Aplicación de fermentación láctica en el desarrollo de productos para la generación de valor en polen apícola

William Isidro Mora Adames

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2017

Aplicación de fermentación láctica en el desarrollo de productos para la generación de valor en polen apícola

William Isidro Mora Adames

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

Magister en Ingeniería Química

Directora:

Profesora asociada Marta Cecilia Quicazán de Cuenca

Codirector:

Profesor asociado Néstor Ariel Algecira Enciso

Línea de Investigación:

Procesos químicos y bioquímicos

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la calidad de alimentos y desarrollo de nuevos productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2017

El futuro tiene muchos nombres. Para los débiles es lo inalcanzable. Para los temerosos, lo desconocido. Para los valientes es la oportunidad.

Victor Hugo

Agradecimientos

El autor agradece y enaltece la labor investigativa del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, en especial a la Planta de investigación en procesos vegetales, al Laboratorio de microbiología de alimentos y al Laboratorio de análisis fisicoquímico de alimentos, lugares donde inicie mi labor profesional y se materializó un gusto particular por la investigación y la búsqueda de soluciones a multiplicidad de problemas e inconvenientes con los que cuenta el país a nivel agrícola.

Destaco al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias por el financiamiento del proyecto *Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales* y del programa *Jóvenes investigadores e innovadores* que me brindaron buena parte de los recursos para iniciar mi programa de maestría.

Todo el potencial humano y profesional que he alcanzado en los tres últimos años fue y sería impensable sin la oportunidad brindada por la profesora Marta Cecilia Quicazán un 20 de febrero de 2014 al permitirme iniciar labores en su grupo de investigación y ser parte del programa apícola que tantas enseñanzas y bonitas experiencias me han dejado. A ella con todos sus consejos, jalones de oreja y direcciones, mis más sinceros afectos.

A mi codirector Néstor Algecira, amigos y consejeros Angélica Benavides y Carlos Fuenmayor. La exitosa culminación de este proyecto se debe en buena parte a cada uno de los minutos que dedicaron de forma desinteresada a su revisión, corrección y direccionamiento en más de una oportunidad donde no descifraba que hacer.

No menos importantes son los lazos formados con el sector apícola a nivel nacional, agradeciendo específicamente el constante apoyo, generosidad y amistad con Baudilio

Suarez Neva, apicultor del municipio de Viracachá que siempre nos recibió con los brazos abiertos en su hogar y empresa, siendo proveedor del mejor polen del país.

A los estudiantes de pregrado que apoyaron el trabajo experimental: Joan Henao, Brian Castellanos y Giordan Vivas. Al profesor Carlos Zuluaga por enseñarme gran parte de la estadística empleada en el tratamiento de datos. Al ingeniero Amaury Blanco por la colaboración con el HPLC en sus ratos libres.

Un especial reconocimiento a todos mis amigos y compañeros de trabajo en mi paso por el ICTA: Luis Figueroa, Martha María, Mario Dávila, Nazly Pulido, Ana Ruby, Andrés Durán, Andrés Martínez, Maribel García, Claudia Hernández, Claudia Salazar, Leonardo González, Marta Esguerra, Héctor Monsalve, Álvaro Jiménez, Gregorio Medina, Esperanza Pulido, Carlos Julio Rincón, Yolanda Quiñones, Jorge Sandoval.

Resumen

En el presente trabajo se evaluaron diferentes condiciones de proceso para llevar a cabo la fermentación láctica de polen apícola a escala piloto como estrategia para mejorar la biodisponibilidad de sus nutrientes y generar valor agregado a través de su inclusión en bebidas lácteas fermentadas confiriendo características funcionales. En una primera etapa del proyecto se determinó la calidad del polen proveniente de *Apiarios Los cerezos* (Viracachá, Boyacá) como sustrato a fermentar lácticamente y se establecieron condiciones de higienización. Se evaluó el efecto de la relación agua:polen (1:1, 2:1), la intensidad del tratamiento térmico en recipiente presurizado a 115ºC, 80 kPa (10, 20 minutos) y la acidez inicial del medio (sin neutralizar, neutralizado) en procesos de fermentación láctica con cultivos comerciales CHOOZIT® MY800, CHOOZIT® MA4001 y HOWARU® Dophilus. Con seguimiento del pH, acidez titulable y morfología del grano, se determinó el tratamiento con mejores indicadores de fermentación para cada uno de los cultivos trabajados (relación 2:1, 10 minutos de tratamiento térmico, medio neutralizado). Dados los múltiples y reconocidos beneficios para la salud y la acción sinérgica de las bacterias lácticas en productos lácteos, el polen fermentado obtenido fue mezclado en proporciones del 5, 10, 20, 40 y 60% en yogur y kumis. El nivel de inclusión con mayor potencial, tanto en yogur como en kumis, se estableció ponderando la productividad de ácido láctico, la sinéresis, el análisis sensorial de calidad y el análisis sensorial hedónico a través de una función de beneficio-utilidad. Los productos seleccionados fueron kumis y yogur con inclusión del 5% de polen fermentado con cultivo CHOOZIT® MY800. Tras un estudio de almacenamiento en condiciones aceleradas se determinaron modelos para predecir la vida útil de los productos. Se estableció una ficha técnica de los procesos y productos desarrollados para facilitar su futura implementación en el contexto industrial colombiano.

Palabras clave: Polen apícola, fermentación láctica, bebidas lácteas funcionales, desarrollo de producto.

Abstract

In this work different process conditions were evaluated to carry out lactic acid fermentation of bee pollen as a strategy for improving the bioavailability of its nutrients and generate added value through inclusion in fermented milk drinks conferring functional characteristics. In a first stage of the project the quality of the pollen from *Apiarios Los cerezos* (Viracachá, Boyacá) was determined as substrate to lactic fermentation and it was established the necessity of submit it to sanitization processes. The effect of the water: pollen ratio (1: 1, 2: 1), the intensity of the heat treatment in pressurized vessel at 115ºC, 80 kPa (10, 20 minutes) and initial acidity of the medium (unneutralized, neutralized) in fermentative processes with commercial cultures (CHOOZIT® MY800, CHOOZIT® MA4001 and HOWARU® Dophilus) were evaluated. With pH, titratable acidity and grain morphology monitoring, the treatment with the best fermentation indicators for each of the cultures studied was determined (ratio 2: 1, 10 minutes of heat treatment, neutralized medium). Given the multiple and recognized health benefits and synergistic action of lactic acid bacteria in dairy products, the obtained fermented pollen was mixed in proportions of 5, 10, 20, 40 and 60% in yogurt and kumis. The inclusion level with greater potential, both yogurt and kumis, was established by weighting productivity, syneresis, sensory quality analysis and hedonic sensory analysis through a profit-utility function. The selected products were kumis and yogurt including 5% pollen fermented with CHOOZIT® MY800 culture. After storage study under accelerated conditions models were determined to predict product's shelf life. A technical datasheet of the processes and products developed was established to facilitate its future implementation in the Colombian industrial context.

Keywords: Bee pollen, lactic fermentation, functional dairy drinks, product development.

Contenido

Pág.

RESUMEN ..... **IX**

LISTA DE FIGURAS ..... **XIII**

LISTA DE TABLAS ..... **XVI**

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS ..... **XVIII**

INTRODUCCIÓN **1**

1. Objetivos **5**
1.1 Objetivo general 5
1.2 Objetivos específicos 5

2. Marco teórico **7**
2.1 Polen 7
2.2 Polen apícola 7
2.2.1 Caracterización fisicoquímica y bioactiva 10
2.2.2 Parámetros de calidad del polen apícola 12
2.3 Fermentación 13
2.3.1 Fermentación láctica 14
2.3.2 Microorganismos probióticos 15
2.3.3 Fermentación de polen apícola 16
2.4 Bebidas lácteas fermentadas 18
2.4.1 Yogur 19
2.4.2 Kumis 19
2.4.3 Parámetros de calidad 20
2.5 Estimación de la vida útil de los alimentos 21
2.5.1 Predicción de deterioro fisicoquímico 22
2.5.2 Predicción de deterioro microbiológico 24
2.5.3 Predicción de deterioro sensorial 25
2.5.4 Estudios en condiciones aceleradas 26

3. Materiales y métodos **29**
3.1 Materiales e insumos 29
3.1.1 Polen apícola 29

3.1.2 Leche 29
3.1.3 Azúcar 29
3.1.4 Agua potable. 30
3.1.5 Cultivos lácticos. 30
3.2 Metodologías analíticas 30
3.2.1 Determinación de impurezas macroscópicas en polen 30
3.2.2 Determinación de pH y acidez titulable 31
3.2.3 Microscopía óptica con tinción de fucsina. 31
3.2.4 Capacidad de retención de agua 31
3.2.5 Determinación de carbohidratos 31
3.2.6 Determinación de ácidos orgánicos 32
3.2.7 Determinación de color 33
3.2.8 Determinación de actividad antioxidante 33
3.2.9 Determinación de contenido de fenoles totales 34
3.2.10 Determinación de mohos y levaduras 35
3.2.11 Determinación de coliformes totales y fecales 35
3.2.12 Determinación de aerobios mesófilos 35
3.2.13 Determinación de cultivos lácticos específicos. 35
3.2.14 Análisis sensorial hedónico 36
3.2.15 Análisis sensorial de calidad 36
3.3 Estrategia experimental 37
3.4 Análisis estadístico 42

4. Resultados y discusión 43
4.1 Determinación de parámetros de calidad e inocuidad en polen apícola seco 43
4.2 Tratamientos de adecuación de polen apícola como insumo en proceso fermentativo 48
4.3 Seguimiento de procesos fermentativos de polen apícola higienizado 52
4.4 Inclusión de polen fermentado en bebidas lácteas fermentadas 61
4.5 Determinación y modelamiento de la vida útil de los productos seleccionados 70
4.5.1 Modelamiento de la vida útil bajo condiciones aceleradas 72

5. Ficha técnica de elaboración de bebidas lácteas fermentadas con inclusión de polen fermentado. 81

6. Conclusiones y recomendaciones 97
6.1 Conclusiones 97
6.2 Recomendaciones 99

A. Fichas técnicas de cultivos comerciales empleados 101
B. Evaluación sensorial en bebidas lácteas fermentadas 109

BIBLIOGRAFÍA 115

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1: Estructura del grano de polen floral (Zuluaga, 2016) 7
Figura 2-2: Exportaciones colombianas de polen, 2001 – 2007 (Laverde *et al.*, 2010). ... 9
Figura 2-3: Rutas metabólicas de fermentación láctica homofermentativa y heterofermentativa (Madigan *et al.*, 2010) 14
Figura 3-1: Esquema de los tratamientos implementados en la adecuación del polen apícola seco. 37
Figura 3-2: Diagrama explicativo de inclusión de polen fermentado en bebidas lácteas fermentadas. 40
Figura 4-1: Impurezas macroscópicas lipofílicas encontradas en polen apícola 45
Figura 4-2: Microscopía óptica del grano de polen seco sin tratamiento..... 49
Figura 4-3: Microscopias de polen después de tratamientos de adecuación (*n=20*). 50
Figura 4-4: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen no neutralizado con cultivo CHOOZIT MY800 LYO en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*). 53
Figura 4-5: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen neutralizado con cultivo CHOOZIT MY800 en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3)*..... 53
Figura 4-6: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen no neutralizado con cultivo CHOOZIT MA4001 en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3)*..... 54
Figura 4-7: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen neutralizado con cultivo CHOOZIT MA4001 en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*)..... 55
Figura 4-8: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen no neutralizado con cultivo *L. acidophilus* en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*)..... 56
Figura 4-9: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen neutralizado con cultivo *L. acidophilus* en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*)..... 56
Figura 4-10: Microscopias del polen antes y después del proceso fermentativo (*n=20*).57
Figura 4-11: Seguimiento cinético de bacterias ácido lácticas (izq.) y producción de ácido láctico (der.) de los mejores tratamientos seleccionados para cada cultivo trabajado (*n=3*) 61

Figura 4-12: Productividad de las mezclas de yogurt (Y) y kumis (K) con inclusión de diferentes porcentajes de polen fermentado con CHOOZIT MY800 (CA), CHOOZIT MA4001 (CB) y Howaru Dophilus (CC) (*n=3*). 62
Figura 4-13: Diagrama de utilidad-beneficio por técnicas de clasificación en yogur con inclusión de polen fermentado. 66
Figura 4-14: Diagrama de utilidad-beneficio por técnicas de clasificación en kumis con inclusión de polen fermentado. 67
Figura 4-15: Determinación del punto de corte en el estudio de vida útil del yogur desarrollado almacenado a 5ºC. 70
Figura 4-16: Determinación del tiempo de vida útil sensorial a 5ºC de yogur con inclusión de 5% de polen fermentado con intervalos de confianza del 95% 71
Figura 4-17: Determinación del punto de corte en el estudio de vida de kumis desarrollado almacenado a 5ºC para cada lote evaluado. 71
Figura 4-18: Determinación del tiempo de vida útil sensorial a 5ºC de kumis con inclusión de 5% de polen fermentado con intervalos de confianza del 95% 72
Figura 4-19: Ajuste de la acidez como factor de deterioro fisicoquímico en yogur desarrollado a 5, 20 y 35ºC. 74
Figura 4-20: Ajuste lineal del modelo de Arrhenius de la cinética de deterioro fisicoquímico de yogur 75
Figura 4-21: Ajuste del crecimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en yogur a 5 y 20ºC respecto a límite normativo (línea roja) 76
Figura 4-22: Modelamiento de acidez como factor de deterioro fisicoquímico en kumis desarrollado en función de la temperatura de almacenamiento 78
Figura 4-23: Ajuste del crecimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en yogur a 5 y 20ºC respecto a límite normativo (línea roja) 78
Figura 4-24: Ajuste lineal del modelo de Arrhenius de la cinética de deterioro fisicoquímico de kumis 79
Figura 5-1: Diagrama de flujo para la elaboración de polen fermentado 90
Figura 5-2: Diagrama de flujo para la elaboración de yogur o kumis base. 92
Figura 5-3: Diagrama de flujo para la producción de yogur y kumis con inclusión de polen fermentado 93
Figura 5-4: Modelo de etiqueta para yogur con inclusión de polen apícola fermentado desarrollado. 94
Figura 5-5: Modelo de etiqueta para kumis con inclusión de polen apícola fermentado desarrollado. 95
Figura B-1: Formato utilizado en la evaluación sensorial de bebidas lácteas fermentadas con inclusión de polen apícola 109
Figura B-2: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de yogur con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MY800. 112
Figura B-3: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de yogur con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MA4001. 112

Figura B-4: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de yogur con inclusión de polen fermentado con HOWARU DOPHILUS. 113
Figura B-5: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de kumis con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MY800. 113
Figura B-6: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de kumis con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MA4001. 114
Figura B-7: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de kumis con inclusión de polen fermentado con HOWARU DOPHILUS. 114

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1: Caracterización fisicoquímica del polen apícola del altiplano Cundiboyacense 10
Tabla 2-2: Contenido de minerales de polen colombiano proveniente del altiplano Cundiboyacense 11
Tabla 2-3: Características bioactivas del polen apícola. 12
Tabla 2-4: Normatividad para control de calidad fisicoquímico en polen apícola seco 12
Tabla 2-5: Requisitos microbiológicos a nivel internacional para polen apícola. 13
Tabla 2-6: Estado del arte en fermentación de polen apícola a escala laboratorio. 18
Tabla 2-7: Requisitos fisicoquímicos en yogur, kumis o bebidas lácteas probióticas. 20
Tabla 2-8: Requisitos microbiológicos en leches fermentadas. 21
Tabla 3-1: Diseño planteado en la higienización y adecuación de polen apícola. 38
Tabla 3-2: Muestreo de productos planteado en el estudio de vida útil. 42
Tabla 4-1: Índices de calidad microbiológica del polen apícola seco de *Apiarios Los Cerezos* en las diferentes etapas de procesamiento. 44
Tabla 4-2: Cuantificación de impurezas macroscópicas del polen en las diferentes etapas de procesamiento. 45
Tabla 4-3: Cuantificación de impurezas macroscópicas sedimentables del polen en las diferentes etapas de procesamiento. 47
Tabla 4-4: Parámetros del plan de muestreo de aceptación en lote de polen apícola con muestreos aleatorio de 20 g. 47
Tabla 4-5: Índices de calidad microbiológica del polen apícola sometidos a diferentes tratamientos de adecuación e higienización (*n=3*) 48
Tabla 4-6: Parámetros de selección del producto con mayor potencial de acuerdo a parámetros de productividad, estabilidad y aceptabilidad (*n=3*). 63
Tabla 4-7: Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los productos lácteos desarrollados. 68
Tabla 4-8: Caracterización bioactiva de los productos lácteos desarrollados frente a los productos sin inclusión de polen fermentado. 69
Tabla 4-9: Seguimiento de pH y acidez titulable (%ácido láctico) en yogur con inclusión de 5% de polen fermentado 73
Tabla 4-10: Constantes de reacción en función de la temperatura en cinética de deterioro fisicoquímico de yogur con inclusión de polen apícola fermentado. 74

Tabla 4-11: Seguimiento de pH y acidez titulable (%ácido láctico) en kumis con inclusión de 5% de polen fermentado..... 77
Tabla 4-12: Constantes de reacción en función de la temperatura en cinética de deterioro fisicoquímico de kumis con inclusión de polen apícola fermentado. 79
Tabla B-1: Calificación de parámetros sensoriales en bebidas lácteas según el tipo e intensidad de defecto encontrado.....111
Tabla B-2: Defectos clasificados por atributos para leches fermentadas. 111

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
Ea	Energía de activación	kJ/mol	
t	Tiempo	s	
k	Constante de reacción		
R	Constante universal de los gases	kJ/mol.K	

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
α	Nivel de significancia		
μ	Velocidad de crecimiento especifica		

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AACC	American Association for Clinical Chemistry
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
BAL	Bacterias Ácido Lácticas
BPA	Buenas Prácticas Agrícolas
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CME	Cuadrado Medio del Error
DART	Decision Analysis and Ranking Techniques
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
ICTA	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos
ISO	International Organization for Standardization
MRS	Man Rogosa Sharpe
NMP	Número Más Probable
NTC	Norma Técnica Colombiana
OGYE	Oxytetracycline Glucose Yeast Extract
PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SPC	Standard Plate Count
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UHT	Ultra High Temperature
UV	Ultravioleta

Introducción

La FAO estima que de 100 especies de cultivos que proporcionan el 90% del suministro de alimentos para 146 países, 71 son polinizados por abejas. El papel protagónico de estos insectos resulta vital para el mantenimiento de ecosistemas naturales por lo cual su uso y explotación por parte del hombre encabeza uno de los pocos procesos productivos realmente sostenibles a nivel mundial (Sánchez, Castañeda, Muños, & Tellez, 2013).

En Colombia se reconoció a cadena productiva de las abejas y la apicultura a través de la Resolución 282 del 13 de Agosto de 2012. No se le considera competitiva para el desarrollo agropecuario del país, aun cuando es una actividad que genera grandes beneficios para el medio ambiente y la economía rural por medio de la producción de miel, polen, propóleos, cera, jalea y larvas (Espinal, Martínez, & Peña, 2006). Es así que se debe replantear dicho juicio y establecer estrategias que permitan explorar y evidenciar el potencial económico y social que pueden llegar a generar los productos apícolas y sus derivados.

En el caso específico del polen recolectado por las abejas de la especie *Apis mellifera*, considerado como el segundo producto de la colmena con mayor potencial económico después de la miel (Krell, 1996). El país cuenta con ventajas geográficas excepcionales que permiten productividades del orden de los 36 kg por colmena año en zonas de bosques alto-andinos (Gutierrez, Osorio, & Salamanca, 2010). Dichas productividades sobresalen frente los 15 kg por colmena año promedio a nivel mundial (Ismail *et al.*, 2013; Laverde *et al.*, 2010; O'Neal & Waller, 1984).

Al reconocer el potencial del polen en la apicultura a nivel nacional, el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos – ICTA de la Universidad Nacional de Colombia estudió y resaltó la importancia nutricional y bioactiva del polen apícola como matriz vegetal que puede ser empleada en el desarrollo de productos funcionales de alto valor agregado e

impacto social (Blanco, Quicazán, & Cuenca, 2012; Castro, Zuluaga, Quicazán, Pastrana, & De Paula, 2014; Díaz, Zuluaga, Morales, & Quicazán, 2012; Durán, 2014; Fuenmayor, Quicazán, & Figueroa, 2011; Fuenmayor *et al.*, 2014; Hidalgo, Quicazán, & Figueroa, 2014; Salazar, Céspedes, & Díaz-Moreno, 2013; Salazar, Díaz, & Quicazán, 2012; Zuluaga, Serrato, & Quicazán, 2014; Zuluaga, Quicazán, & Serrato, 2014; Zuluaga, 2016; Zuluaga, Serrato, & Quicazán, 2015). Dicho reconocimiento se dio en el marco del proyecto "*Establecimiento de procesos de conservación y trasformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales"* financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias.

En este sentido cabe destacar investigaciones previas donde se ha realizado la inclusión de polen seco en diversas matrices como pulpas y salsas de frutas, barras con cereal y bebidas fermentadas de soya y leche semidescremada (Longo, 2012, 2013), así como en yogures saborizados con productos apícolas tales como miel y jalea real (Branco, Barros, Barros, Neves, & Ferreira, 2014; Lomova, Narizhnyi, & Snizhko, 2014; Lomova, Snezhko, & Narizhnyi, 2014; Chacún & Herrera Medina, 2010; Yerlikaya, 2014) y con adición de otros componentes como frutas y semillas (Pop *et al.*, 2014).

