y técnica de sustrato enzimático.*
- ICONTEC. (2001b). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Grasas y aceites vegetales y animales. Análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos por cromatografía de gases., *NTC 5013*, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (2005). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Productos lácteos. Leches fermentadas., *NTC 805*, bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (2007a). *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de alimentos y alimentos para animales Método horizontal para el recuento de Estafilococos coagulasa positiva (Staphylococcus aureus y otras especies).*
- ICONTEC. (2007b). *Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de alimentos y alimentos para animales Método horizontal para la detección de Salmonella spp.*
- ICONTEC. (2009). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C, *NTC 4519*, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- ICONTEC. (2014). Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Grasa y aceites animales y vegetales. Cromatografía de gases de esterios metílicos de ácidos grasos. Parte 2: Preparación de esterios metílicos de ácidos grasos., *NTC 4967*, Bogotá, Colombia: ICONTEC.
- Ingraham, J., Ingraham, C. (1998). *Introducción a la Microbiología*. Barcelona, España: Reverté.

- Instrução. (2001). Normativa nº 3 Anexos V-VI. Regulamento Técnico para Fixação e Qualidade de Pólen Apícola, Própolis. Brasil: Ministerio de Agricultura, Cría y Abastecimiento en Brasil, Secretário de Defesa Agropecuária.
- Jean-Prost, P. (2007). Apicultura: Conocimiento de la abeja. Manejo de la colmena. In Mundi-Prensa (Ed.), *4a. ed* (p. 792).
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., & Axelsson, L. (2012). In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(1-2), 216–22.
- Juárez, C. (2010). *Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camaron*. Tesis. Especialización en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Kostić, A., Barać, M., Stanojević, S., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Z., Šikoparija, B., ... Pešić, M. (2015). Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT - Food Science and Technology*, *62*, 1–9.
- Kroyer, G., & Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *2*(3), 171–174.
- LABUN, (Laboratorio de Investigaciones en Abejas). (2006). *III Encuentro Colombiano sobre Abejas Silvestres*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(2), 67–78.
- Lesser, R. (1987). *Manejo y Crianza Practica de las Abejas*. Andres Bello, Santiago de Chile.
- Liaset, B., Julshamn, K., & Espe, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. *Process Biochemistry*, *38*(12), 1747–1759.
- Loper G.M., L.N. Standifer, et al. (1980). Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*prunus dulcis*) pollen and bee bread, *11* (1)(63-73).
- López, L. N., Cárdenas, A. A., & Zambrano, R. G. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos Evaluation of chemical pretreatments for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues cassava ( *Manihot esculenta* Crantz ). *Rev.Fac.Ing.Uni.Antioquia*, *69*, 317–326.
- Lucas, E. (2009). *Biotecnología de alimentos*. Argentina: El Cid.
- Mancha Agresti, P., Gala-García, A., LeBlanc, J. G., de Moreno de LeBlanc, A., Azevedo, V., & Miyoshi, A. (2012). Uso potencial de bacterias lácticas como vehículos

- vacunales. *Vacunas*, 13(1), 15–20.
- Martinez, T. (2006). Diagnostico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Dirección de cadenas productivas. Bogotá. Colombia.
- Mazzeo, T., et al. (2011). Effect of two cooking procedures on phytochemical compounds, total antioxidant capacity and colour of selected frozen vegetables. *Food Chemistry*, 128(3), 627–633.
- Mesa, Valencia, A. F. (2015). *Caracterización fisicoquímica y funcional del polen de abejas (apis mellifera ) como estrategia para generar valor agregado y parámetros de calidad al producto apícola*. Tesis. Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
- Montaño, A., et al. (2010). Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas Y Aceites*, 43(6), 352–360. doi:10.3989/gya.1992.v43.i6.1132
- Montenegro, G., Pizarro, R., Mejías, E., & Rodríguez, S. (2013). Evaluación biológica de polen apícola de plantas nativas de Chile. *Journal of Experimental Botany*, 9457(82), 7–14.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(5), 1096–101.
- Morales, J. et al. (2000). Obtención de un extracto de garbanzo ( *Cicer arietinum* L .) fermentado y su uso como extensor lácteo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(2).
- Moreno, L. J. (2012). *Aislamiento y Selección de Lactobacillus sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas*. Tesis. Magister en Ciencias-Microbiología. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Munategui, S., Sancho, M. T., López, J., Huidobro, J. F., & Simal, J. (2010). Separación de las clases de lípidos neutros de polen apícola mediante cromatografía líquida de alta resolución ( HPLC ). *Revista Grasas Y Aceites Consejo Superior de Investigaciones Científicas*, 42(4), 277–280.
- Munategui, S., & Simal, J., et al. (1989). Estudio de los ácidos grasos del polen apícola. *Universidad de Santiago de Compostela*, 40, 81–86.
- NCH, 3255. (2011). *Norma chilena sobre Polen apícola- Calidad de la colmena para*