Igualmente se han realizado investigaciones para lograr a nivel laboratorio la fermentación ácido-láctica de polen (Alarcón, 2016; Alarcón & Quicazán, 2016; Benavides, 2016; Del Risco-Ríos *et al.*, 2012; Fuenmayor, 2009; Salazar-González & Díaz-Moreno, 2016). Las ventajas de buscar un producto con inclusión de polen fermentado, radica en una mayor asimilación de los nutrientes por parte del ser humano, ya que este bioproceso mejora su digestibilidad y su valor nutricional (Herbert & Shimanuki, 1978). Específicamente para el polen fresco o seco tradicionalmente incluido en diversas matrices alimentarias, algunos de sus nutrientes no pueden ser aprovechados al ser ingeridos, particularmente en el caso de animales monogástricos. Esto se debe principalmente a la resistente microestructura que recubre las partículas de polen para proteger la célula generativa, conocida como exina (Bell *et al.*, 1983; Fernandes-Da Silva & Serrao, 2000; Human & Nicolson, 2006 citados por Fuenmayor, Quicazán, & Figueroa, 2011). De hecho el polen recolectado por las abejas como fuente de proteína, aminoácidos, lípidos, vitaminas y minerales, solo es consumido tras haber sido sometido a un proceso fermentativo al interior de la colmena.

A pesar de los desarrollos realizados alrededor del tema, aún no se ha explorado la posibilidad de generar una salida comercial real para el polen fermentado producido con bacterias ácido-lácticas por problemas de estabilidad y aceptación sensorial propios del producto. El presente trabajo busca evaluar diferentes condiciones de proceso en la fermentación láctica de polen apícola que permitan la generación de valor agregado a través del desarrollo de productos alimenticios con características funcionales.

En el mercado actual, las tendencias observadas en el consumidor están orientadas a la obtención de nuevos productos que aporten a una vida más saludable, razón por la cual alimentos de alto valor nutricional o que reporten propiedades bioactivas cobran fuerza. De estos destacan los productos lácteos fermentados (queso, yogur, kumis) que además de ser fácilmente asimilables, reportan propiedades benéficas para combatir enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, alergias, problemas intestinales, entre otros (Pihlanto, Virtanen, & Korhonen, 2010). Se encuentran en la literatura reportes de yogures saborizados con productos apícolas tales como miel y jalea real (Branco *et al.*, 2014; Lomova *et al.*, 2014; Lomova, Snezhko, *et al.*, 2014; Chacún & Herrera, 2010; Yerlikaya, 2014) y de mezclas de estos con otros componentes como frutas y semillas (Pop *et al.*, 2014). Se tiene especial interés en las bebidas lácteas fermentadas para realizar la inclusión de polen fermentado. Ninguno de los alimentos que se han trabajado con polen apícola, a excepción de las bebidas fermentadas de soya y leche semidescremada, tiene un efecto probiótico en humanos, como lo tiene las bebidas lácteas fermentadas tipo kumis o yogur (Lomova, Narizhnyi, *et al.*, 2014).

Con la investigación que se presenta a continuación, se buscó estandarizar el proceso de fermentación láctica de polen apícola a escala piloto evaluando diferentes condiciones de proceso tales como la relación agua:polen, tratamientos térmicos y neutralización del medio fermentativo previa inoculación de cultivos lácticos comerciales. Tras seleccionar los tratamientos con mejor respuesta fermentativa se evaluó con criterios de productividad, aceptabilidad y estabilidad la inclusión del polen fermentado obtenido en bebidas lácteas fermentadas tipo yogur y kumis en proporciones del 5, 10, 20, 40 y 60%. Los resultados permitieron seleccionar el yogur y el kumis con mayor potencial y viabilidad técnica y comercial; estos productos fueron sometidos a condiciones de almacenamiento aceleradas y con seguimiento de parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales se determinó y modeló su tiempo de vida útil.

El cuerpo del documento se divide en cuatro grandes capítulos que evidencian la investigación desarrollada como requisito parcial para optar por el título de Magister en Ingeniería Química.

El primer capítulo sintetiza el marco conceptual alrededor de la definición y aptitud nutricional y bioactiva del polen apícola, así como el fundamento teórico tras los procesos fermentativos con especial énfasis en las fermentaciones lácticas, los microorganismos involucrados y estado del arte de su aplicación en esta matriz vegetal. Seguidamente se reseña las bebidas lácteas fermentadas tipo yogur y kumis. Se finaliza con una breve revisión bibliográfica alrededor de la estimación de la vida útil de los alimentos desde un enfoque predictivo del deterioro de sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales.

El segundo capítulo se refiere a los materiales utilizados y a las metodologías empleadas para el cumplimiento de los objetivos planteados. Se muestran las características de las materias primas empleadas, las metodologías analíticas seguidas y finaliza con la estrategia experimental que detalla el diseño con sus respectivas variables de respuesta.

El tercer capítulo muestra los datos experimentales obtenidos en cada una de las etapas con su respectivo análisis que sustenta la propuesta de límites permisible de impurezas macroscópicas en polen apícola seco, la selección del mejor tratamiento de adecuación de polen como sustrato en el proceso de fermentación láctica, la selección del nivel de inclusión de polen fermentado en bebidas lácteas fermentadas tipo yogur y kumis con mayor potencial bajo criterios de productividad, aceptabilidad y estabilidad y el modelamiento del tiempo de vida útil de estos productos.

El cuarto capítulo recopila el desarrollo de producto planteado a modo de ficha técnica de los productos desarrollados que sirva como medio de transferencia tecnológica al sector industrial en el contexto característico colombiano, en concordancia con los objetivos planteados.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar diferentes condiciones de proceso en la fermentación láctica de polen apícola que permitan la generación de valor agregado a través del desarrollo de productos alimenticios con características funcionales en el contexto característico colombiano.

1.2 Objetivos específicos

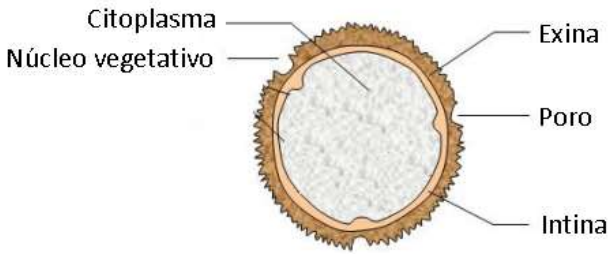
- Establecer condiciones de higienización y adecuación de polen apícola como insumo para el proceso de fermentación ácido-láctica a escala piloto.
- Determinar las condiciones de proceso adecuadas para obtener productos con inclusión de polen apícola fermentado con criterios de productividad, aceptabilidad y estabilidad.
- Establecer modelos que permitan predecir la vida útil de los productos desarrollados.
- Desarrollar la ficha técnica de los productos desarrollados con los soportes técnicos-científicos que sirvan de base para su implementación en el contexto industrial colombiano.

2. Marco teórico

2.1 Polen

Se entiende por polen al gametofito masculino que cumple la función biológica de fecundar el óvulo presente en las flores, en el proceso de reproducción sexual de las plantas. Se encuentra ubicado en los sacos polínicos de la antera de la flor; está conformado por una multitud de cuerpos microscópicos (20 a 40 µm), de diversas formas geométicas y aspecto variable (Del Risco, 2002). El grano de polen está compuesto por una parte central consistente en la célula viva u órgano esencial en la reproducción de la planta, rodeada por una membrana protectora compleja, la esporodermis (ver Figura 2-1). Las fibras de celulosa de la esporodermis (intina) le permiten al grano de polen ser elástico al aplastamiento mientras que una capa externa (exina) le ofrece resistencia mecánica (Hülya *et al.*, 2010) y protege el material genético de la planta de condiciones medioambientales tales como lluvia, viento, radiación solar y temperaturas extremas.

Figura 2-1: Estructura del grano de polen floral (Zuluaga, 2016)



2.2 Polen apícola

Definido como el “alimento producido a partir de la aglutinación del polen de las flores efectuado por abejas pecoreadoras mediante néctar y sus propias sustancias salivares,

que el hombre utiliza tras su recolección y subsiguiente elaboración (secado, limpieza y envasado)" (Baldi Coronel *et al.*, 1999).

En términos generales, su recolección se realiza mediante trampas para polen, que consisten en una lámina plástica de 2 mm de espesor provista de agujeros de aproximadamente 4,76 mm de diámetro en hileras a lo largo de la lámina, separadas por perfiles de madera de 5 mm de ancho y 10 mm de altura que se ubica en la entrada de las colmenas y obliga a las abejas a liberar el 50% del polen que haya recolectado al ingresar a la colmena. Los pellets caen a una bandeja y a medida que se van acumulando, son recolectados por el apicultor (Fuenmayor *et al.*, 2014).

Luego de su recolección el polen es transportado a las instalaciones de beneficio en donde es sometido a una operación de secado en la que se retira la humedad del polen hasta conseguir un valor de entre 3 - 8%. Tradicionalmente se secaba el polen a una temperatura no superior de 40ºC (CONACYT, 2004; Ministério da agricultura e do abastecimento, 2001), aunque estudios recientes han comprobado que este proceso se puede realizar mediante deshidratadores solares o de forma artificial en hornos eléctricos operados a temperaturas alrededor de 60 °C sin afectar el contenido nutricional o bioactivo del producto (Durán, 2014).

Debido a las condiciones de cosecha, en las que está expuesto a contaminantes extrínsecos (provenientes del medio) e intrínsecos (propios de la colmena), el polen contiene un porcentaje variable de impurezas que deben retirarse ya que estas restan valor comercial al polen. En la separación de estas, se implementan tamices que permiten retirarlas (Durán, 2014). Otro método consiste en la alimentación del polen a una tolva que dosifica el paso del producto a través de una corriente de aire que retira las impurezas más livianas por soplado (Díaz-Moreno, Zuluaga-Dominguez, Fuenmayor, & Martinez, 2009 citados por Durán, 2014).

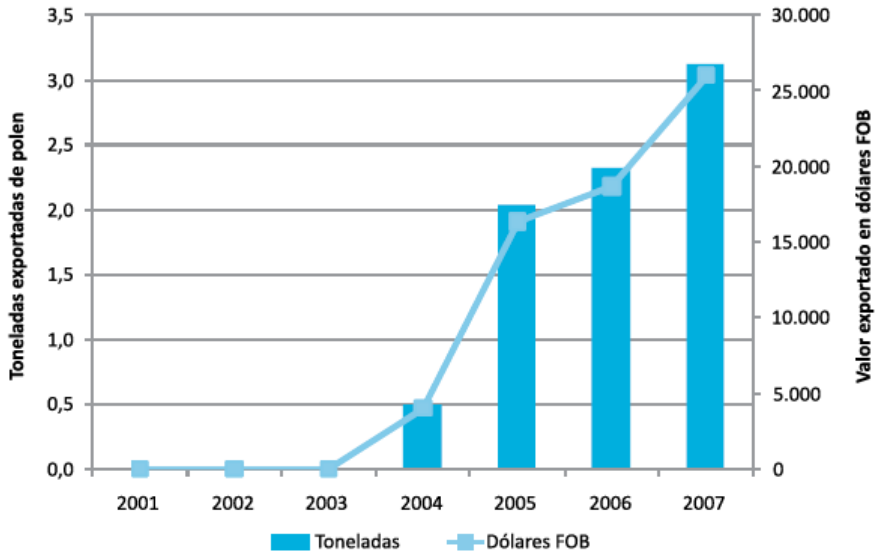
A nivel internacional, España es el principal productor de polen en Europa. En América, se produce polen en Colombia y, en menor escala, en Estados Unidos, Argentina y Chile. En el continente asiático, China presenta una producción total anual de polen de 3000 toneladas aunque con evidentes fallas en su procesamiento (Laverde *et al.*, 2010).

En el mercado nacional de productos apícolas, se estima que existen unos 2100 apicultores que manejan unas 40.000 colmenas (Martínez, 2006). Después de la producción de miel de abejas, el polen apícola se considera el segundo producto apícola de mayor potencial económico para el país. En zonas de bosques alto-andinos, se obtienen producciones del orden de los 35,4 a 48,9 kg por colmena año (Gutierrez *et al.*, 2010), con ventajas productivas que sobresalen de la producción de polen apícola a nivel internacional que ronda los 15 kg por colmena año (Ismail *et al.*, 2013; Laverde *et al.*, 2010; O'Neal & Waller, 1984).

La producción de polen, disponible para su cosecha a lo largo de todo el año, es vendido a comercializadores y se estima que solo el 36% de los productores comercializa el polen de manera fraccionada (Martínez, 2006). Según el ministerio de Agricultura, en los últimos cuatro años el costo promedio de producción de un kilo de polen oscila los 7.700 COP. El precio de venta final se establece entre los 12.000 y 25.000 COP (Espinal *et al.*, 2006).

Se reportan exportaciones de polen colombiano a partir del año 2004 principalmente a países centroamericanos, que superan las 3 toneladas en el año 2007 (Figura 2-2).

Figura 2-2: Exportaciones colombianas de polen, 2001 – 2007 (Laverde *et al.*, 2010).



2.2.1 Caracterización fisicoquímica y bioactiva

Se ha reportado en diversos estudios la calidad nutricional del polen, como excelente fuente de proteína, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Fuenmayor *et al.*, 2014; Herbert & Shimanuki, 1978).

Las características fisicoquímicas del polen dependen de su origen botánico (Almeida-Muradian *et al.*, 2005). Para el caso del polen apícola a utilizar en la presente investigación, proveniente del altiplano Cundiboyacense, se reporta la composición presentada en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Caracterización fisicoquímica del polen apícola del altiplano Cundiboyacense

Parámetro	**Promedio ± DE**	**Mínimo**	**Máximo**
pH	4,6 ± 0,4	3,8	5,4
Acidez (meq / kg)*	256 ± 67	155	402
Humedad (g /100 g)	7,7 ± 5,2	1,8	11,8
Cenizas (g / 100 g)*	2,5 ± 0,4	1,5	3,2
Lípidos (g /100 g)*	6,9 ± 3,5	2,8	9,7
Proteína (g / 100 g)*	23,8 ± 3,2	16,1	32,1
Fructosa* (g / 100 g)	19,5 ± 0,9	18,1	21,3
Glucosa* (g / 100 g)	13,6 ± 2,4	11,6	20,3
Sacarosa* (g / 100 g)	6,7 ± 2,0	4,5	9,0
Fibra dietaría soluble (g / 100 g)*	2,7 ± 1,8	0,5	4,6
Fibra dietaría insoluble (g / 100 g)*	11,7 ± 3,3	6,5	17,6
Fibra dietaría total (g / 100 g)*	14,5 ± 3,5	7,8	18,1

Fuente: (Fuenmayor *et al.*, 2014).

Se trata de un alimento rico en proteínas, posee los 20 aminoácidos, incluidos aquellos que no sintetizamos y que deben ser aportados por la dieta. Su aporte de ácidos grasos es importante; es especialmente rico en linoleico y linolénico, ácidos grasos esenciales que deben ser incorporados en la dieta (Baldi Coronel, Grasso, Chaves, & Fernández, 2004).

Cerca de la tercera parte de su valor calórico (246 kcal/100 g) es dada por los glúcidos, principalmente glucosa y fructosa, provenientes principalmente del néctar usado por las abejas para dar forma a los pellets de polen. También hay un contenido de oligosacáridos y polisacáridos, como almidón, calosa, pectina, celulosa, lignina, esporopolenina y sustancias derivadas de la lignina que también están presentes (Fuenmayor, 2009).

Entre las sales minerales se destaca la presencia de hierro, zinc, fósforo y un elevado cociente potasio/sodio, en menor proporción calcio, cobre, magnesio y (Fuenmayor *et al.*, 2014; Salazar, Díaz, & Quicazán, 2012). Para el caso del polen a utilizar, proveniente del altiplano Cundiboyacense, se tiene reportado el contenido mineral de calcio, potasio, zinc, hierro, cobre, sodio y magnesio (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Contenido de minerales de polen colombiano proveniente del altiplano Cundiboyacense

Origen	Boyacá	Cundinamarca
Sodio (ppm)	90,2±27,5[a]	137,1±96,9[b]
Potasio (ppm)	5029,5±1173,8[a]	5175,5±820,5[a]
Calcio (ppm)	1698,7±421,2[a]	1691,1±222,7[a]
Hierro (ppm)	63,0±26,2[a]	70,1±40,8[a]
Magnesio (ppm)	844,6±366,6[a]	977,6±247,9[a]
Cobre (ppm)	8,6±1,8[a]	9,0±2,0[a]
Zinc (ppm)	46,6±34,4[a]	47,5±15,7[a]

Promedios en la misma fila con la misma letra (superíndice) indican que no tienen diferencias significativas mediante una prueba de Tukey con un intervalo de confianza 95%. $X \pm DS$, n=20

Fuente: (Salazar, Díaz, & Quicazán, 2012)

Respecto al contenido de fibra dietaría encontrado, este constituye un factor de funcionalidad en polen apícola y se destaca por su contenido comparable con cereales y alimentos hortofrutícolas (Díaz *et al.*, 2012).

En cuanto a las propiedades bioactivas y antioxidantes, se han hallado valores apreciables de vitaminas, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides y otros compuestos antioxidantes (Fuenmayor *et al.*, 2014; Pulido, 2013; Salazar, Céspedes, &

Díaz-Moreno, 2013; Zuluaga, Quicazán, & Serrato, 2014). En la Tabla 2-3 se presentan algunos valores obtenidos en diferentes investigaciones.

Tabla 2-3: Características bioactivas del polen apícola.

Parámetro	**Referencia**		
	(Morais, *et al.*, 2011)	(Mărghitas *et al.*, 2009)	(Castro, *et al.*, 2014)
Fenoles totales (mg ácido gálico/g)	10,5-16,8	14,0±0,3	13,8±1,4
Carotenoides totales (mg β-caroteno/kg)	-	-	1685,7±4,3
Flavonoides totales (mg Quercetina/g)	-	3,8±0,1	4,36±0,35

2.2.2 Parámetros de calidad del polen apícola

En Colombia no existen reglamentos o normas referentes a la calidad del polen apícola en aspectos fisicoquímicos y microbiológicos. Adicionalmente, son pocos los que mantienen vigencia. En la Tabla 2-4 se presentan algunos parámetros de calidad fisicoquímica del polen apícola establecidos en el ámbito internacional.

Tabla 2-4: Normatividad para control de calidad fisicoquímico en polen apícola seco

Parámetro	**Argentina**	**Brasil**	**El Salvador**	**México**
Acidez libre (meq/kg)	–	Máx. 300,0	Máx. 300,0	–
pH	4–6	4,0 – 6,0	4,0 – 6,0	Mín. 4,0
Azúcares totales %	–	14,5 – 55,0	–	–
Cenizas (%)	Max.4,0	Máx. 4,0	Máx. 4,0	1,5 – 2,2
Fibra cruda (%)	–	Mín. 2,0	–	0,27 –0,70
Humedad (%)	Max. 8,0	Máx. 4,0	Máx. 4,0	4,5 – 8,0
Lípidos (%)	–	Mín. 1,8	–	2,5 – 6,5
Proteínas (%)	15–28	Mín. 8,0	–	12 –18

Fuente:(CONACYT, 2004; Ministério da agricultura e do abastecimento, 2001; Ministerio de agricultura ganadería y pesca, 2005; Ramos, 2008).

A nivel microbiológico, en la Tabla 2-5 se resumen algunos de los valores establecidos para su comercialización, de acuerdo a la normatividad manejada en países como México, Argentina y Brasil (Durán, 2014).

Tabla 2-5: Requisitos microbiológicos a nivel internacional para polen apícola.

Parámetro	México	Argentina	Brasil
Aerobios mesófilos (UFC/g)	$1*10^4$	$15*10^4$	-
Mohos y levaduras (UFC/g)	300	100	100
NMP coliformes totales	-	-	-
NMP coliformes fecales	-	-	0
***Salmonella spp*.**	Ausente	Ausente	Ausente
Staphylococcus aureus	Ausente	Ausente	-
Escherichia coli	Ausente	Ausente	-

Fuente: (Ministério da agricultura e do abastecimento, 2001; Ministerio de agricultura ganadería y pesca, 2005; Ramos, 2008).

2.3 Fermentación

El termino fermentación denota la propagación de microorganismos y la generación de productos bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. La secreción de metabolitos desde el interior de las células microbianas al medio circundante y su acumulación se produce como consecuencia de la oxidación de monosacáridos, particularmente glucosa, tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Mosier & Ladisch, 2009).

Como técnica, la fermentación se desarrolló para conservar los alimentos con un bajo requerimiento energético anterior al desarrollo de otras técnicas de conservación como la refrigeración, congelación y enlatado. Los ejemplos más extendidos de esta han sido el uso de bacterias del ácido láctico para reducir el pH y el empleo de levaduras para efectuar fermentaciones alcohólicas con el fin de obtener alimentos más nutritivos o digeribles, más seguros o modificar sus perfiles sensoriales (Bamforth, 2008).

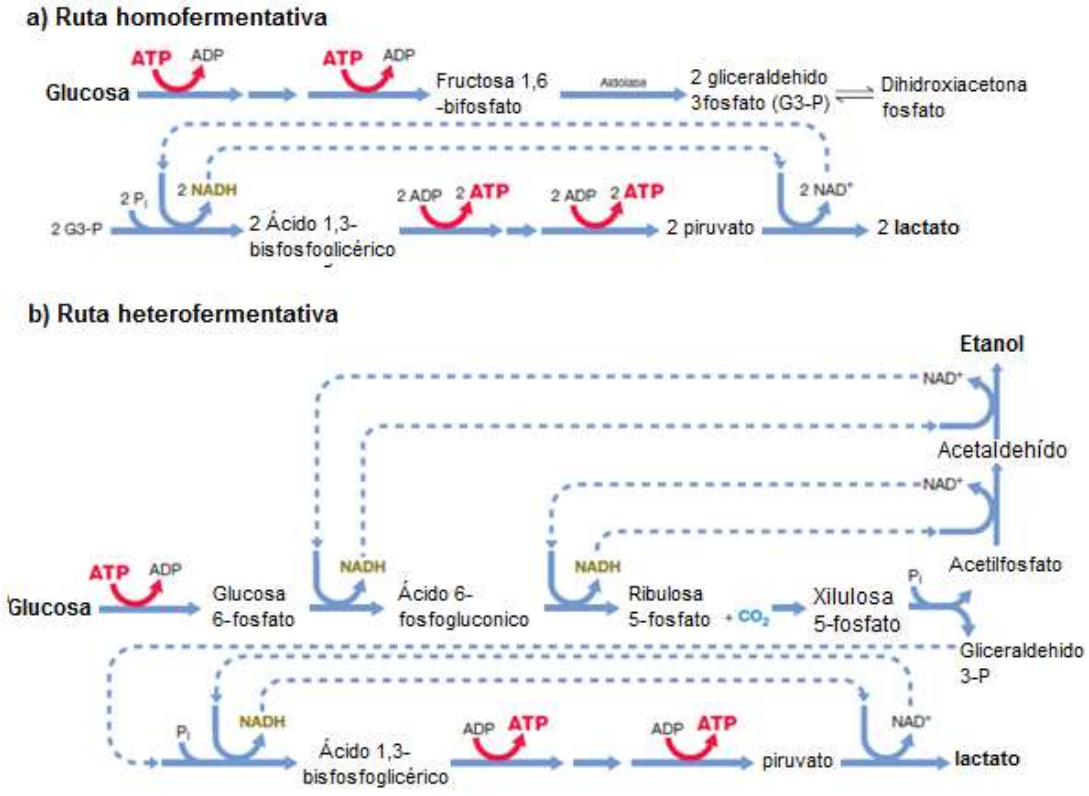
En un alimento fermentado, el microorganismo involucrado es fundamental. De este depende la naturaleza del producto obtenido y sus características fisicoquímicas,

microbiológicas y sensoriales finales. Alimentos como el queso, el pan, el yogur son ejemplos clásicos de alimentos fermentados (Okafor, 2007).

2.3.1 Fermentación láctica

Se entiende por fermentación láctica al bioproceso llevado por Bacterias Ácido Lácticas (BAL) donde la energía celular se deriva de la fermentación de carbohidratos para producir ácido láctico principalmente. Para ello, llevan a cabo dos rutas metabólicas diferentes: fermentación homoláctica y heteroláctica (Figura 2-3). En la ruta homofermentativa se produce lactato como producto mayoritario a partir de la degradación de la glucosa siguiendo la vía glucolítica Emden-Meyerhof Parnas (EMP), mientras que la fermentación heteroláctica se caracteriza por producir cantidades aproximadamente equimolares de lactato, etanol/acetato, y dióxido de carbono a partir de glucosa por la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa.

Figura 2-3: Rutas metabólicas de fermentación láctica homofermentativa y heterofermentativa (Madigan *et al.*, 2010)



Las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por generar un efecto inhibitorio a otros microorganismos y esta es la base para mantener la calidad y seguridad de gran variedad de productos alimenticios. Los principales factores que contribuyen a esta inhibición son: bajo pH y producción de bacteriocinas, etanol y diacetilo (Adams & Moss, 2000; Beristain-Bauza *et al.* , 2012).

Todos los cultivos con los que inician un proceso fermentativo de características benéficas o deseables, se denominan cultivos iniciadores o starter. Un cultivo iniciador consiste en una especie o combinaciones de especies microbianas que una vez adicionados a una matriz alimentaria, originan un proceso fermentativo determinado con baja producción de metabolitos indeseados, con un resultado final que se manifiesta en el cambio de textura, color y *flavor* del producto final, incrementando su poder de conservación y en ocasiones efectos benéficos para la salud del consumidor (Cabeza, s. f.).

2.3.2 Microorganismos probióticos

Se define como probiótico a todo microorganismo viable que llega al intestino en cantidades suficientes en un estado activo y que ejerce efectos positivos para la salud (Scheper, 2008), comprobados en estudios clínicos *in-vivo* e *in-vitro*, para seres humanos y animales. Por otro lado, se entiende por alimento probiótico a toda matriz alimentaria que contenga microorganismos probióticos en concentración suficiente, de modo que después de su ingestión, se obtenga el efecto deseado (FAO, 2001).

Se ha identificado que la mayoría de microorganismos probióticos pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque se han comprobado propiedades probióticas en otros microorganismos de los géneros *Enterobacter* y *Streptococcus* (Sinha, 2007).

Dependiendo del tipo de microorganismos probióticos suministrado al ser humano, se han atribuido diversidad de beneficios para la salud de forma directa o indirecta a través del sistema inmune dispuesto en el tracto gastrointestinal. La mayoría de cepas probióticas actúan modulando la microfloral intestinal e inhibiendo la colonización de patógenos en el intestino. Se sugiere, sin tener un conocimiento claro, que estos efectos

se deben a una reducción del pH intestinal, producción de sustancias bactericidas, aglutinación de microorganismos patógenos, competencia por sustratos fermentables disponibles, absorción y metabolización de metabolitos y enzimas potencialmente patógenas, tóxicas o cancerígenas y a la producción y liberación de sustancias protectoras (arginina, glutamina, ácidos grasos de cadena corta) entre otros (Scheper, 2008).

2.3.3 Fermentación de polen apícola

El pan de abejas o polen fermentado es polen parcialmente fermentado que las abejas obreras mezclan con sus propias enzimas digestivas y que almacenan en las celdillas del panal agregando una capa de miel como única fuente de carbono (Audisio, Terzolo, & Apella, 2005 citados por Araneda *et al.*, 2014; Herbert & Shimanuki, 1978). En el almacenamiento del polen en las celdillas, la abeja empuja el polen con su cabeza con el fin de aumentar su almacenamiento 2,5 veces más que si lo almacenara sin apretar (Connor & Muir, 2013). La capa de miel impide el ingreso de aire y evita pérdidas por oxidación y fermentaciones aeróbicas putrefactivas indeseadas al interior de la colmena (Elizalde, Hargreaves, & Wernik, 1996 citados por Araneda *et al.*, 2014).

Entre las enzimas digestivas involucradas en el proceso se han identificado esterasas, lipasas, proteasas, aminopeptidasas y fosfatasas que hacen al pan de abejas más digerible (Gilliam, Roubik, & Lorenz, 1990).

Chevtchik llevó a cabo análisis microbiológicos del polen almacenado en la colmena y encontró cuatro fases de desarrollo microbiano en el proceso fermentativo de polen que ocurre en un periodo de 7 días. La primera fase con una duración de 12 horas se caracteriza por el desarrollo de un grupo heterogéneo de microorganismos incluyendo levaduras. En la segunda fase, bacterias ácido-lácticas anaeróbicas (*Streptococcus*) utilizan los factores de crecimiento producidos por las levaduras y bacterias de putrefacción y generan un descenso en el pH del polen. La tercera fase se caracteriza por la desaparición del *Streptococcus* y el desarrollo de *Lactobacillus* que producen más ácido que el *Streptococcus*. La cuarta fase, que inicia al finalizar el séptimo día, se caracteriza por la desaparición de las bacterias ácido-lácticas y ciertas levaduras dado a

las grandes cantidades de ácido láctico producido. El polen llega a ser microbiológicamente estéril con un pH cercano a 4 (Chevtchik, 1950 citado por Collison, 2014; Gilliam, 1979b).

La serie de cambios químicos y bioquímicos llevados a cabo aumentan la digestibilidad y el valor nutricional del polen (Herbert, 1992 citado Collison, 2014) aunque cabe destacar que dicho valor nutricional se ve mermado cuando se almacena por largos periodos de tiempo (Connor & Muir, 2013). Se sugiere que estos cambios en la composición nutricional son el resultado de la actividad metabólica de la microflora que está presente en el polen almacenado (Gilliam, 1979a; Herbert & Shimanuki, 1978; Vásquez & Olofsson, 2009). Otro fenómeno observado está relacionado con la absorción, por parte de los granos de polen que luego estallan por choque osmótico, de los azucares y el agua presentes en la miel que la abeja deposita al momento de almacenar el polen, lo que libera el citoplasma interno de las células de polen haciendo digeribles los aminoácidos y antioxidantes contenidos en él (Dustmann, 2007 citado por Araneda *et al.*, 2014).

En cuanto a los microorganismos involucrados, se han identificado 11 géneros de BAL del género *Bacillus* que podrían predigerir el polen y producir ácido láctico, generando un efecto antimicrobiano sobre la población microbiana nativa (Gilliam, 1979a). Igualmente se han identificado 110 cepas de levaduras pertenecientes a 7 géneros, provenientes del tracto digestivo y de las fuentes florales visitadas por las abejas. Las cepas identificadas fermentan principalmente glucosa y sacarosa (Gilliam, 1979b). Recientemente se identificaron 66 nuevas cepas de bacterias presentes en *Apis mellifera* y sus larvas, denominadas bacterias ácido-lácticas fructofílicas cuya fuente de carbono preferida es la fructosa (Endo & Salminen, 2013).

Diversos autores han tratado de replicar este proceso fermentativo en condiciones de laboratorio y a escala piloto, inoculando diversos microorganismos y condiciones de proceso como se resume en la Tabla 2-6.

Tabla 2-6: Estado del arte en fermentación de polen apícola a escala laboratorio.

Microorganismo utilizado	Tiempo de fermentación (hr)	Temperatura (°C)	Formulación	Referencia
L. plantarum *L. acidophilus*	72	37	Miel, polen en pellets / molido	(Vamaru *et al.*, 2008).
L. acidophilus, *L. paracasei*	72	35	Agua:polen 1:1	(Fuenmayor *et al.*, 2011; Fuenmayor, 2009)
L. plantarum *L. acidophilus*	72	37	Agua:polen 1:1 con adición de miel y fosfato diamónico	(Zuluaga, Quicazán, & Serrato, 2014).
L. plantarum *L. coryniformis* *L. delbrueckii* *L. plantarum* *L. casei* *L. acidophilus*	360	35	Ensilado de polen /miel	(Del Risco-Ríos *et al.*, 2012).
L. plantarum *S. cerevisiae*	72	35	Agua:polen 2:1	(Salazar-González & Díaz-Moreno, 2016)

2.4 Bebidas lácteas fermentadas

Se entiende por bebida láctea fermentada al producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en su composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (precipitación isoeléctrica). Estos cultivos de microorganismos serán viables, activos y abundantes en el producto hasta la fecha de vida útil (no aplica si el producto es tratado térmicamente luego de la fermentación) (FAO, 2003).

Ciertas leches fermentadas se caracterizan por un cultivo específico (o cultivos específicos) utilizado en la fermentación, aunque esto no implique que se puedan

emplear otros microrganismos en el proceso. Para la industria láctea, dichos cultivos pueden ser utilizados en forma líquida, deshidratada (liofilizada) o deshidratada (Universidad Tecnológica de Bolívar, 2005):

2.4.1 Yogur

Se entiende por yogur el producto lácteo pasteurizado obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* a partir de leche entera, semidescremada o descremada fortificada o no con sólidos de leche. Pueden contener compuestos prebióticos (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2006) al igual que bacterias vivas benéficas, que al ser ingeridas favorecen la protección de la microflora intestinal (cultivos probióticos) como *L. casei, L. acidophilus, Bifidobacterium spp.,* etc. (ICONTEC, 2005). Se utiliza leche de cabra, de oveja o de yegua, aunque el más extendido es el fabricado con leche de vaca.

A nivel industrial, se procede a la fermentación de la leche mediante la inoculación con el cultivo bacteriano y posterior incubación de la leche alrededor de 42 a 45ºC. En función del tipo de yogur elaborado, la incubación se puede realizar en el mismo envase en el que se comercializa el yogur (yogur firme) o en tanques para su envasado posterior (yogur batido o bebible) hasta lograr la coagulación de la caseína por un descenso en el pH del medio y la producción de metabolitos secundarios que afectan positivamente al sabor y al aroma del producto. Entre ellos, acetaldehído, acetona, etanol, butanona, diacetilo, 2-pentanona y diversos ácidos orgánicos (Condony Salcedo, Mariné Font, & Rafecas Martínez, 1988). La fermentación se detiene mediante refrigeración.

2.4.2 Kumis

El kumis, producto de origen ruso utilizado en gran medida en ese país con fines terapéuticos se produce con una fermentación ácida y alcohólica combinada, tradicionalmente a partir de leche de yegua aunque también se utiliza leche de vaca. La fermentación se lleva a cabo con una combinación de *L. delbrueckii subsp bulgaricus* y levaduras que fermentan la lactosa. El producto final contiene 1,0-1,8% de ácido láctico, 1,0-2,5% de etanol y dióxido de carbono. Este último hace del kumis tradicional un producto espumoso (Fernandes, 2009; Marth & Steele, 2001).

De la normatividad colombiana cabe destacar que se define este producto como el producto fermentado por la acción de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, los cuales deben ser viables, abundantes y activos en el producto hasta el final de su vida útil (ICONTEC, 2005) a partir de leche bovina (Ministerio de salud, 1986).

En la actualidad los cultivos comerciales para la producción del kumis permiten incubar a temperatura de 22 – 26ºC durante 6 a 8 horas. Su proceso productivo es el mismo que se da en la elaboración del yogur con la variación del tipo de cultivo, temperatura y tiempo de incubación. A este producto no se le adicionan preparados de fruta, colorantes ni esencias sino que su distribución es de forma natural. Una vez alcanzado el pH correspondiente al punto isoeléctrico de la caseína (cercano a 4,6), se agita nuevamente para incorporar aire, se enfría y se almacena a 4ºC (Almanza & Barrera, 1991).

2.4.3 Parámetros de calidad

Los productos lácteos fermentados a desarrollar (yogur y kumis) deben cumplir con los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la Resolución 2310 de 1986 (Ministerio de salud, 1986) y en la NTC 805 (ICONTEC, 2005). El yogur, el kumis o cualquier bebida láctea que reporte contenido probiótico deben cumplir con los requisitos fisicoquímicos resumidos en la Tabla 2-7. A nivel microbiológico, la normatividad establece los requisitos presentados en la Tabla 2-8.

Tabla 2-7: Requisitos fisicoquímicos en yogur, kumis o bebidas lácteas probióticas.

Requisitos	**Entera**		**Parcialmente descremada**		**Descremada**	
	Mínimo	**Máximo**	**Mínimo**	**Máximo**	**Mínimo**	**Máximo**
Materia grasa % m/m	2,5	-	> 0,5	<2,5	-	0,5
Proteína láctea % m/m	2,6	-	2,6	-	2,6	-
Acidez titulable expresada como ácido láctico % m/m	0,6	-	0,6	-	0,6	-
Fosfatasa	Negativa		Negativa		Negativa	

Adaptado (ICONTEC, 2005).

Tabla 2-8: Requisitos microbiológicos en leches fermentadas.

Requisitos	N	m	M	C
Recuento de Coliformes, UFC/g (30°C)	3	10	100	1
Recuento de Coliformes, UFC/g (45°C)	3	0	---	0
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	3	200	500	1

Donde: N: Número de muestras a examinar, m: Índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, M: índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad, c: Número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M. Fuente: (ICONTEC, 2005).

Para el caso específico del yogur y del kumis, se debe cumplir con un contenido mínimo del cultivo del microorganismo específico utilizado en su producción de 10^7 UFC / g y un recuento de bacterias lácticas probióticas (opcional) de 10^6 UFC / g al final de la vida útil del producto.

2.5 Estimación de la vida útil de los alimentos

Se define la vida útil como el tiempo durante el cual un producto alimenticio conserva una calidad satisfactoria, conservando características físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales deseables que cumplen con cualquier declaración nutricional relacionada en la etiqueta cuando se almacena bajos las condiciones recomendadas (Kilcast & Subramaniam, 2000).

Muchos factores pueden influenciar la vida útil de un alimento. Estos factores pueden ser clasificados como intrínsecos o extrínsecos. Los factores intrínsecos están relacionados al tipo y calidad de materias primas utilizadas y a la formulación / composición del producto. Los factores extrínsecos son aquellos que están relacionados al manejo y condiciones de procesamiento y conservación del producto a través de la cadena productiva (Kilcast & Subramaniam, 2000).

Dentro de los factores intrínsecos se tiene la actividad de agua (Aw), el pH y la acidez, el oxígeno disponible, los nutrientes, la composición microbiológica, la composición bioquímica (enzimas, lípidos, etc.), el uso de aditivos y preservativos entre otros. En cuestión de factores extrínsecos, cabe destacar el perfil de tiempo-temperatura durante el procesamiento del alimento, el control de temperatura y humedad relativa durante su procesamiento, almacenamiento y distribución, las condiciones microbiológicas del

ambiente durante el procesamiento, almacenamiento y distribución, el tipo y material del envase utilizado, el manejo dado por el consumidor entre otros. La interacción entre factores intrínsecos y extrínsecos puede estimular o inhibir numerosos procesos que pueden limitar la vida útil del producto alimento, ya sea a nivel microbiológico, químico, físico o sensorial (Kilcast & Subramaniam, 2000).

El deterioro de los alimentos se produce por diversos cambios, principalmente en respuesta a la destrucción, inactivación o crecimiento y metabolismo de microorganismos (benignos y patógenos), la exposición, la cantidad y tipo de luz que recibe el producto, el desarrollo de rancidez por oxidación lipídica en alimentos con un contenido importante de grasa, pardeamiento enzimático y no enzimático (reacciones de Maillard) en frutas y verduras, pérdida de vitaminas, perdida o ganancia de humedad, cambios de acidez en función del tiempo, etc. (Kilcast & Subramaniam, 2000; López, Braña, & Hernández, 2013; Sousa & Mahajan, 2011).

A continuación se recopilan una serie de metodologías desarrolladas para la determinación del tiempo de vida útil bajo condiciones controladas, las cuales incluyen el desarrollo de modelos matemáticos basados en cinéticas de deterioro fisicoquímico, microbiológico o sensorial. El desarrollo de estudios bajo condiciones aceleradas son una alternativa, que permiten realizar estimaciones del tiempo de vida útil bajo condiciones menos severas (Charm, 2007 citado por Restrepo & Montoya, 2010).

2.5.1 Predicción de deterioro fisicoquímico

Muchos de los problemas de deterioro relacionados con los alimentos se deben a cambios químicos, bioquímicos y/o físicos, tales como la oxidación, el pardeamiento enzimático y no enzimático, y la pérdida o ganancia de humedad. Este tipo de reacciones se encuentran fuertemente afectadas por condiciones medioambientales tales como disponibilidad de oxígeno, temperatura, humedad relativa así como por la composición intrínseca del alimento (Kong & Singh, 2011).

Es así que la predicción cuantitativa del deterioro químico o de la inestabilidad física resulta crítica para la estimación de la vida útil de productos alimenticios, así como para

el desarrollo de nuevos procesos o cambios en la línea de producción de una ya existente. Para tal fin, se han planteado numerosos modelos matemáticos, de los cuales el modelamiento cinético es uno de los más comúnmente utilizados. El modelado cinético descrito a continuación ha sido empleado para la caracterización de crecimientos microbianos, cambios en la textura y el color, así como reacciones químicas y bioquímicas que se desarrollan en el procesamiento y almacenamiento de alimentos.

La ecuación básica de este método involucra la constante de velocidad y el orden de la reacción de deterioro que se desea modelar. Se define la tasa de reacción (o cambio en el factor de calidad estudiado) como el cambio en la concentración de un reactivo (o factor de calidad) (C) en función del tiempo (t) como:

$$-\frac{dC}{dt} = kC^n \tag{2.1}$$

Donde *k* es la constante de reacción y *n* el orden de la reacción química del factor de calidad de interés. El pardeamiento no enzimático en alimentos generalmente sigue el comportamiento de una reacción de orden cero. La oxidación lipídica, el crecimiento de microorganismos y la pérdida de vitaminas se ajustan a reacciones de primer orden. Las reacciones de segundo orden son relativamente menos comunes (Kong & Singh, 2011; Sousa & Mahajan, 2011).

Se plantea el modelamiento de la cinética de las reacciones de deterioro en el alimento en función de la temperatura, estableciendo la relación entre la constante de reacción *k* y la temperatura a través de la ecuación de Arrhenius (Ec. 2.2).

$$k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}} \tag{2.2}$$

Donde A es una constante denominada factor pre-exponencial, E_a la energía de activación, *R* la constante de los gases y *T* la temperatura absoluta.

En algunos casos el efecto de la temperatura sobre la cinética de las reacciones de deterioro del alimento no sigue el comportamiento modelado por Arrhenius. Estos casos particulares involucran el cambio de fase, la cristalización de carbohidratos amorfos, la

desnaturalización de las proteínas, así como aumento de la actividad de agua (Kong & Singh, 2011).