- polinización y diferenciación del polen según origen botánico mediante ensayo palinológico*. Chile.
- NMX-FF-094-SCFI. (2008). *Norma Mexicana sobre Productos alimenticios no industrializados para consumo humano- polen (pollinis)*. México.
- 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*.
- Olivera, J. (2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche . *Unidad de Tecnología de Alimentos - Facultad de Agronomía*.
- Ortiz, D., Cogua, J. (1989). Reconocimiento de Granos de Polen de Algunas Plantas Melíferas en la Sabana de Bogotá, *VI*, 52–63.
- Parra, R. A. (2010). Bacterias Acido Lacticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencia Agropecuarias*, 8 (1).
- Pavan, M., & Worth, A. (2008). A set of case studies to illustrate the applicability of DART (Decision Analysis by Ranking Techniques) in the ranking of chemicals. *European Commission report EUR23481 EN. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. Available online at: [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/computational\\_toxicology/doc/EUR\\_23481\\_EN.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/computational_toxicology/doc/EUR_23481_EN.pdf) (accessed 26.03.12.)*.
- Perea-Villamil, J. A., Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*, 41(2), 128–34.
- Piñeros, Y., Velasco, G., Proaños, J., Cortes, W., Ballesteros, I. (2011). Producción de azúcares fermentables por hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada mediante explosión con vapor Production of fermentables sugars by enzymatic hydrolysis of steam-exploded rice husks, *24*(2), 23–28.
- Prieto, C. (2007). *Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas*. Tesis doctoral. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. España.
- Proaños, J., & Castro, P. (2014). Evaluación de la producción de ácido láctico a partir de cascarilla de arroz por *Lactobacillus delbrueckii*, *4*(1), 33–39.
- Puerta Quintero, G. I. (2010). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. *Avances Técnicos Cenicafé*, 402(0120-0178), 8–10. Retrieved from <http://www.cenicafe.org/es/publications/avt0402.pdf>
- Quicazán, M. C. (2012). *Aplicación de fermentación láctica como alternativa en el*