Una forma alternativa de expresar la dependencia de la temperatura en la cinética de reacción es el término Q_n (Ec. 2.3), definido como el cociente entre las tasas de reacción con una diferencia de *n* °C (Sousa & Mahajan, 2011).

$$Q_n = \frac{k|_{T+n\,°C}}{k|_{T\,°C}} \tag{2.3}$$

Como la velocidad de reacción es inversamente proporcional al tiempo, el tiempo de vida útil se puede estimar de acuerdo a la Ec. 2.4.

$$Q_n = \frac{Tiempo\ de\ vida\ útil\ a\ T\ °C}{Tiempo\ de\ vida\ útil\ a\ T{+}n\ °C} \tag{2.4}$$

En estudios de vida útil llevados a cabo en bebidas lácteas fermentadas tipo yogur se reporta que los principales índices de calidad, representativos del deterioro del producto a lo largo de su tiempo de vida útil, son el deterioro microbiológico por presencia de mohos y levaduras, la acidez producto de la acción continua de las bacterias ácido-lácticas y cambios en sus parámetros organolépticos (Macbean, 2009). Se reporta el seguimiento en la acidez expresada como ácido láctico, el recuento de bacterias ácido-lácticas y de mohos y levaduras como factores de calidad en modelamientos cinéticos a 5, 15 y 25°C (Gualdron & González, 2013; International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2011).

2.5.2 Predicción de deterioro microbiológico

De manera análoga al desarrollo de modelos matemáticos que predicen el deterioro fisicoquímico que pueda sufrir un alimento, se han desarrollado modelos que permiten estimar la vida útil de los alimentos a partir de parámetros microbiológicos en lo que se conoce como microbiología predictiva. Sin embargo, la gran variedad de microorganismos que pueden estar involucrados en la alteración de matrices alimentarias hace que los modelos de predicción tengan una aplicación limitada (Pin & Baranyi, 1998

citado por Cabeza, 2011). Algunos de los modelos utilizados en la estimación de la vida útil a partir del comportamiento microbiano de los alimentos se describen a continuación.

Uno de los modelos utilizados para la estimación de la vida útil microbiológica lo describe la aproximación de Monod-Hinshelwood (Ec. 2.5), en el cual se modela el tiempo necesario para que se desarrolle una alteración en el producto alimenticio a partir del crecimiento de microorganismos alterantes, de la forma:

$$t_s = \frac{\log N_s - \log N_0}{\log 2} * T_g \tag{2.5}$$

Siendo t_s es el tiempo necesario para que se desarrolle la alteración bajo condiciones controladas, N_s (UFC/g) el valor máximo permisible antes de considerarse alterado el producto, N_0 (UFC/g) la población inicial presente en el producto y T_g el tiempo de duplicación de la población alterante específica (E. A. Cabeza, 2011).

Otro enfoque es el modelamiento de la alteración microbiana en productos alimenticios en función de la temperatura, dado que la velocidad de crecimiento específico y la fase de latencia de los microrganismos son altamente dependientes de este parámetro (Giannuzzi, Pinottii, & Zaritzky, 1998 citado por Cabeza, 2011). Por tal motivo, se ha sugerido emplear la ecuación de Arrhenius descrita en la Ec. 2.2, donde la constante de reacción (*k*) es sustituida por la velocidad de crecimiento específico μ.

2.5.3 Predicción de deterioro sensorial

Al trabajar con productos alimenticios, resulta interesante que la gran mayoría de los procesos de deterioro normalmente son percibidos por el consumidor mediante el uso de sus sentidos (vista, olfato, gusto, tacto y oído). Cuando el consumidor rechaza el producto, porque considera que sus características lo hacen inaceptable o porque pone en riesgo su salud, se dice que ha llegado al final de su vida útil sensorial (López *et al.*, 2013).

Con punto de corte, se hace referencia al valor de intensidad sensorial en que un consumidor comienza a percibir un cambio en el producto en comparación con la muestra fresca (Hough, 2010).

El primer paso consiste en definir un factor de calidad sensorial sobre el cual se estimará el tiempo de vida útil. Dicho factor de calidad será establecido por un grupo de evaluadores con algún tipo de entrenamiento sensorial en el producto de interés, el cual evaluará muestras sometidas a diferentes tiempos de almacenamiento. Posteriormente las mismas muestras serán evaluadas por un panel de consumidores con el cual se evalúa la aceptabilidad de las mismas muestras haciendo uso de una escala hedónica. Para determinar el punto de corte se hace uso de la expresión:

$$S = F - Z_{\alpha}\sqrt{\frac{2*CME}{n}} \tag{2.7}$$

Donde S es el valor en que la aceptabilidad del producto almacenado comienza a disminuir significativamente, F es la aceptabilidad de la muestra fresca (promedio del panel de consumidores), Z_{α} es la coordenada de la distribución normal de una cola con un nivel de significancia α, CME el Cuadrado Medio del Error obtenido del análisis de varianza del panel de consumidores empleando como fuentes de variación fija la muestra y fuente de variación aleatoria el consumidor y *n* el número de consumidores.

Tras determinar el valor de S, se determina el valor correspondiente en la escala de intensidad del panel entrenado y con esta se lee el tiempo de almacenamiento al cual se considera como tiempo de vida útil.

2.5.4 Estudios en condiciones aceleradas

La determinación de la vida útil en condiciones aceleradas hace referencia a cualquier método que permita evaluar la estabilidad del producto en condiciones de almacenamiento extremas que aceleren el deterioro del alimento, obteniendo una estimación de la vida útil en un tiempo más corto que puede ser modelada y a partir de la cual se puede inferir el tiempo de vida útil del producto almacenado en condiciones normales (Mizrahi, 2011).

Para el caso de bebidas lácteas fermentadas tipo yogur se reportan estudios de vida útil donde se trabaja con temperaturas de 5, 15 y 25 °C como factor acelerante; la estimación de la vida útil (alrededor de 30 días en condiciones normales) se obtiene del

modelamiento predictivo del deterioro sensorial (Al-Kadamany *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2010; Giménez, Ares, & Ares, 2012).

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales e insumos

3.1.1 Polen apícola

Se empleó polen apícola seco proveniente del altiplano Cundiboyacensence suministrado por *Apiarios Los Cerezos* (Viracachá, Boyacá). El producto recién recolectado fue deshidratado en secador solar a una temperatura promedio de 50ºC hasta alcanzar un contenido de humedad inferior al 6%. El polen seco fue seleccionado en una serie de tamices Mesh 12 y 16 y posteriormente alimentado a un ciclón para eliminación de impurezas macroscópicas ajenas al producto.

El polen limpio y seco fue almacenado por un periodo inferior a los dos meses en bolsas de poliestireno hasta el momento de su uso en lugar fresco y seco. En los procesos fermentativos la matriz fue molida durante 2 minutos utilizando un molino comercial de especias.

3.1.2 Leche

Se empleó leche entera de vaca UHT Colanta en la preparación de yogur y kumis base. Para efectos del presente desarrollo, se puede emplear cualquier tipo de leche entera UHT que cumpla con los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos de la NTC 3856 (ICONTEC, 2004a) y del decreto 616 de 2006 (Ministerio de la Protección Social, 2012).

3.1.3 Azúcar

Se empleó azúcar refinada (sacarosa 99,5% min.) que cumple con los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la NTC 611 (ICONTEC, 2004b).

3.1.4 Agua potable.

Se empleó agua potable en la preparación del medio fermentativo, la cual cumple con los requisitos físicos, químicos y microbiológicos establecidos en la Resolución 2115 de 2007 (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007)

3.1.5 Cultivos lácticos.

En los procesos fermentativos de polen apícola se emplearon tres cultivos mixtos empleados a nivel industrial, comercializados por Danisco (Danisco, Dinamarca) para la producción de bebidas lácteas fermentadas por inoculación directa: CHOOZIT MY800 LYO, CHOOZIT MA4001 y HOWARU™ Dophilus. En los procesos fermentativos de leche para la elaboración de yogur y kumis se empleó CHOOZIT MY800 LYO y CHOOZIT MA 4001 LYO, respectivamente. Cabe destacar que los cultivos seleccionados han demostrado excelentes resultados en la fermentación de matrices vegetales complejas como soya y polen (Alarcón & Quicazán, 2016; A. Benavides, 2009; R. Benavides, 2016; Carlos Zuluaga, 2016)

Los cultivos fueron conservados en congelación (-20ºC) hasta el momento de su uso. Las fichas técnicas de estos se presentan en el Anexo A.

3.2 Metodologías analíticas

3.2.1 Determinación de impurezas macroscópicas en polen

Se empleó el método de flotación en fracción oleosa aprobado por la AACC con algunas modificaciones (Nielsen, 2010). 20 g de polen seco son adicionados a 990 mL de agua destilada y se mezclan hasta lograr disolución de los granos; a la mezcla obtenida se le agregan 10 mL de aceite mineral y tras permitir una separación definida de las fases acuosa y oleosa, se filtra por separado cada fracción sobre papel Nº1 (Whatman, Reino Unido). Se realiza cuantificación y cualificación del material retenido en la filtración de cada fase mediante observación y conteo manual en estereoscopio Nikon SMZ745 (Japón).

3.2.2 Determinación de pH y acidez titulable

La determinación de pH y acidez titulable se realizó por el método potenciométrico siguiendo los lineamientos dados en la AOAC 937.05 (Association of Official Analytical Chemists, 2002) con las siguientes modificaciones. Se pesaron 5 g de muestra, se adicionó 30 mL de agua destilada y se agitó a 300 rpm durante 2 minutos. La titulación se llevó a cabo con hidróxido de sodio 0,5 N utilizando un titulador automático Mettler Toledo T70. Los resultados se expresaron como porcentaje equivalente de ácido láctico.

3.2.3 Microscopía óptica con tinción de fucsina.

Se realizó tinción del polen apícola de acuerdo al método desarrollado por Maurizio (Maurizio, 1975) con las siguientes modificaciones. Se disgregó la muestra con ayuda de una asa microbiológica sobre un portaobjetos utilizando etanol al 70%. El portaobjetos fue flameado tres veces y se dejó secar. Posteriormente se recubre el portaobjetos con glicerogel con fucsina. El portaobjetos se dejó reposar durante 24 horas y se lee al microscopio.

La microscopía óptica se realizó con un objetivo 100X en microscopio Nikon ECLIPSE E200 LED MV SERIES (Japón), tomando 20 fotografías por muestra con el software Optika Visio Pro V. Las imágenes publicadas en el documento reflejan la moda de cada una de las muestras evaluadas.

3.2.4 Capacidad de retención de agua

La sinéresis, expresada como el porcentaje másico de suero desprendido por unidad de masa de bebida láctea fermentada fue determinada siguiendo la metodología planteada por (Kessler, 1998). Se reportan los resultados de acuerdo a la Ec. 3.1

$$\%\, sineresis = \frac{masa_{suero}}{masa_{muestra}} * 100 \qquad (3.1)$$

3.2.5 Determinación de carbohidratos

Se determinó el contenido de carbohidratos simples en las bebidas lácteas desarrolladas por cromatografía líquida de alta eficiencia siguiendo la metodología descrita en la AOAC 979.23 (Horwitz, 2002) con algunas modificaciones.

Se pesó 2 g de producto en tubo de fondo cónico Falcón® de 50 mL y se le adicionó 8 mL de acetonitrilo grado HPLC seguido de 2 mL de agua desionizada previamente filtrada con membrana de poliamida de 0,45 µm (Sortolon). La mezcla se agitó en vórtex a 1500 rpm durante 5 minutos, luego se llevó a centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, USA) a 4500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomó 3 mL del sobrenadante y se filtró en cartucho *HyperSep*™ C18 (Thermo Scientific, USA) y luego por membrana de nylon de 0,22 µm.

Se inyectó 10 µL de la muestra preparada en un sistema HPLC Jasco 2000, haciendo uso de una columna Rezex RCM-Monosaccharide (Phenomenex, USA) acondicionada a 65ºC y se utilizó agua desionizada y desgasificada como fase móvil a flujo constante de 0,6 mL/min. La detección y cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa se realizó con detector de índice de refracción RI-2031 Plus acondicionado a 40ºC.

3.2.6 Determinación de ácidos orgánicos

Se determinó el contenido de ácido láctico y ácido cítrico en las muestras de polen fermentado y en las bebidas lácteas con inclusión de polen siguiendo la metodología descrita en la AOAC 984.14 (Horwitz, 2002) con algunas modificaciones dependiendo de la matriz de análisis.

- **Determinación en polen apícola fermentado**

Se pesó 15 g del producto seco y desengrasado en tubo de fondo cónico Falcon® de 50 mL y se le adicionó 40 mL de agua desionizada previamente filtrada con membrana de poliamida de 0,45 µm (Sortolon). La mezcló se agitó en vórtex a 1500 rpm durante 15 minutos, se llevó a centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, USA) a 5000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se tomó 1 mL del sobrenadante en balón aforado de 25 mL y se llevó a volumen con agua desionizada. Esta solución fue filtrada con un cartucho *HyperSep*™ C18 (Thermo Scientific) y luego por una membrana de nylon de 0,22 µm.

Se inyectó 10 µL de la muestra preparada en un sistema HPLC Jasco 2000, haciendo uso de una columna Rezex ROA-Organic Acid H+ 8% (Phenomenex, USA)

acondicionada a 40ºC en horno CO-2065 Plus y utilizando ácido sulfúrico 0,005 N como fase móvil a un flujo constante de 0,6 mL/min. La detección y cuantificación se realizó con detector UV MD-2018 Plus a 210 nm.

- **Determinación en bebidas lácteas fermentadas**

Estas muestras se analizaron inyectando 10 µL de la muestra preparada en el numeral 3.2.5 bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para la determinación de ácidos orgánicos en polen apícola fermentado.

3.2.7 Determinación de color

Se determinó el color del yogur y kumis con inclusión de polen fermentado por medio de un espectrofotómetro Konica Minolta CM-5 empleando el iluminante D65 y observador de 10º como referencia. Los resultados se reportan en la escala de color CIELab.

3.2.8 Determinación de actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante y del contenido de fenoles totales requiere de la preparación de la muestra cómo se describe a continuación.

- **Extractos etanólicos en muestras de polen**

5 gramos de muestra se sometieron a tres extracciones con etanol asistido por ultrasonido Ultrasonic LC 30H (USA). Cada extracción, realizada con 15 mL de etanol 98% durante 10 minutos, se centrifugó a 9000 rpm y se recolectó el sobrenadante en un balón aforado de 50 mL; al finalizar las extracciones se lleva a aforo. De la solución obtenida se tomaron 5 mL y se llevaron a 10 mL; esta dilución corresponderá al extracto a utilizar en la determinación de la actividad antioxidante.

- **Extractos de bebidas lácteas fermentadas**

En el caso de las bebidas lácteas fermentadas se siguió la metodología propuesta por Shory & Baba con algunas modificaciones (Shori & Baba, 2014). Se tomó 10 g de muestra y se adicionaron 2,5 mL de agua destilada. La mezcla se ajustó a un pH de 4,0 adicionando HCl 1N y se llevó a incubación a 45 °C durante 10 minutos. El precipitado se retiró por centrifugación a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C en centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, USA). El sobrenadante correspondiente a la fase

acuosa se recolectó, se ajustó a pH 7,0 adicionando NaOH 0,5M y se volvió a centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para retirar proteínas y sales precipitadas residuales.

- **Determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP**

La determinación de la actividad antioxidante por el método FRAP se efectuó siguiendo la metodología reportada por Benzie y Strain (Benzie & Strain, 1996) con algunas modificaciones. 450 µL de reactivo de FRAP se mezclan con 735 µL de agua desionizada y 20 µL de extracto. Tras 30 minutos, se realiza la medición espectrofotométrica por triplicado a 593 nm usando un espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-530 (Japón). El valor medio obtenido es interpolado en la curva estándar preparada a partir de Trolox (R^2 = 0,998; Abs=0,72264x + 0,09029) en un intervalo de concentración de 0,025 a 0,981 mM. Los resultados se expresan como mmol Trolox por kilogramo de muestra.

- **Determinación de la actividad antioxidante por el método TEAC**

La determinación de la actividad antioxidante por el método TEAC se efectuó siguiendo la metodología reportada por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. 1000 µL de reactivo ABTS son mezclados con 10 µL de extracto etanólico. Se determinó la absorbancia a 734 nm por triplicado después de 10 min usando un espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-530 (Japón). La medición espectrofotométrica media es interpolada en la curva estándar preparada a partir de Trolox (R^2 = 0,995; Abs=0,56008x + 0,02842) en un intervalo de concentración de 0,05 a 1,47 mM. Se expresan los resultados como mmol Trolox por kilogramo de muestra.

3.2.9 Determinación de contenido de fenoles totales

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteau según metodología descrita por Singleton y colabores (1999) con algunas modificaciones. 500 µL del reactivo de Folin fueron mezclados con 500 µL del extracto preparado en el numeral 3.2.6 y neutralizados con 2 mL de carbonato de sodio al 10 %. La absorbancia se determinó por triplicado a 765 nm luego de 2 horas usando un espectrofotómetro UV-VIS Jasco V-530 (Japón). La absorbancia media es interpolada en

la curva estándar preparada a partir de ácido cafeico (R^2 = 0,995; Abs=0,92246x - 0,09284) en un intervalo de concentración de 0,02 a 1,00 mg/mL. Los resultados se expresan como µg de ácido cafeico por gramo de muestra.

3.2.10 Determinación de mohos y levaduras

La determinación de mohos y levaduras se efectuó a 25,0±1,0°C siguiendo las directrices dadas en investigaciones anteriores (Nguz *et al.*, 2005) inoculando 1 mL de las tres primeras diluciones de la muestra en cajas de Petri estériles con agar OGYE suplementado con antibiótico de oxitetraciclina. Se realizó conteo a los 3 - 5 días cuando el número de colonias en la caja estaban entre 30 y 300 UFC. Se reportan los resultados como UFC/g.

3.2.11 Determinación de coliformes totales y fecales

La determinación de coliformes totales se efectuó a 37,0±1,0 °C de acuerdo a los lineamientos establecidos en la AOAC 989.10 (Association of Official Analytical Chemists, 2002) inoculando 1 mL de las tres primeras diluciones en 3 tubos de caldo Brilla. Se registraron como positivos los tubos que presentan turbidez y producción de gas en la campana de Durham con confirmación mediante repique en caldo Brilla. En caso de no encontrarse presencia de coliformes totales, no se evaluó la presencia de coliformes fecales. Se reportan los resultados como NMP.

3.2.12 Determinación de aerobios mesófilos

La determinación de mesófilos aerobios se efectuó a 37±1,0°C siguiendo las directrices dadas en investigaciones anteriores (Estevinho, Rodrigues, & Pereira, 2012) inoculando 1 mL de las tres primeras diluciones en cajas de Petri estériles con agar SPC. Se reportan los resultados como UFC/g.

3.2.13 Determinación de cultivos lácticos específicos.

La determinación de cultivos lácticos específicos se efectuará por conteo en placa, en capa profunda, en medio MRS de acuerdo a lo establecido en la norma ISO 27205:2010 (ISO, 2010) inoculando 1 mL de las ocho primeras diluciones.

3.2.14 Análisis sensorial hedónico

Los productos desarrollados fueron evaluados en su aceptabilidad por 50 consumidores habituales de bebidas lácteas tipo yogur (por lo menos una vez a la semana), seleccionados de forma aleatoria de la población de Bogotá en una proporción similar de hombres y mujeres en un rango de edades de 18 a 40 años de edad. Se presentó a cada consumidor una muestra representativa del producto (20 mL) en recipiente plástico inodoro provisto de tapa hermética a la temperatura habitual de consumo, codificado con número aleatorio de tres dígitos. Una escala cuantitativa asociada a escala cualitativa de 7 puntos fue utilizada para evaluar la aceptabilidad de los productos. Los valores fueron: (1) me disgusta mucho, (2) me disgusta moderadamente, (3) me disgusta un poco, (4) ni me gusta ni me disgusta, (5) me gusta poco, (6) me gusta moderadamente y (7) me gusta mucho. Se consignó la edad, el género y la aceptabilidad de cada uno de los consumidores.

3.2.15 Análisis sensorial de calidad

Las bebidas lácteas desarrolladas fueron evaluadas por 8 panelistas entrenados (3 mujeres, 5 hombres) con edades comprendidas entre los 23 y 35 años, adscritos al panel sensorial del ICTA. El panel evaluó la calidad del producto determinando la presencia e intensidad de posibles defectos típicos en bebidas lácteas fermentadas de acuerdo a la metodología propuesta por Zamora para la evaluación sensorial de yogur con inclusión de frutas (Zamora, 2007), la cual incluye la evaluación de parámetros visuales (tipicidad de color, homogeneidad), olfativos (calidad e intensidad), gustativos (intensidad, dulzor, acidez) y táctiles (viscosidad, granulosidad) en una escala de 0 a 5. Las muestras fueron codificadas con números aleatorios de tres dígitos y presentadas al panel de forma aleatoria. Se utilizó agua a temperatura ambiente para limpiar el paladar entre muestras. El resultado ponderado de la evaluación de cada muestra se presenta en escala de cero (0) a veinte (20), siendo 0 la menor calificación y 20 la mayor.

En la determinación del tiempo de vida útil sensorial, los panelistas evaluaron los productos cuantificando la acidez en escala no estructurada de 10 cm respecto a los productos frescos (muestra control), siendo el limite izquierdo una acidez igual a la del producto fresco y el limite derecho una acidez excesiva respecto a la del producto fresco.

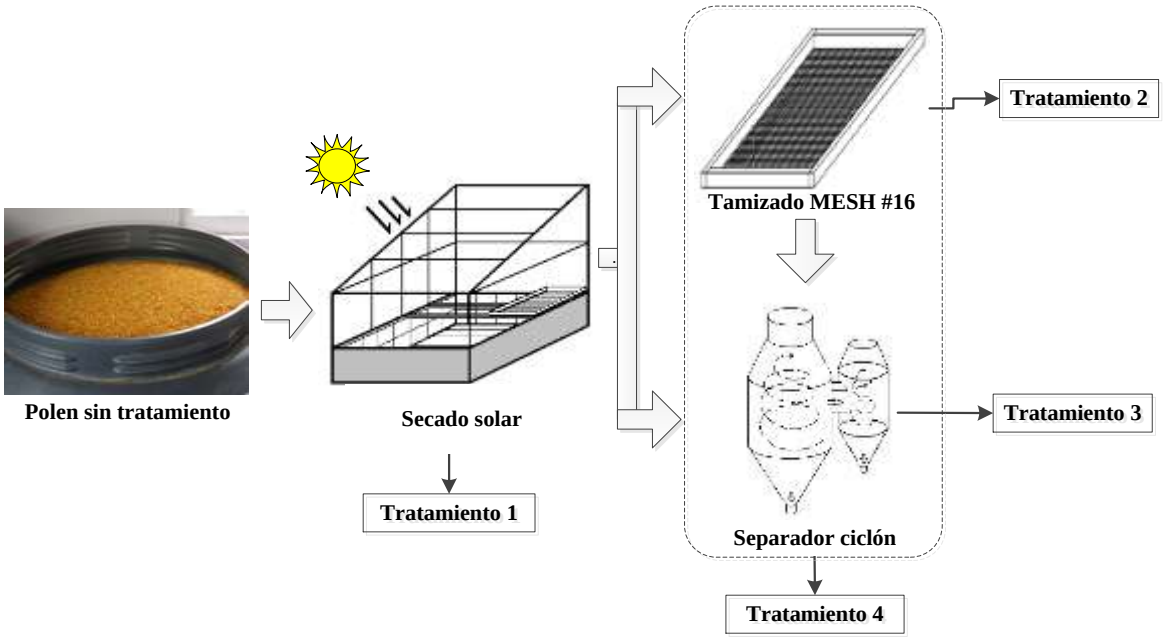
La pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de análisis sensorial del ICTA, que cumple con los lineamientos establecidos en la normatividad internacional (ISO, 2007).

3.3 Estrategia experimental

- **Caracterización de impurezas macroscópicas en polen apícola**

Se determinó y caracterizó el contenido de impurezas macroscópicas de muestras representativas de polen apícola seco en las diferentes etapas de procesamiento del producto de acuerdo al protocolo del proveedor (Figura 3-1). Se analizó el polen seco en deshidratador solar sin ningún tipo de procesamiento adicional (tratamiento 1), el polen seco luego de ser sometido a tamices (tratamiento 2), el polen seco después de ser alimentado a un separador de impurezas tipo ciclón (tratamiento 3) y el polen seco después de pasar por tamices y luego por el separador de impurezas tipo ciclón (tratamiento 4).

Figura 3-1: Esquema de los tratamientos implementados en la adecuación del polen apícola seco.



El tamizado consta de una estructura tipo zaranda con tamices intercambiables MESH #12 (1,70 mm) y #16 (1,18 mm) construidos íntegramente en acero inoxidable AISI 304. En el separador de impurezas el producto es alimentado a un ciclón Lapple de

configuración 2D2D construido íntegramente en acero inoxidable AISI304 con terminado exterior e interior grado alimenticio, acoplado a una tolva de alimentación y un motoaspirador de ½ HP.

Se seleccionó el polen de mayor calidad microbiológica (menores conteos de mohos y levaduras, mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales) y el de menores conteos en impurezas macroscópicas para continuar con la investigación. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con cuantificación manual y registro fotográfico de las impurezas encontradas.

- **Tratamientos de higienización y adecuación de polen apícola**

Para evaluar el efecto de diferentes tratamientos de higienización y adecuación sobre la inocuidad y estructura morfológica del polen apícola, se planteó un diseño factorial 2^3 (Tabla 3-1) evaluando la relación agua:polen (1:1, 2:1), el tiempo de tratamiento térmico en recipiente presurizado a 80 kPa, 115ºC (10 minutos, 20 minutos) y la neutralización del medio con hidróxido de sodio 1 N (sí, no) hasta un pH cercano a 6,0 (pH óptimo reportado para los cultivos lácticos trabajados).

Tabla 3-1: Diseño planteado en la higienización y adecuación de polen apícola.

Relación agua:polen	Neutralización del medio	Duración tratamiento térmico (minutos)
1:1	Sí	10
		20
1:1	No	10
		20
2:1	Sí	10
		20
2:1	No	10
		20

Se inició con la mezcla de agua y polen en una relación 1:1. Para los ensayos realizados con la neutralización del medio, se empleó hidróxido de sodio 1 N hasta un pH cercano a 6,0 y se ajustó la relación final de agua:polen. Posteriormente la mezcla se sometió a

tratamiento térmico durante 10 o 20 minutos contados a partir de alcanzar la presión de trabajo luego de la primera liberación de vapor, seguido de un enfriamiento súbito de la mezcla en baño de hielo.

Para cada tratamiento las variables de respuesta fueron el conteo de mohos y levaduras, mesófilos aerobios y coliformes totales y fecales y su caracterización por microscopia óptica bajo las metodologías descritas previamente. Todos los tratamientos fueron realizados por duplicado.

- **Procesos fermentativos de polen apícola.**

Tras seleccionar el tratamiento térmico más eficiente, el medio acondicionado fue llevado en recipientes de vidrio sin agitación a la temperatura recomendada de cada cultivo; 42,0±0,5°C para CHOOZIT MY800 LYO y HOWARU™ Dophilus y 37,0±0,5°C cuando se trabajaba con el cultivo CHOOZIT MA4001. Por recomendación del proveedor, se realizó la inoculación directa de 0,0160 g de cultivo liofilizado por litro de medio. En todos los procesos se montó un blanco de referencia (sin inoculación de cultivo láctico comercial).

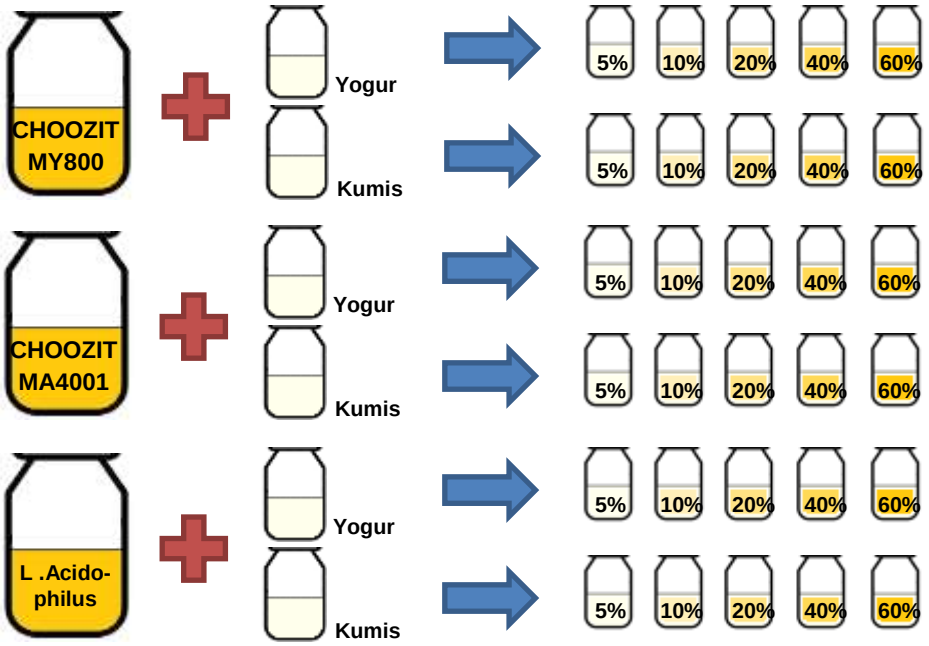
En cada proceso fermentativo evaluado, se realizó seguimiento en el tiempo de pH y acidez titulable (expresada como % de ácido láctico) y se tomaron microscopias del grano tras 45 horas de fermentación bajo las metodologías descritas anteriormente. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Se seleccionó el tratamiento con mejores resultados, mayor aumento de acidez y mayor descenso de pH en menos tiempo, para cada uno de los cultivos evaluados y a estos se les evaluó la productividad del proceso por cuantificación del ácido láctico con HPLC.

- **Preparación bebidas lácteas fermentadas con inclusión de polen fermentado**

Se realizó la inclusión del polen fermentado resultante del mejor tratamiento de adecuación e higienización para cada uno de los tres cultivos comerciales trabajados en yogur y kumis base en porcentajes del 5, 10, 20, 40 y 60 %p/p (30 tratamientos) como se ejemplifica en la Figura 3-2.

Figura 3-2: Diagrama explicativo de inclusión de polen fermentado en bebidas lácteas fermentadas.



Polen fermentado

Para la obtención del yogur y kumis base se estandarizó el contenido de sólidos solubles para un contenido final de 9% y luego se trató térmicamente llevándola a 85°C durante 15 minutos y enfriándola súbitamente a 42°C. La leche acondicionada se inoculó directamente con 0,02 g/L de cultivo CHOOZIT MY800 LYO y de cultivo CHOOZIT MA4001 LYO para producir yogur y kumis, respectivamente. Tras incubación a 42,0±0,5°C durante 5 horas, se rompió el coagulo formado con agitación suave hasta la desaparición de grumos.

Cada una de las inclusiones resultantes fue evaluada por medio de la productividad de ácido láctico, análisis sensorial de calidad, análisis sensorial hedónico y se le evaluó sinéresis como parámetro de estabilidad.

La selección de la mezcla con mayor potencial se realizó mediante técnicas de clasificación multivariable, específicamente a través de un ordenamiento de un conjunto de variables que son transformadas en valores escalares en el intervalo de 0 a 1 y ponderadas en funciones de utilidad (media aritmética) y conveniencia (media

geométrica). Dicha metodología permite la selección de la mejor alternativa entre varios candidatos potenciales en una decisión, sujeto a varios criterios o atributos que pueden ser concretos o imprecisos, donde las alternativas con valores que tienden a 1 en las funciones de utilidad y conveniencia resultan ser las más útiles y convenientes respectivamente (Pavan & Worth, 2008). Para el método de ordenación se ponderó la productividad (30%), el análisis sensorial de calidad (25%) y el análisis sensorial hedónico (30%) con funciones de transformación lineal directa y la sinéresis (15%) con una función de transformación lineal inversa. La suma de ponderaciones de todas las variables fue del 100%. Los análisis fueron realizados empleando el software libre DART V 2.05 (Talete srl, Italia).

Los productos seleccionados fueron caracterizados en parámetros fisicoquímicos (pH, acidez titulable, actividad antioxidante, contenido de fenoles totales, azucares, ácidos orgánicos) y microbiológicos (contenido de mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes totales y fecales, bacterias lácticas especificas).

- **Estimación del tiempo de vida útil**

Para los productos seleccionados y ya caracterizados, se establecieron modelos de vida útil basados en la predicción del deterioro fisicoquímico (pH, acidez titulable), y microbiológico (mohos y levaduras) en condiciones aceleradas. Para tal fin se almacenaron muestras de los productos desarrollados a tres temperaturas: 5, 20 y 35°C. Se determinó el tiempo de vida útil con seguimiento del deterioro sensorial de acuerdo a la metodología de punto de corte para el producto almacenado en refrigeración (5ºC).

Se planteó un diseño experimental básico con 8 muestreos en los tiempos descritos en la Tabla 3-2 por duplicado (dos lotes de cada uno de los productos) para cada una de las temperaturas de almacenamiento mencionadas. El producto fue almacenado en recipientes de poliestireno (PS) con tapa hermética y su análisis se realizó en un tiempo no mayor a 3 días.

Tabla 3-2: Muestreo de productos planteado en el estudio de vida útil.

	5°C	*20°C*	*35°C*
Muestreo	**Tiempo (días)**	**Tiempo (días)**	**Tiempo (días)**
1	0	0	0
2	7	3	1
3	14	7	1,5
4	21	10	2
5	27	13	2,5
6	33	15	3
7	38	16	3,5
8	42	20	4

3.4 Análisis estadístico

Todas las técnicas analíticas fueron evaluadas por triplicado. Se emplearon Análisis de Varianza (ANOVA) para establecer la existencia de diferencias significativas a través de pruebas de Tukey o Kruskal-Wallis, dependiendo si se satisfacían o no las suposiciones de distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) y homocedasticidad (prueba de Levene) respectivamente, con un nivel de significancia de 0,05 ($p<0,05$).

4. Resultados y discusión

4.1 Determinación de parámetros de calidad e inocuidad en polen apícola seco

En esta primera etapa experimental se buscó caracterizar el polen apícola a utilizar como materia prima en los procesos de fermentación láctica. Se descubrió la necesidad de implementar procesos de limpieza e inocuidad adicionales a los empleados por el proveedor para cumplir con los requisitos microbiológicos expuestos en la Tabla 2-5.

Aunque en trabajos anteriores se había determinado la calidad del polen suministrado por *Apiarios los Cerezos*, en esta investigación se revaluó la calidad de esta materia prima en cada una de las etapas de procesamiento tras la implementación de las BPA y las BPM sugeridas en la trabajo de maestría en ciencia y tecnología de alimentos desarrollado por el ingeniero Andrés Durán Jiménez (Durán, 2014). En dicho trabajo, el autor realizó una evaluación de las prácticas implementadas tradicionalmente para el beneficio del producto y su impacto sobre las características físicas, químicas y microbiológicas del mismo. En una segunda fase se implementaron modificaciones sobre los sistemas y se evaluó la influencia de estas sobre las características seleccionadas como indicadores de calidad del producto. Finalmente se diseñó e implementó el sistema de secado y limpieza para polen apícola evaluado en el presente trabajo.

Se evaluó la calidad microbiológica del polen seco sin ninguna limpieza, del polen seco después de tamices, del polen seco después de ciclón y del polen seco tratado con ambas técnicas bajo el sistema de beneficio actual (Tabla 4-1). En ninguno de los parámetros microbiológicos analizados se observa diferencia significativa entre el polen sin limpieza y las diferentes etapas de limpieza pero cabe destacar que tras la limpieza en tamices se genera una contaminación reflejada en un aumento significativo de mesófilos aerobios; se propone mejorar las prácticas de limpieza y desinfección en las

etapas de tamizado del producto, donde podría estar ocurriendo contaminación cruzada reflejada en un aumento de estos microorganismos. Respecto a la normatividad establecida en México (Ramos, 2008), se cumple con el conteo de mesófilos (<10.000 UFC/g) mientras que el contenido de mohos y levaduras se encuentran por encima del límite permitido (>300 UFC/g).

Tabla 4-1: Índices de calidad microbiológica del polen apícola seco de *Apiarios Los Cerezos* en las diferentes etapas de procesamiento.

Tratamiento	Mesófilos aerobios (UFC / g)	Coliformes totales (NMP/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)
Normatividad	**10000**	**-**	**300**
Sin limpieza	1400 ± 1058 [ab]	< 3	833 ± 306 [a]
Solo tamiz	6383 ± 1654 [b]	< 3	767 ± 252 [a]
Solo ciclón	667 ± 404 [a]	< 3	450 ± 312 [a]
Tamiz + ciclón	2933 ± 814 [ab]	< 3	567 ± 321 [a]
Valor-p	0,0323	-	0,4209

Promedios en la misma columna con la misma letra (superíndice) indican que no existen diferencias significativas mediante prueba de Tukey, α=0,05. $X \pm DS$, n=3

Se destacan los efectos positivos tras las modificaciones propuestas por Durán en el sistema productivo de *Apiarios Los Cerezos*, ya que en su trabajo se reportaban conteos de coliformes totales superiores a 20 NMP/g y de mohos y levaduras superiores a 1100 UFC/g. La disminución en las cargas microbiológicas, en especial de los de coliformes, reflejan la adopción por parte del apicultor de buenas prácticas de higiene en la recolección del producto fresco y en su manipulación tras ser sometido al sistema de beneficio. Sin embargo, a pesar de encontrar una mejora en la calidad resulta indispensable aplicar tratamientos de higienización que mejoren la calidad del polen en cuanto a la carga de mohos y levaduras, situación que se propicia en esta matriz vegetal de alta valor nutricional al estar expuesta al medio ambiente donde habitan estos microorganismos.

De manera paralela se cuantificaron y registraron las impurezas macroscópicas en el polen en las mismas etapas de procesamiento (Tabla 4-2) con un respaldo fotográfico de cada una de las impurezas lipofílicas encontradas (Figura 4-1). Se destaca que de forma

descriptiva, la remoción de impurezas con una densidad y tamaño similar o superior a la del grano de polen, como las resinas y tórax, fue más eficiente al utilizar tamices como alternativa de limpieza mientras que las impurezas de baja densidad (alas, antenas e insectos) fueron removidas en mayor proporción al utilizar el ciclón como alternativa de limpieza, aunque estadísticamente no hay reducción significativa entre los cuatro tratamientos de adecuación evaluadas; solo para el parámetro alas y antenas se logra una reducción significativa con cualquiera de las alternativas implementadas respecto al polen sin limpieza.

Tabla 4-2: Cuantificación de impurezas macroscópicas del polen en las diferentes etapas de procesamiento.

Tratamiento	Resinas *	Alas y antenas*	Patas**	Tórax**	Material sintético*	Insectos **	Material vegetal**
Sin limpieza	46±21[a]	115±24[b]	10±10[a]	1 ± 1[a]	3 ± 1[a]	43±14[a]	1±1[a]
Solo tamiz	18±8[a]	28±12[a]	5±4[a]	2 ± 1[a]	4 ± 3[a]	25±25[a]	4±3[a]
Solo ciclón	35±18[a]	27±18[a]	5±3[a]	5 ± 5[a]	11 ± 6[a]	13±6[a]	2±1[a]
Tamiz + ciclón	27±8[a]	54±18[a]	1±1[a]	0[a]	3 ± 3[a]	9±2[a]	2±1[a]
Valor-p	0,2013	0,0211	0,1512	0,1051	0,0890	0,1571	0,1975

Promedios en la misma columna con la misma letra (superíndice) indican que no existe diferencias significativas mediante *prueba de Tukey, ** prueba de Kruskal-wallis, α=0,05. $X \pm DS$, n=3

Figura 4-1: Impurezas macroscópicas lipofílicas encontradas en polen apícola

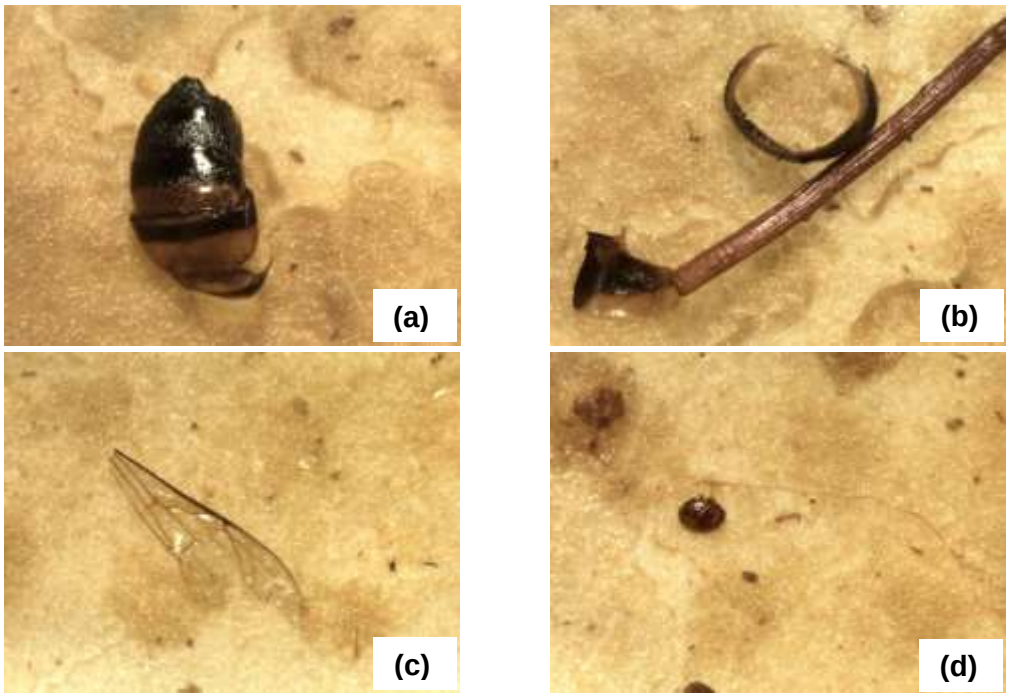
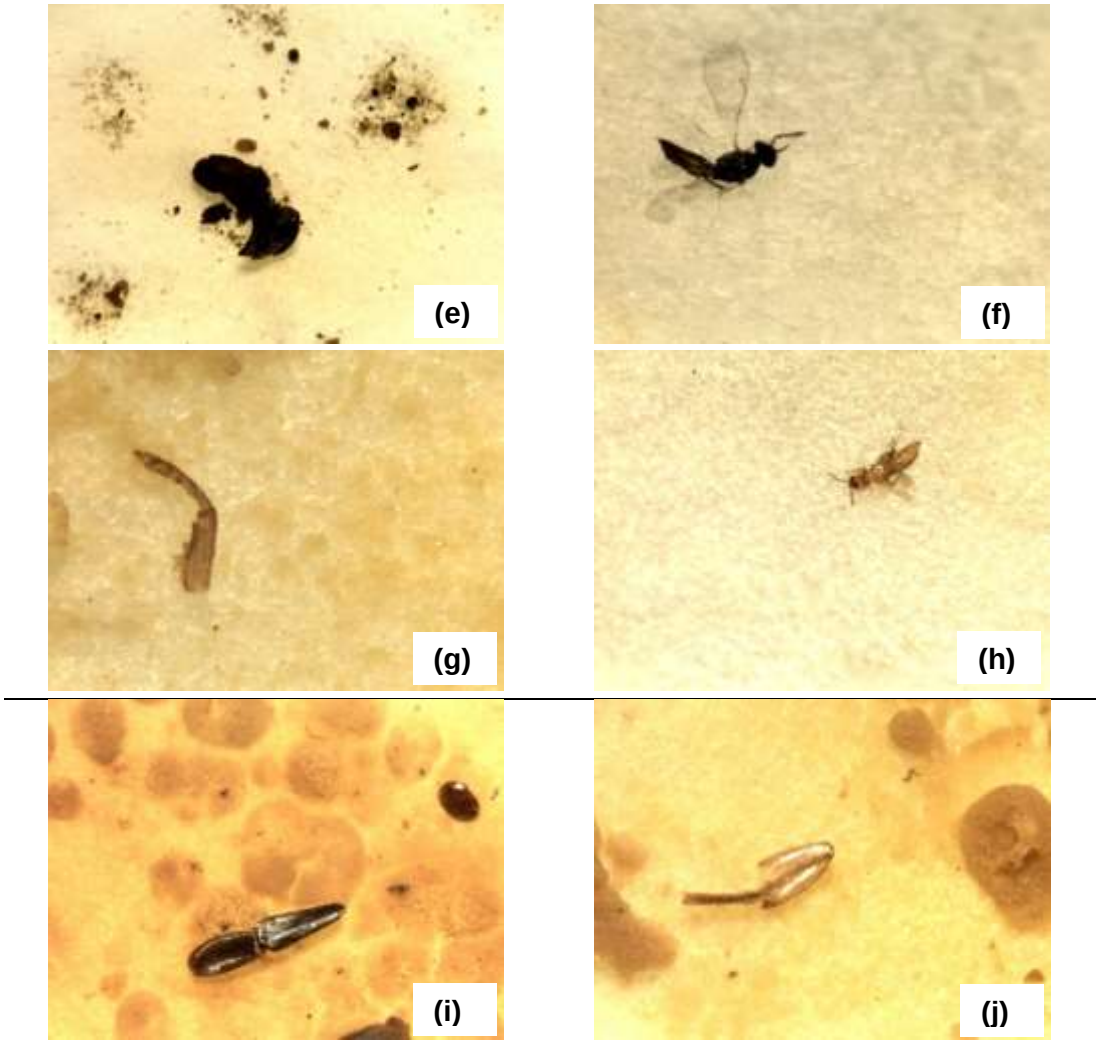