- desarrollo de bebidas de soya en Colombia*. Tesis. Doctorado en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Ramirez, C. (2008). *Metodología para el seguimiento de los procesos de fermentación*. Universidad del Valle Cali.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., & Kumar, E. V. (2008). Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review. *Biotechnology Advances*, 26(1), 22–34.
- Risco-Ríos, C. A., Pérez-Piñeiro, A., Álvarez-Rivera, V. P., Rodríguez-Castro, G., Leiva-Castillo, V., & Puig-Peña, Y., Garcia-Neninger, R. (2012). Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.*, 43 (1), 17–21.
- Rodriguez, J. (2006). *Microorganismos y salud: Bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas*. 1ª Ed., Madrid, España: Complutense.
- Rojas, L. (2011). *Evaluación de pretratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma , para la producción de azúcares fermentables*. Tesis. Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Rojas, J. Quicazán, M. Mojica, A. (2015). Implementación De Un Método Cromatográfico Para La Determinación De Azúcares, Etanol Y Glicerol En Hidromiel. *Encuentro Nacional de Investigadores. Universidad Nacional*.
- Ruiz, M. . (2010). Tratado de Nutrición. In *Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los alimentos*. 2ª Ed., Madrid: Médica Panamericana.
- Saavedra, C., Kelina, I., Rojas, I., Delgado, P., & Guillermo, E. (2013). Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque – Perú). *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España Y Portugal*, 40(1), 71–78.
- Salazar, C. (2014). *Evaluación de diferentes condiciones del proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola*. Tesis. Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.
- Sánchez, M. (2010). *Producción de Proteasas con Bacillus licheniformis ATCC 12759 y su Acción Hidrolítica sobre Proteínas de Arroz (Oryza sativa L.) y Maíz (Zea mays L.)*. Tesis, Magíster Scientiarum en Biotecnología Alimentaria, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Valencia, República Bolivariana de Venezuela.
- Sarmiento, R. L. A. (2006). Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. *Revista Orinoquía-Universidad de Los Llanos.*, 10(1), 16–23.
- Schlegel, H.G. y Zaborosch, C. (1997). Fermentación láctica y Lactobacteriáceas. In *Microbiología General*, 7 ed., Ed. Omega (pp. 302 – 309).

- Scragg, A. (2002). Biotecnología para ingenieros: sistemas biológicos en procesos tecnológicos. *Edt Limusa. México*, 283–314.
- Seeley, T. . (2006). *Ecología da abelha: Um estudo de adaptação na vida social. Paixão-Porto Alegre*. Porto Alegre Paixão.
- Serna, L., Rodríguez de Stouvenel, A. (2005). Producción de ácido láctico por una mezcla de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus salivarius* en fermentaciones en discontinuo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7 (1)(1909 - 8758).
- Silva, M., Jacobus, N. V, Deneke, C., & Gorbachl, S. L. (1987). Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* Strain, 31(8), 1231–1233.
- Somerville, D. (2001). Nutritional Value of Bee Collected Pollens. *A Report for the Rural Industries Research and Development Corporation.*, (01).
- Thomas, M., Rodriguez, S. (2012). Plantas de interés apícola den el paisaje: observaciones de campo y la percepción de apicultores en república dominicana. *Revista Geográfica de América Central.*, 1(48), 133–162.
- Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. 9 Edición. EE.UU: Médica Panamericana.
- Tutt, M., Kikas, T., & Olt, J. (2012). Influence of different pretreatment methods on bioethanol production from wheat straw. *Agronomy Research Bioystem Engineeering Special*, (1), 269–276.
- Valenzuela, A., & Sanhueza, J. (2009). Aceites de origen marino; Su importancia en la nutrición y en la ciencia de alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 246–257.
- Vamanu, E., Vamanu, A., Popa, O., & Narcisa, B. (2010). The Antioxidant Effect of a Functional Product Based on Probiotic Biomass , Pollen and Honey. *University of Agronomic Sciences and Veterinary*, 43(59), 331–336.
- Vamanu, E., et al. (2008). Probiotic Product Based on Pollen and Honey. *Applied Biochemistry and Biotechnology Center*, 59(1), 14.
- Velasco, A. A. (2002). *Manual de prácticas de laboratorio de Biotecnología Agroindustrial II*. Universidad del Valle, Santiago de Cali.
- Ward, O.P., M. Calvo, and E. S. (1989). *Biotecnología de la Fermentación* (13 ed.). Zaragoza, España: Acribia.274.
- Yang K, Wu D, Ye X, Liu D, Chen J, S. P. (2013). Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. *J Agr Food Chem*, 61, 708–718.
- Zuluaga, C., Durán, A., & Díaz, C. (2012). Estrategias para la implementación de Buenas Prácticas en la cadena productiva de polen apícola en Colombia, 1–4.

Zuluaga, C., Serrato, J., & Quicazán, M. (2014). Valorization alternatives of colombian bee-pollen for its use as food resource – a structured review. *Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 21(3), 237–247.