Figura 4-1: (Continuación)



(a) tórax de abeja, (b) material vegetal, (c) ala de abeja, (d) *Varroa destructor*, (e) material resinoso, (f) insecto, (g) pata de abeja, (h) *Thysanoptera*, (i) Aguijón y *Varroa destructor*, (j) semilla.

La caracterización de impurezas macroscópicas inorgánicas sedimentables (Tabla 4-3) muestra que los tratamientos que involucran tamices resulta ser los más efectivos en la eliminación de material conformado principalmente por partículas minerales de una longitud característica menor al de los granos de polen pero de una densidad superior que dificultan su remoción por el separador de impurezas tipo ciclón.

Tabla 4-3: Cuantificación de impurezas macroscópicas sedimentables del polen en las diferentes etapas de procesamiento.

Tratamiento	g material sedimentable / 100 g polen
Sin limpieza	0,27 ± 0,03 [c]
Solo tamiz	0,15 ± 0,05 [ab]
Solo ciclón	0,23 ± 0,03 [bc]
Tamiz + ciclón	0,08 ± 0,03 [a]
Valor-p	0,0009

Promedios en la misma columna con la misma letra (superíndice) indican que no existe diferencias significativas mediante prueba de Tukey, α=0,05. $X \pm DS$, n=3

La presencia de impurezas macroscópicas (ramas, partes vegetales, insectos, fibras sintéticas) denotan un polen mal procesado/cosechado que debe rechazarse en primera instancia. Las impurezas que puede contener el polen constituyen un porcentaje variable, encontrándose desde alas de abejas, tierra, larvas muertas, hasta insectos. Este porcentaje se puede ver aumentado con las manipulaciones inadecuadas, lo que acelera el deterioro porque permite un aumento de la humedad, y facilita la contaminación (Baldi Coronel *et al.*, 2004). Por tal motivo y dada la falta de normatividad relacionada, se presenta una primera propuesta de directriz para la evaluación de la calidad del polen apícola a partir del contenido de impurezas macroscópicas (Tabla 4-4), tomando como criterio lo exigido en la normatividad canadiense para granos y cereales (Pietrzak, 2009).

Tabla 4-4: Parámetros del plan de muestreo de aceptación en lote de polen apícola con muestreos aleatorio de 20 g.

Defectos	n	c	m	M
Fragmentos de insectos	3	1	50	100
Insectos completos muertos	3	1	4	8
Insectos vivos (abejas, polillas, gusanos)	3	1	0	1
Resinas y material vegetal extraño	3	2	20	50
Residuos sintéticos	3	2	5	10

Donde n: Número de muestras a examinar; c: Número máximo de muestras deficientes permisibles por lote; m: Índice máximo de contaminación permisible por muestra; M: Índice máximo de contaminación por muestra que determina rechazo del lote.

Los resultados obtenidos sugieren continuar la investigación con polen seco que ha sido tratado únicamente por el separador de impurezas tipo ciclón dado que es el mayor calidad microbiológica, aunque se pone en evidencia la necesidad de implementar tratamientos de higienización que reduzcan la carga de mohos y levaduras. Adicionalmente se evidencia la necesidad de mejorar las prácticas de limpieza y desinfección de los implementos involucrados en el tamizado para prevenir el aumento mesófilos aerobios y así en un futuro utilizar el polen que ha sido tratado por la combinación de tamices y ciclón, alternativa que ofrece un menor número de impurezas macroscópicas sedimentables en el polen.

4.2 Tratamientos de adecuación de polen apícola como insumo en proceso fermentativo

Se efectuaron los tratamientos de higienización y adecuación planteados en la Tabla 3-1 evaluando la relación agua:polen (1:1, 2:1), la duración del tratamiento térmico (10 minutos, 20 minutos) y la neutralización del medio con hidróxido de sodio 1 N hasta un pH cercano a 6,0 (sí, no). Dado que con cualquiera de los 8 tratamientos se obtenía una matriz fermentable de polen cuyos indicadores microbiológicos estaban por debajo del límite de detección inferior de las metodologías analíticas empleadas (Tabla 4-5) fue necesario explorar otras variables de respuesta para la toma de decisiones.

Tabla 4-5: Índices de calidad microbiológica del polen apícola sometidos a diferentes tratamientos de adecuación e higienización (*n=3*).

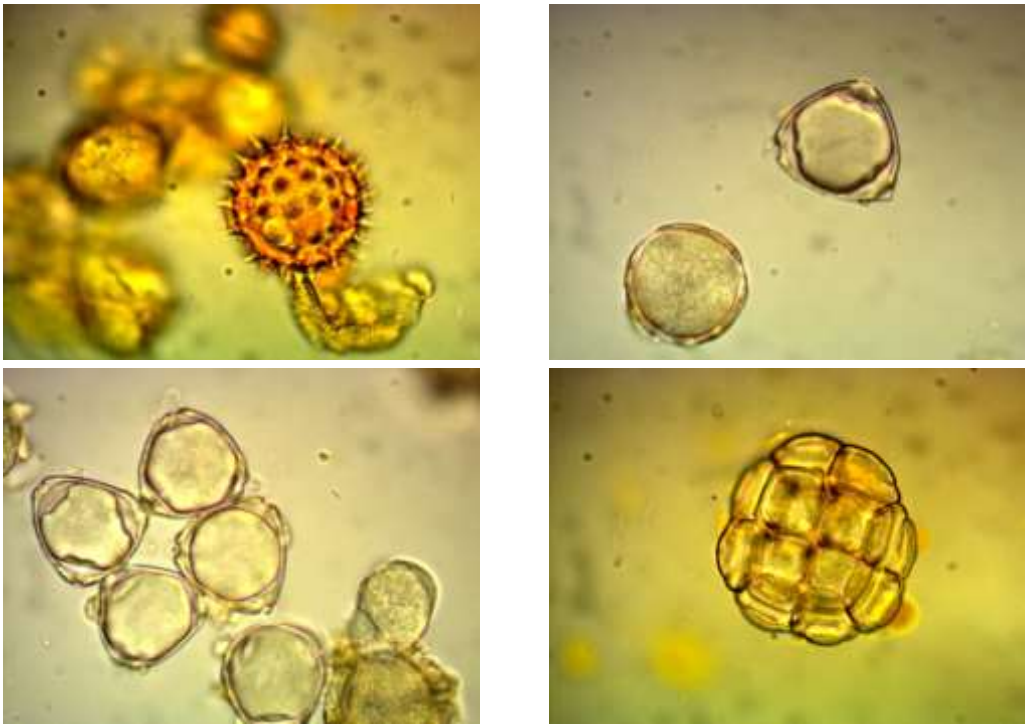
Tratamiento	Mohos y levaduras (UFC/g)	Coliformes totales (NMP/g)	Coliformes fecales (NMP/g)	Mesófilos aerobios (UFC/g)
1:1, 10 min, sin neutralizar	<3	<3	<3	<3
1:1, 10 min, neutralizado	<3	<3	<3	<3
1:1, 20 min, sin neutralizar	<3	<3	<3	10
1:1, 20 min, neutralizado	<3	<3	<3	<3
2:1, 10 min, sin neutralizar	<3	<3	<3	<3
2:1, 10 min, neutralizado	<3	<3	<3	<3
2:1, 20 min, sin neutralizar	<3	<3	<3	<3
2:1, 20 min, neutralizado	<3	<3	<3	<3

En el polen, investigaciones previas han demostrado la baja disponibilidad de nutrientes y compuestos bioactivos al momento de su consumo por parte de animales monogástricos como el ser humano, debido principalmente a la resistente microestructura que recubre las partículas de polen para proteger la célula generativa, conocida como exina (Bell *et al.*, 1983; Fernandes-Da Silva & Serrao, 2000; Human & Nicolson, 2006 citados por Fuenmayor, Quicazán, & Figueroa, 2011). Por tal motivo se evaluó de forma cualitativa la morfología del grano de polen sin ningún tipo de tratamiento (Figura 4-2) y después de someterlo a cada uno de los tratamientos planteados (

De forma general, en todos los tratamientos se observaron deformaciones y fisuras en la pared celular estructural del grano de polen que en algunos casos llegaban a las aperturas del grano con una evidente liberación del contenido citoplasmático (**¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**).

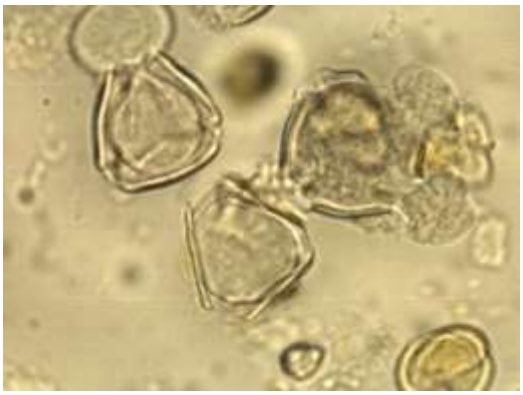
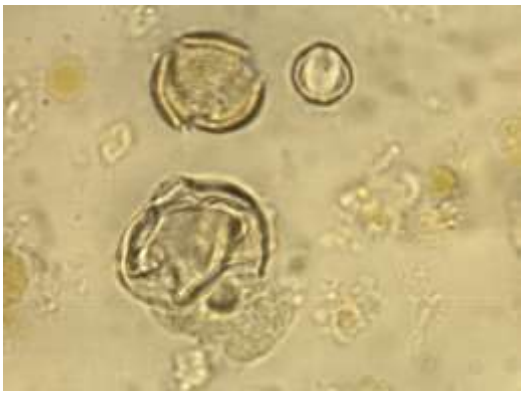
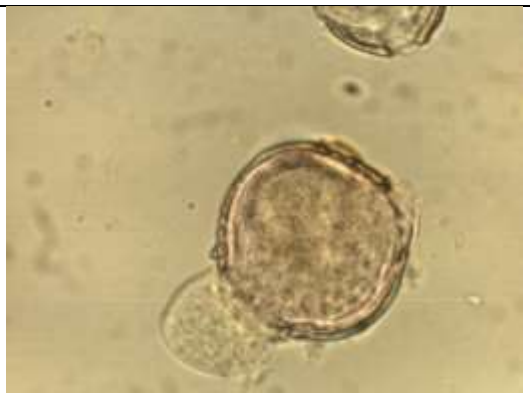
Figura 4-3), resaltando la tinción de la exina de color purpura. Con este seguimiento se quería comprobar si los tratamientos, además de reducir la carga microbiológica, alteraban de alguna manera la pared celular del polen de modo que su contenido intracelular quedara con mayor disponibilidad en futuros procesos fermentativos.

Figura 4-2: Microscopía óptica del grano de polen seco sin tratamiento



De forma general, en todos los tratamientos se observaron deformaciones y fisuras en la pared celular estructural del grano de polen que en algunos casos llegaban a las aperturas del grano con una evidente liberación del contenido citoplasmático (**¡Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**).

Figura 4-3: Microscopias de polen después de tratamientos de adecuación (*n=20*).

1:1, 10 min, sin neutralizar		
1:1, 10 min, neutralizado		
1:1, 20 min, sin neutralizar		

1:1, 20 min, con neutralizado		

Figura 4-3: (Continuación)

2:1, 10 min, sin neutralizar		
2:1, 10 min, neutralizado		
2:1, 20 min, sin neutralizar		

2:1, 20 min, neutralizado		

Dado que el tratamiento térmico ha sido utilizado tradicionalmente para la reducción de las cargas microbiológicas en matrices alimenticias, con especial interés en el tratamiento de polen apícola (Benavides, 2016; Salazar-González & Díaz-Moreno, 2016), se observa que se logra el mismo efecto al tratar el polen térmicamente 10 o 20 minutos. No se deben descartan futuras investigaciones donde se evalúen el efecto de someter el producto a otras duraciones en el tratamiento térmico. Se podría pensar que está misma conclusión aplica para los otros parámetros evaluados sin embargo, la influencia real de estas variables se resuelve a continuación al evaluar la capacidad fermentativa de las bacterias lácticas que se ven favorecidos bajo ciertas condiciones de agua disponible y pH inicial en el medio.

Teniendo en cuenta la inocuidad microbiológica del polen tratado térmicamente, ya sea con una duración de 10 o 20 minutos, se continúa el desarrollo experimental tratando térmicamente el polen en recipiente a presión durante 10 minutos y evaluando el efecto de las demás variables (relación agua:polen, neutralización del medio).

4.3 Seguimiento de procesos fermentativos de polen apícola higienizado

El primer cultivo evaluado a diferentes relaciones de agua:polen (1:1 y 2:1) y con neutralización o no del medio previa inoculación, fue CHOOZIT MY800 LYO. Al trabajar con un medio sin neutralizar (Figura 4-4), con pH cercanos a 4,5 dados por la naturaleza ácida del polen apícola, no se observan cambios significativos en el pH ni en la acidez que sean indicadores de un proceso fermentativo. Solamente cuando se tiene una mayor disponibilidad de agua en el medio, el proceso avanza tras 30 horas, lo que haría pensar

que esta acidificación tardía se debe a que los microrganismos inoculados requieren de un tiempo de adaptación en estas condiciones o que los cambios en acidez y pH se deben a la acción de otros microorganismos diferentes a las bacterias lácticas. Cuando se neutraliza el medio hasta un pH cercano al óptimo para este tipo de bacterias (Figura **4-5**), al trabajar una relación agua:polen de 1:1 no se observan cambios en el pH ni en la acidez en las primeras 30 horas, lo que haría pensar que una baja disponibilidad de agua en el medio afecta negativamente el metabolismo de este cultivo. Al trabajar el mismo cultivo con una relación 2:1 en medio neutralizado, se da una acidificación del medio y un descenso en el pH evidentes después de tres horas de inoculación. En ambos casos, la caída del pH y el aumento de acidez titulable como indicadores de desarrollo de un proceso fermentativo se ven favorecidos cuando se adecua el pH inicial del medio y es más efectiva con una mayor cantidad de agua.

Figura 4-4: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen no neutralizado con cultivo CHOOZIT MY800 LYO en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*).

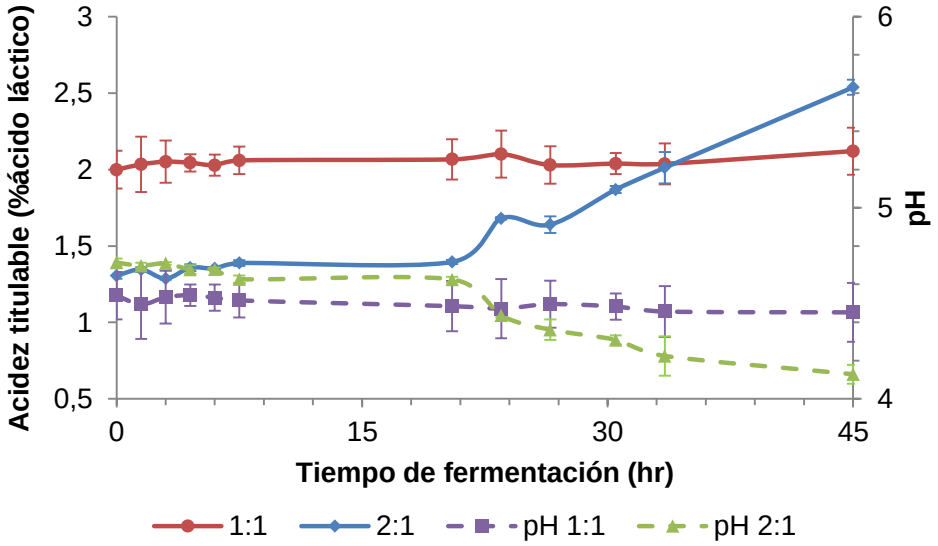
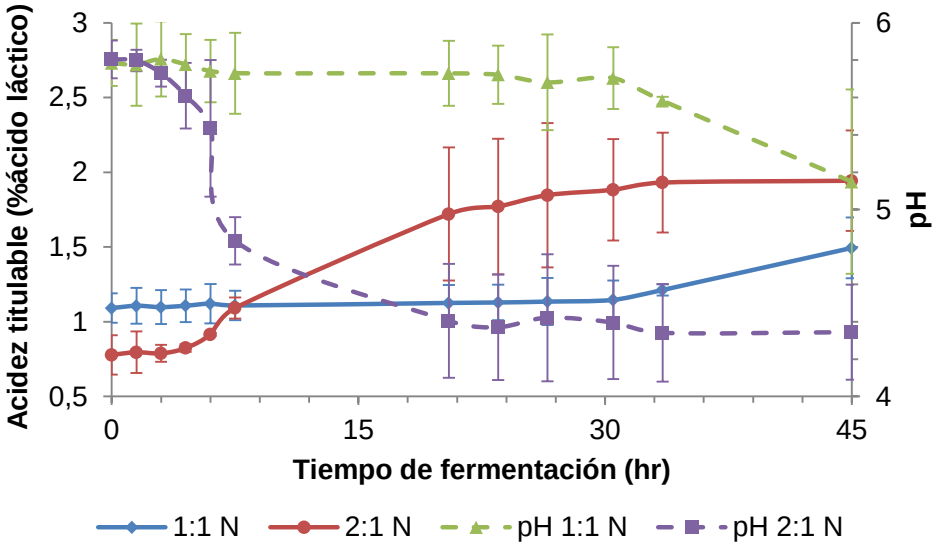
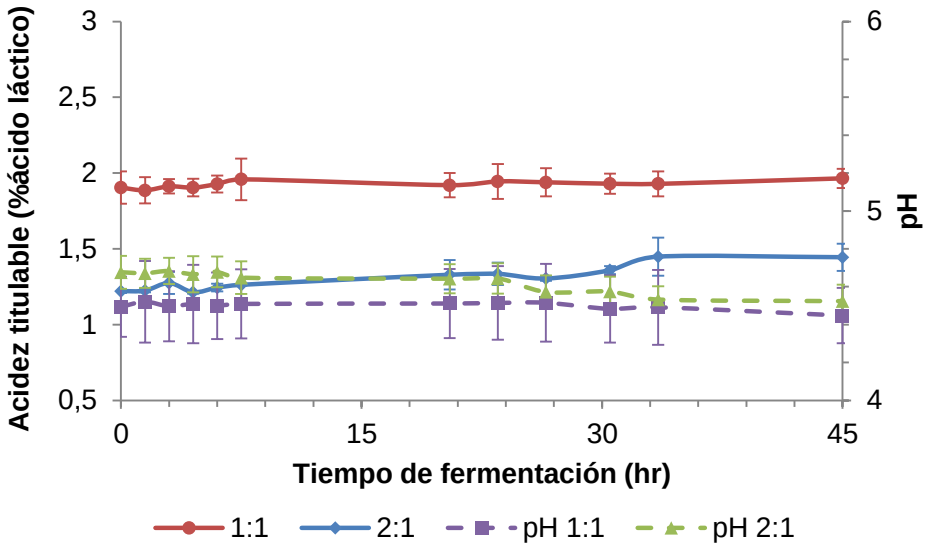


Figura 4-5: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen neutralizado con cultivo CHOOZIT MY800 en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3)*.



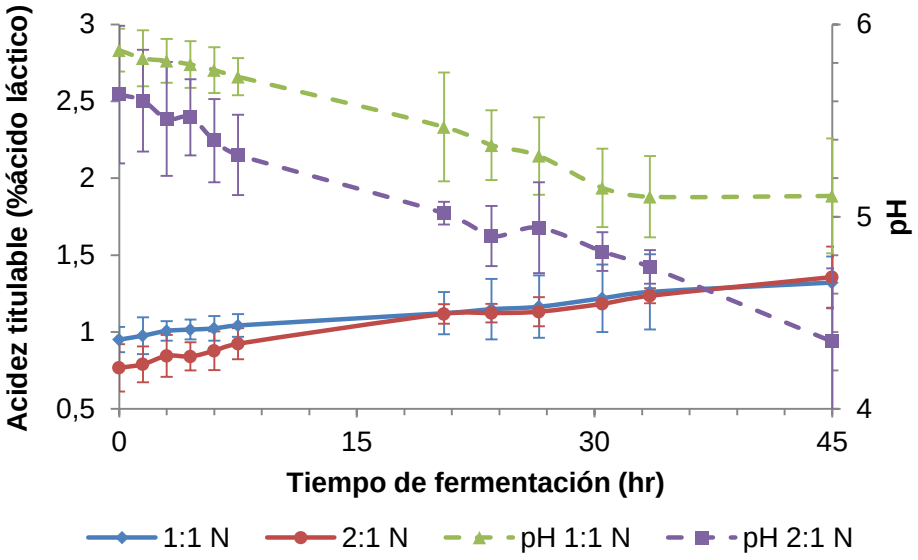
Una tendencia similar se observa en los procesos fermentativos con CHOOZIT MA4001 cuando el medio no es neutralizado (Figura 4-6). Para este cultivo, no se observan aumentos en la acidez ni descensos en el pH independiente de la relación agua:polen, lo que permite ver que este cultivo se ve afectado mayoritariamente por el pH inicial del medio.

Figura 4-6: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen no neutralizado con cultivo CHOOZIT MA4001 en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3)*.



Cabe resaltar que mientras en el medio sin neutralizar no hay acidificación ni disminución del pH, en el medio neutralizado (Figura 4-7) si se observa un aumento lento pero sostenido en la acidez desde el inicio del seguimiento que pasa de 0,95% a 1,22% a las 30 horas y finaliza en 1,32% tras 45 horas, aun cuando el pH finaliza en un valor relativamente alto (5,1) frente a lo esperado (4,5) en este tipo de procesos. Respecto al seguimiento realizado en un medio con mayor cantidad de agua disponible, se inicia con una acidez de 0,77% y alcanza 1,36% tras 45 horas. Dicho comportamiento se ve correlacionado con el valor de pH que pasa de 5,6 a 4,4.

Figura 4-7: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen neutralizado con cultivo CHOOZIT MA4001 en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*).



Un comportamiento totalmente diferente se encontró con el cultivo HOWARU™ Dophilus verificando la mayor capacidad de acidificación que se le atribuye en diversas investigaciones al *L. acidophilus*, aún en medios ácidos (Gomes & Malcata, 1999). El cultivo HOWARU™ Dophilus fue el único que evidenció un proceso de fermentación láctica marcado en medio sin neutralizar para una relación agua:polen 2:1 (Figura 4-8). En medio neutralizado (
Figura **4-9**), no existe diferencia significativa entre una relación agua:polen 1:1 y 2:1, donde tras 6 horas de seguimiento se alcanza una acidez de 1,33%, similar a la alcanzada tras 45 horas por los cultivos CHOOZIT MA4001 y CHOOZIT MY800. Luego se observa una acidificación continua que finaliza en 2,60% tras 45 horas. Este cultivo también se ve favorecido con un aumento en el agua disponible en el medio a fermentar. Contrario a lo observado hasta ahora, se percibe que no existe diferencia significativa al neutralizar o no el medio, independiente de la cantidad de agua disponible en el sustrato; con ambos tratamientos se logra un perfil de acidificación similar hasta alcanzar pH cercanos a 4,2.

Este comportamiento es similar a lo encontrado en investigaciones previas (Benavides, 2016; Fuenmayor, 2009), donde los mejores resultados fermentativos se lograron con

una cepa pura de *L. acidophilus* aunque en condiciones de neutralización y tratamiento térmico del polen más severas.

Figura 4-8: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen no neutralizado con cultivo *L. acidophilus* en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*).

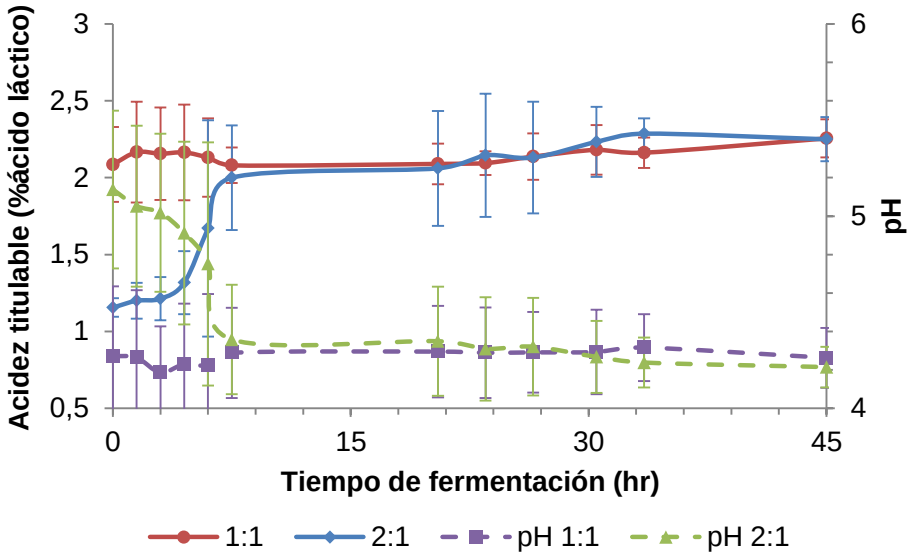
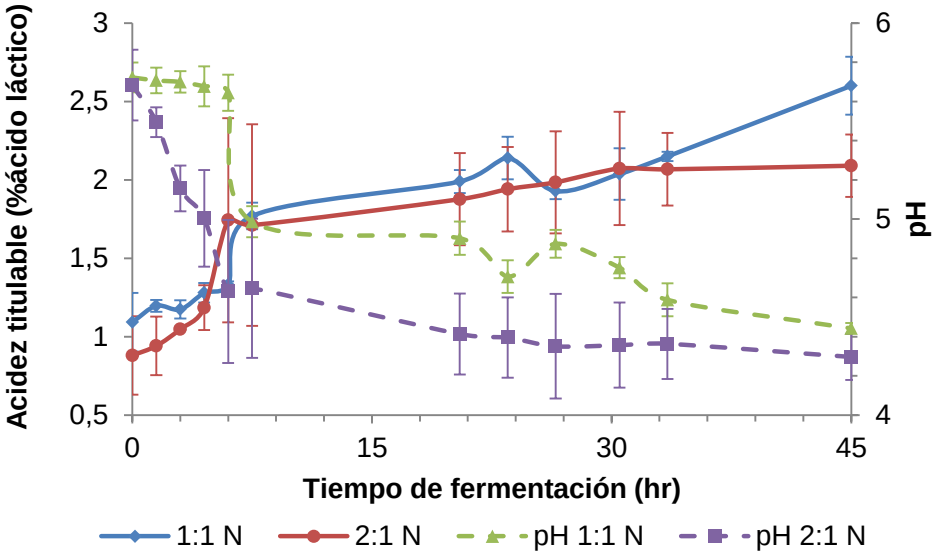


Figura 4-9: Seguimiento de acidez titulable (*línea continua*) y pH (*línea punteada*) en proceso fermentativo de polen neutralizado con cultivo *L. acidophilus* en relación agua:polen 1:1 y 2:1 (*n=3*).



Otro factor que se evaluó fue la modificación de la estructura del grano producto de la fermentación. Para tal fin se verificó la morfología del grano antes y después de cada proceso fermentativo por microscopia óptica, buscando identificar de manera cualitativa posibles alteraciones. En la Figura 4-10 se muestra parte del registro fotográfico obtenido donde se comprueba degradación de los granos y en algunos casos hidratación de los mismos reflejados en aumento de tamaño, pero de manera visual no se evidencia una diferencia significativa entre tratamientos.

Figura 4-10: Microscopias del polen antes y después del proceso fermentativo (*n=20*).

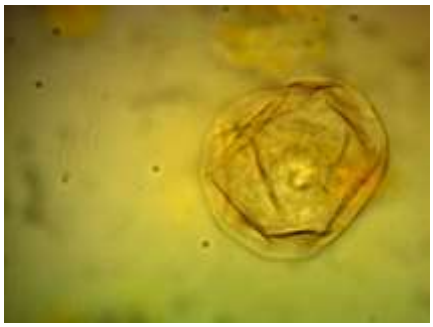
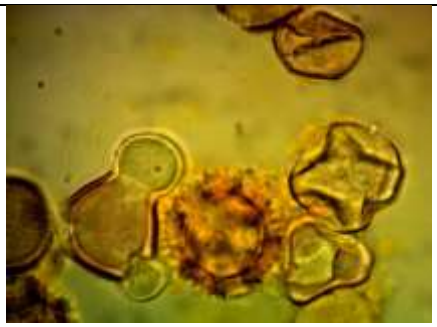
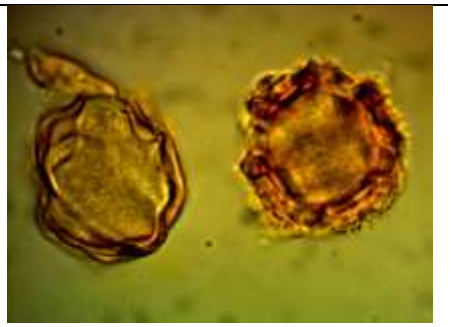
Tratamiento	Antes de la fermentación	Después de la fermentación
CHOOZIT MY800, 1:1, neutralizado		
CHOOZIT MY800, 1:1, sin neutralizar		
CHOOZIT MY800, 2:1, neutralizado		

Figura 4-10: (Continuación)

Tratamiento	Antes de la fermentación	Después de la fermentación
CHOOZIT MY800, 2:1, sin neutralizar		
CHOOZIT MA4001, 1:1, neutralizado		
CHOOZIT MA4001, 1:1, sin neutralizar		
CHOOZIT MA4001, 2:1, neutralizado		

Figura 4-10: (Continuación)

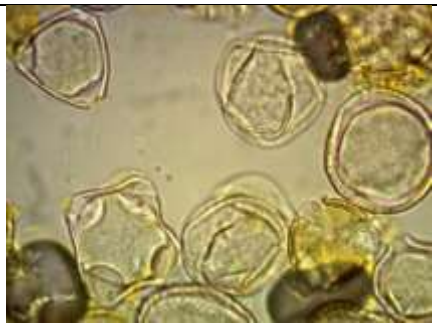
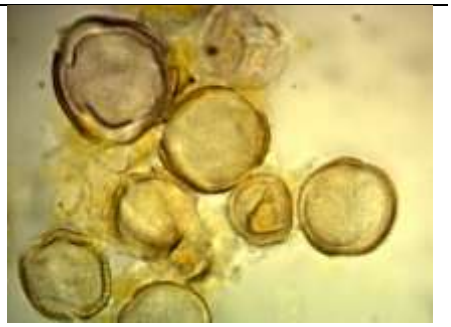
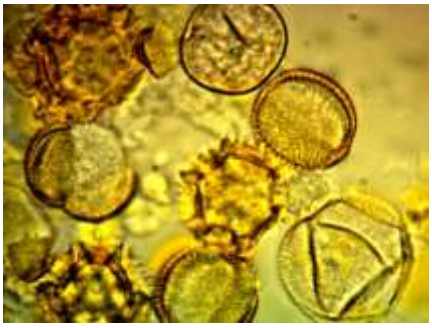
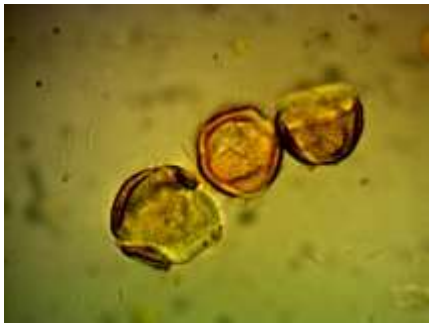
Tratamiento	Antes de la fermentación	Después de la fermentación
CHOOZIT MA4001, 2:1, sin neutralizar		
***L. acidophilus*, 1:1, neutralizado**		
***L. acidophilus*, 1:1, sin neutralizar**		
***L. acidophilus*, 2:1, neutralizado**		

Figura 4-10: (Continuación)

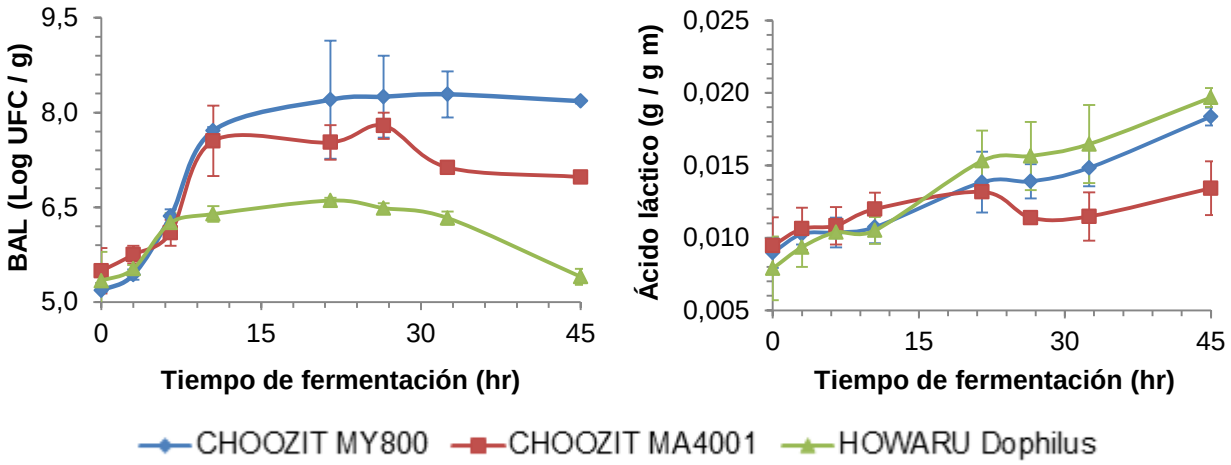
Tratamiento	Antes de la fermentación	Después de la fermentación
***L. acidophilus*, 2:1, sin neutralizar**		

Tomando como criterio la capacidad fermentativa en los ensayos realizados, la discusión anterior y en aras de estandarizar el proceso para cualquiera de los tres cultivos lácticos trabajados, se seleccionó el tratamiento térmico durante 10 minutos, con relación agua:polen 2:1 y medio neutralizado como el de mayor potencial. A cada uno de los tratamientos seleccionados se le realizó seguimiento cinético de bacterias lácticas específicas y de ácido láctico producido como principal producto del proceso fermentativo. Cabe destacar que en el caso del cultivo HOWARU, los tratamientos con relación agua:polen 1:1 también ofrecen condiciones favorables para el proceso fermentativo.

Como se observa en la Figura 4-11 para todos los cultivos fue evidente un crecimiento microbiano exponencial en las primeras 10 horas, una fase estacionaria entre las 10 y 26 horas y una disminución o posible muerte después de las 30 horas. En cuanto a producción de ácido láctico, la mayor productividad se obtuvo con el cultivo HOWARU Dophilus aun cuando su población microbiana fue la de menor crecimiento. La productividad del cultivo CHOOZIT MY800 no difiere significativamente de la del HOWARU, aunque su población microbiana se mantiene por encima de 8 unidades logarítmicas después de las 25 horas. Tras 30 horas comienza a observarse un descenso marcado en las poblaciones de bacterias lácticas, posiblemente por la alta acidez del medio que actúa en contra de la viabilidad de los microorganismos y teniendo como resultado la muerte celular. Aunque se observa una estabilización en las poblaciones microbianas entre las 12 y 30 horas, se decide detener los procesos

fermentativos a las 30 horas, esto con el fin de permitir el desarrollo del *flavor* en la matriz de manera análoga a como se desarrolla en productos sometidos a maduración. En este mismo periodo de tiempo, se ve un aumento de acidez y descenso en el pH moderado.

Figura 4-11: Seguimiento cinético de bacterias ácido lácticas (izq.) y producción de ácido láctico (der.) de los mejores tratamientos seleccionados para cada cultivo trabajado (*n=3*)



En ensayos posteriores se decide estandarizar la fermentación de polen apícola y detenerla 30 horas después de iniciar su incubación a la temperatura recomendada.

4.4 Inclusión de polen fermentado en bebidas lácteas fermentadas

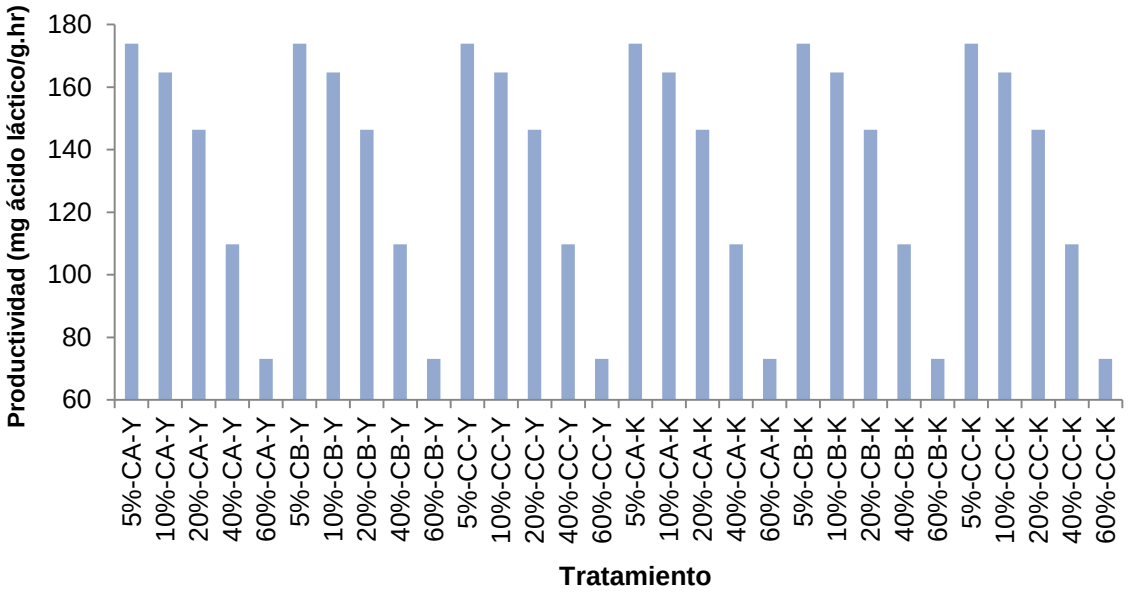
Tras determinar las condiciones para la fermentación de polen con cada uno de los cultivos lácticos comerciales trabajados, se realizó la inclusión de estos en yogur y kumis en proporciones del 5, 10, 20, 40 y 60% como lo ejemplifica la Figura 3-2. Para la selección del yogur y del kumis con el nivel de inclusión de polen fermentado de mayor potencial se evaluaron parámetros de productividad, estabilidad y aceptabilidad.

La productividad de cada una de las mezclas resultantes fue valorada como promedio ponderado de las productividades de ácido láctico (*láctico*) en el polen fermentado (*pf*) y en la bebida láctea fermentada (*bl*) como describe la Ecuación 4.1.

$$Productividad = \%polen\left(\frac{láctico\ pf_f - láctico\ pf_i}{30\ hr}\right) + (1 - \%polen)\left(\frac{láctico\ bl_f - láctico_i}{5\ hr}\right) \qquad (4.1.)$$

Los valores de productividad se muestran en la Figura 4-12, donde cabe destacar que las mayores magnitudes se dan para los niveles de inclusión del 5% dado que la productividad de la bebida láctea base (yogur o kumis) es mayor, dado que alcanza niveles de ácido láctico similares a los del polen fermentado en un periodo de 5 horas frente a las 30 horas que requiere la matriz vegetal.

Figura 4-12: Productividad de las mezclas de yogurt (Y) y kumis (K) con inclusión de diferentes porcentajes de polen fermentado con CHOOZIT MY800 (CA), CHOOZIT MA4001 (CB) y Howaru Dophilus (CC) (*n=3*).



La estabilidad fue evaluada por la sinéresis generada en cada una de las mezclas, teniendo como criterio que en una bebida láctea fermentada de calidad la separación natural de las fases acuosa y grasa debe ser mínima (Lee & Lucey, 2003; Temesgen, 2015). La literatura reporta valores típicos en el intervalo de 42 a 60% (Barkallah *et al.*, 2017; Sert *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). Los valores encontrados de sinéresis, entendida como capacidad de retención de agua, se resumen en la Tabla 4-6. Contraria a la tendencia encontrada en la determinación de la productividad, tanto en kumis como en yogur la sinéresis fue inversamente proporcional al nivel de inclusión de polen independiente del cultivo utilizado en el polen, siendo las mezclas con mayor cantidad de polen las que reportaron una menor sinéresis. Este comportamiento se podría generar

debido a un mayor contenido de sólidos en la mezcla, sólidos que estabilizan la emulsión (Bosnea *et al.*, 2016).

La aceptabilidad fue evaluada a través del análisis sensorial de cada una de las mezclas con panel entrenado (con puntuaciones entre 0 y 20) y con panel de consumidores habituales de productos tipo yogur y kumis (con puntuaciones entre 1 y 7). En la Tabla 4-6 se presenta la puntuación global para cada una de las inclusiones realizadas donde se interpreta que un producto con una menor puntuación presentaba un mayor número de defectos leves o algunos pocos defectos muy marcados. Los productos con mayor puntaje corresponden a yogures y kumis con inclusiones que no sobrepasan el 10%, sin diferencia significativa entre los diferentes cultivos comerciales utilizados al momento de fermentar el polen. La ponderación detallada para cada uno de los parámetros sensoriales evaluados (visuales, olfativos, gustativos, táctiles) se muestra en el Anexo B.

Tabla 4-6: Parámetros de selección del producto con mayor potencial de acuerdo a parámetros de productividad, estabilidad y aceptabilidad (*n=3*).

Tratamiento	Sinéresis (%)	Análisis sensorial de calidad	Análisis sensorial hedónico
5%-MY800-Y	57,90±0,18^{klmn}	18,8±1,0^{ab}	3,6±0,8
10%-MY800-Y	58,29±0,25^{klmn}	18,0±1,6^{abcdefghi}	3,3±0,8
20%-MY800-Y	54,06±0,10^{defghi}	17,3±1,7^{abcde}	3,3±0,9
40%-MY800-Y	51,09±0,26^{bcd}	14,0±1,5^{abcdefg}	2,8±1,0
60%-MY800-Y	47,07±0,24^{a}	13,4±2,5^{abcd}	3,1±0,9
5%-MA4001-Y	57,97±0,05^{klmn}	16,8±1,5^{abcdefghi}	3,7±0,8
10%-MA4001-Y	58,57±0,37^{lmn}	17,4±1,1^{cdefghi}	3,6±0,8
20%-MA4001-Y	52,90±0,21^{cdefg}	16,9±1,9^{a}	2,9±0,9
40%-MA4001-Y	54,18±3,75^{defghij}	15,0±1,8^{abcdefghi}	2,8±1,0
60%-MA4001-Y	48,09±0,35^{ab}	13,5±1,2^{abcde}	2,5±1,0
5%-AC-Y	60,10±0,42^{mn}	18,5±1,1^{abcdefghi}	3,9±0,5
10%-AC-Y	59,93±0,26^{mn}	18,1±1,0^{ghi}	3,5±0,7
20%-AC-Y	56,29±0,42^{hijkl}	16,3±1,0^{abcdef}	3,0±0,9
40%-AC-Y	51,79±0,40^{cde}	13,8±1,4^{abcdef}	2,7±0,9
60%-AC-Y	47,50±0,83^{a}	13,1±1,0^{abc}	2,6±0,9
5%-MY800-K	56,75±0,36^{ijklm}	17,6±1,2^{abc}	3,6±0,8
10%-MY800-K	58,51±0,43^{lmn}	18,6±1,0^{abcdefghi}	3,3±0,9
20%-MY800-K	52,11±0,14^{cde}	17,0±1,7^{abcdefghi}	3,4±0,9
40%-MY800-K	49,93±0,35^{abc}	11,7±2,6^{a}	3,2±0,9

60%-MY800-K	47,93±0,37^{ab}	14,1±2,1^{abcdefghi}	2,9±0,9

Tabla 4-6: (Continuación)

Tratamiento	Sinéresis (%)	Análisis sensorial de calidad	Análisis sensorial hedónico
5%-MA4001-K	57,12±0,34^{ijklmn}	15,8±1,1^{abcdefghi}	3,3±0,9
10%-MA4001-K	60,34±0,34^{n}	17,2±0,8^{abc}	3,6±0,9
20%-MA4001-K	56,02±0,05^{ghijkl}	16,5±1,3^{abc}	2,7±1,0
40%-MA4001-K	53,38±0,33^{defgh}	14,4±2,1^{abcde}	2,7±1,2
60%-MA4001-K	48,00±0,42^{ab}	13,0±1,2^{abc}	2,7±0,7
5%-AC-K	57,53±0,41^{jklmn}	16,5±2,0^{abcdefghi}	3,8±0,6
10%-AC-K	54,99±0,16^{efghijk}	17,0±1,6^{ghi}	3,5±0,7
20%-AC-K	56,55±0,23^{hijkl}	16,9±1,8^{abcdefghi}	3,1±0,9
40%-AC-K	55,74±3,96^{fghijkl}	15, 3±2,8^{abcdefghi}	2,5±1,0
60%-AC-K	52,54±0,22^{cdef}	12,3±0,8^{ab}	2,6±1,0
Valor-p	<0,0001	<0,0001	-

Promedios en la misma columna con la misma letra (superíndice) indican que no existen diferencias significativas mediante prueba de Tukey, α=0,05. $X \pm DS$

Se resalta que la inclusión de polen fermentado en cualquier porcentaje otorga al producto un color naranja cremoso brillante característico sin la necesidad de adicionar colorantes artificiales. A nivel visual algunas mezclas presentaron defectos de homogeneidad y sinéresis, defectos que fueron marcados en mezclas con bajos niveles de inclusión (5 – 10 %), correspondiéndose con lo determinado anteriormente en la metodología analítica. Al momento de evaluar las mezclas con kumis, éstas presentaron burbujas de gran tamaño en la superficie que harían pensar en procesos post-fermentativos que de acuerdo a una ruta heterofermentativa, serían indicadores de la producción de dióxido de carbono. Según reportes de la literatura el burbujeo debido a procesos post-fermentativos debe ser a modo de burbujas finas en todo el volumen del producto (Adams & Moss, 2000), por tal motivo el panel no castigó este posible defecto y lo consideró consecuencia de la agitación del producto antes de ser servido.

A nivel olfativo y gustativo todas las mezclas presentaron notas lácteas características, resaltando las mezclas con kumis por tener un perfil aromático de mayor intensidad, que puede deberse a una mayor producción de metabolitos secundarios como acetaldehído, diacetilo y acetil propionil, entre otros (Ott, Fay, & Chaintreau, 1997). Las mezclas con altos porcentajes de polen fermentado (40 y 60%) fueron valoradas negativamente por el panel al tener una acidez agresiva no característica en boca, que excedía el equilibrio

dulce-ácido que se encuentra normalmente en este tipo de productos en el mercado colombiano.

Los mayores defectos encontrados fueron del tipo táctil al evaluar en boca la granulosidad y viscosidad. La inclusión de grandes proporciones de polen generó una sensación arenosa no característica en las bebidas lácteas. Las bajas puntuaciones en la calidad de los productos con inclusiones del 40 y 60% se deben en gran medida a este parámetro. Igualmente el panel describe que los productos con inclusiones de polen superiores al 20% presentan baja viscosidad, defecto que aumenta proporcionalmente a medida que aumenta la cantidad de polen fermentado en el producto final, polen que de por sí ya lleva el doble de su peso en agua. Podría pensarse en el uso de estabilizantes del tipo goma guar o goma *xanthan* para contrarrestar este defecto, pero no se consideró al ir en contravía al desarrollo de un producto natural sin estabilizantes o conservantes adicionados.

La evaluación sensorial se complementó con la degustación de cada mezcla por parte de 50 consumidores quienes, además de decir el grado de aceptación / rechazo por el producto, retroalimentaron el desarrollo con opiniones y consejos para mejorar. Fue de gran satisfacción encontrar que el producto fue considerado como interesante, novedoso y en algunos casos delicioso. La idea que fuera natural (sin adición de estabilizantes o conservantes) y concediera propiedades funcionales comprobadas (antioxidantes y probióticas) fue de gran interés en los consumidores, sobre todo los jóvenes. En términos generales la mayor aceptación, es decir los calificativos de “me gusta mucho” y “me gusta”, se dio en las mezclas de yogur y kumis con niveles de inclusión del 5 y 10% mientras que los mayores rechazos con el calificativo “me disgusta” se dio en las mezclas con inclusiones del 40 y 60% (ver Anexo B). La ponderación del nivel de aceptación de cada mezcla con el porcentaje de la población encuestada se resumen en la Tabla 4-6, siendo 1 el menor puntaje posible (me disgusta mucho) y 5 el mayor puntaje posible (me gusta mucho).

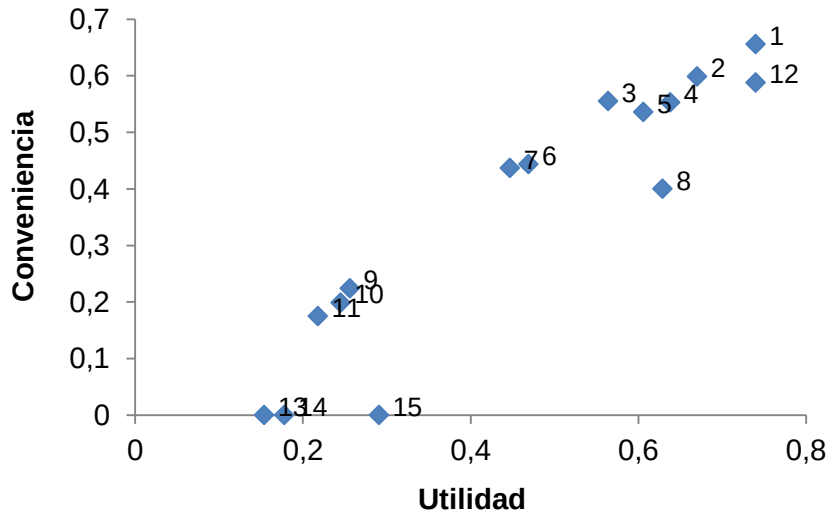
Algo sorpresivo fue la descripción general dada a las bebidas lácteas con inclusión de polen fermentado: bebida de color agradable que hace pensar en una bebida de melocotón, mango o ahuyama, de olor característico y sabor intenso que recordaba el

sabor del chontaduro y la miel. Aunque en el desarrollo todas las mezclas fueron estandarizadas a niveles de azúcar del 9 %p/v, para el consumidor promedio todas las mezclas estaban bajas de dulce. Esta tendencia vislumbró que el mercado local gusta de productos con altos niveles de dulzor, como ya lo habían descrito reportes y estadísticas poblaciones (ICBF, 2011).

Las causas de rechazo de los productos con inclusiones de polen fermentado del orden de 20, 40 y 60% fueron similares a los motivos de baja puntuación por parte del panel entrenado: “pepitas” con residual amargo/agrio excesivo, acidez que recordaba el sabor a limón y textura dura que hacía difícil tragar el producto. En general el consumidor lo rechazaba porque a su juicio, lo que estaban probando era otra bebida fermentada tipo chicha, totalmente diferente a la idea que se tiene de una bebida láctea tipo yogur o kumis.

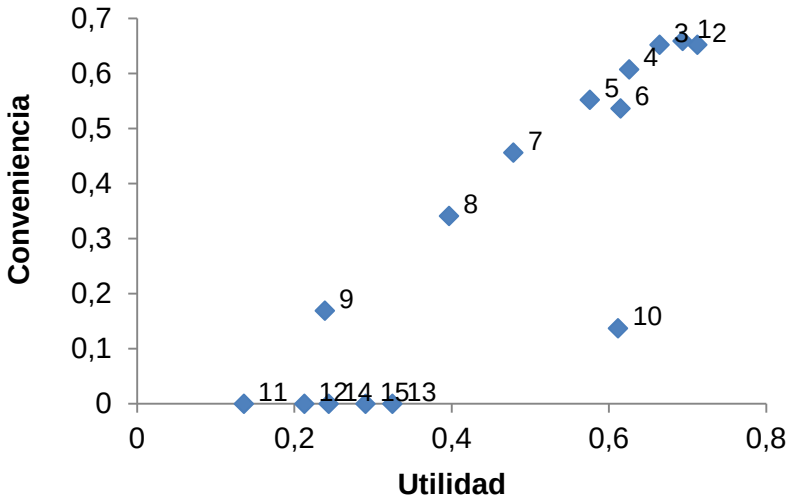
La selección del yogur y del kumis con mayor potencial se realizó ponderando la productividad, la sinéresis, el análisis sensorial de calidad y el análisis sensorial hedónico a través de una función de beneficio-utilidad, obteniendo los resultados ilustrados en la Figura 4-13 para las mezclas con yogur y en la Figura 4-14 para las mezclas con kumis.

Figura 4-13: Diagrama de utilidad-beneficio por técnicas de clasificación en yogur con inclusión de polen fermentado.



1. 5% MY800; 2. 5% MA4001; 3. 20% MY800; 4. 10% MA4001; 5. 10% MY800, 6; 20% MA4001; 7. 20% HOWARU; 8. 10% HOWARU; 9. 40% MA4001; 10. 40% MY800; 11. 40% HOWARU; 12. 5% HOWARU; 13. 60% MA4001; 14. 60% HOWARU; 15. 60% MY800.

Figura 4-14: Diagrama de utilidad-beneficio por técnicas de clasificación en kumis con inclusión de polen fermentado.



1. 5% MY800; 2. 5% HOWARU; 3. 10% HOWARU; 4. 20% MY800; 5. 5% MA4001, 6; 10% MY800; 7. 20% HOWARU; 8. 20% MA4001; 9. 40% MA4001; 10. 10% MA4001; 11. 60% HOWARU; 12. 40% HOWARU; 13. 60% MY800; 14. 60% MA4001; 15. 40% MY800.

Se observa que las mezclas con inclusiones de polen del 60% tienen valores bajos en las funciones de conveniencia y valores de cero en sus funciones de utilidad, lo que se corresponde con las menores productividades, menor calidad sensorial y menor aceptación por parte de consumidores habituales. Por otro lado, los productos de mayor utilidad y conveniencia son: yogur y kumis con inclusión del 5% de polen fermentado con CHOOZIT MY800. Estos fueron caracterizaron a nivel fisicoquímico, microbiológico y bioactivo, con los resultados exhibidos en la Tabla 4-7.

A nivel fisicoquímico los productos desarrollados cumplen con el nivel de acidez mínimo establecido en la normatividad nacional y no difieren significativamente de la acidez y pH típicos de este tipo de productos (Dave & Shah, 1997; Srisuvor *et al.*, 2013). Estas variables no presentaron una diferencia significativa entre los dos productos evaluados. El color, mostrado en la Tabla 4-7 a modo de referencia, es el resultado de la mezcla de las bebidas lácteas fermentadas de matiz blanco con el aporte naranja rojizo del polen

incluido. Se determinó que el yogur presenta mayor brillo, mientras que el kumis se caracteriza por tener coordenadas a* y b* de mayor magnitud, lo que implica que su tonalidad tiende al rojo y al amarillo respectivamente en mayor proporción que en el yogur. Esto puede deberse a la tonalidad amarillenta del kumis antes de realizar la inclusión, además de la variabilidad normal del color en el polen multifloral trabajado.

Tabla 4-7: Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los productos lácteos desarrollados.

Parámetro	Yogur	Kumis
Acidez (%ac láctico)	1,027±0,168[a]	0,993±0,179[a]
pH	4,311±0,087[a]	4,369±0,120[a]
Color CIE L*a*b*		
L*	84,24±0,23[b]	82,68±0,48[a]
a*	1,94±0,13[a]	2,70±0,18[b]
b*	26,52±0,44[a]	29,65±0,30[b]
Carbohidratos		
Glucosa (%p/p)	0,028±0,001[a]	0,032±0,001[b]
Fructosa (%p/p)	0,010±0,002[a]	0,004±0,004[a]
Sacarosa (%p/p)	0,232±0,051[a]	0,377±0,076[a]
Ácidos orgánicos		
Ácido láctico (%p/p)	0,884±0,112[a]	0,967±0,062[a]
Ácido cítrico (%p/p)	0,062±0,035[a]	0,052±0,020[a]
Bacterias lácticas específicas (Log UFC/g)	9,2±0,0	9,0±0,1
Mohos y levaduras (UFC/g)	13±11	< 3
Mesófilos aerobios (UFC/g)	23±12	27±21
Coliformes totales (NMP/g)	< 3	< 3
Coliformes fecales (NMP/g)	<3	< 3

Promedios en la misma fila con la misma letra (superíndice) indican que no existe diferencias significativas mediante prueba de Tukey, α=0,05. $X \pm DS$, n=3

A nivel microbiológico el producto cumple con los requisitos establecidos para las bebidas lácteas fermentadas en la normatividad nacional e internacional con conteos de mohos y levaduras, mesófilos aerobios y coliformes por debajo de los límites máximos permisibles. Se destaca que ambos productos cuentan con contenidos de bacterias lácticas específicas del orden de 9 unidades logarítmicas por gramo, superiores a las 7 unidades logarítmicas exigidas en los estándares internacionales (FAO, 2003)

Una de las características más destacables de los productos desarrollados es el aporte de compuestos bioactivos representado en su actividad antioxidante y contenido de fenoles totales, superior al otorgado por un yogur y kumis base sin inclusión de polen fermentado (Tabla 4-8), excepto en la capacidad antioxidante del yogur determinado por la metodología FRAP donde no se tuvo diferencia significativa entre el producto base y el producto con inclusión.

Tabla 4-8: Caracterización bioactiva de los productos lácteos desarrollados frente a los productos sin inclusión de polen fermentado.

	Parámetro	**Producto sin inclusión**	**Producto con inclusión**	***Valor-p***
Yogur	**TEAC (mmol Trolox / kg muestra)****	0,018±0,004[a]	0,086±0,003[b]	0,0481
	FRAP (mmol Trolox / kg muestra)*	0,116±0,017[a]	0,157±0,024[a]	0,0697
	Contenido de fenoles totales (µg ácido cafeico/g muestra)*	8,877±0,457[a]	45,494±7,007[b]	0,0008
Kumis	**TEAC (mmol Trolox / kg muestra)****	0,032±0,009[a]	0,149±0,073[b]	0,0450
	FRAP (mmol Trolox / kg muestra)*	0,111±0,007[a]	0,179±0,033[b]	0,0421
	Contenido de fenoles totales (µg ácido cafeico/g muestra)*	23,839±0,296[a]	54,052±13,866[b]	0,0196

Promedios en la misma fila con la misma letra (superíndice) indican que no existe diferencias significativas mediante *prueba de Tukey, **prueba de Kruskal-wallis, α=0,05. $X \pm DS$, n=3

Destaca el aporte de contenido de fenoles totales en los productos desarrollados entre 45 y 54 µg ácido cafeico por gramo, frente a otras investigaciones donde se han desarrollado yogures con inclusión de diferentes matrices vegetales ampliamente reconocidas por su contenido fenólico: 6% de avellanas (10,6 µg/g), 0,8% de curuba (15,5 µg/g), extracto de ajo (40 µg/g), 20% de agraz silvestre (60 µg/g) o 2% de té negro (370 µg/g) (Bertolino *et al.*, 2015; Muniandy, Shori, & Baba, 2015; Sánchez, Sepúlveda, & Rojano, 2013; Shori & Baba, 2014; Zapata, Sepúlveda-Valencia, & Rojano, 2015). Este mismo análisis comparativo no se desarrolló con la actividad antioxidante, dado que el uso de sustancias de referencia y técnicas es amplio y diverso entre los estudios de bebidas lácteas fermentadas con inclusión de matrices vegetales. Por la técnica DPPH,

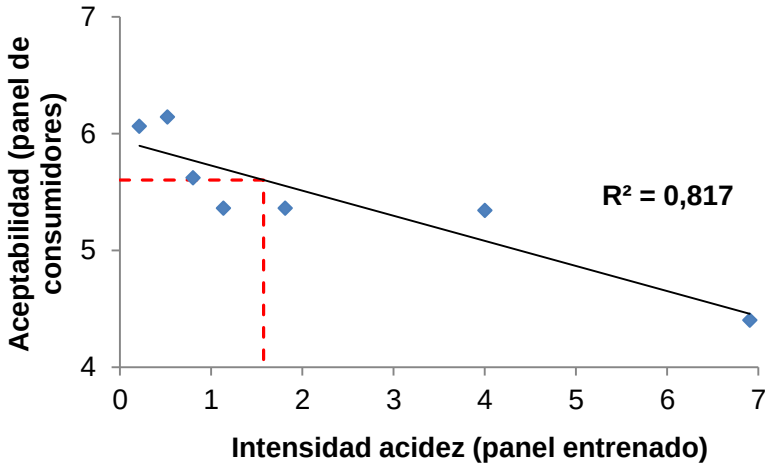
se reporta 0,138 mmol de trolox/kg para un yogurt con extracto de curuba (Sánchez *et al.*, 2013), 0,265 mmol de trolox/kg para un yogurt saborizado con mortiño (Zapata *et al.*, 2015) y 0,101 mmol de trolox/kg para un yogurt con avellanas.

4.5 Determinación y modelamiento de la vida útil de los productos seleccionados

La determinación de la vida útil del kumis y el yogur seleccionados estuvo sujeta al análisis sensorial, tanto de consumidores como de panelistas entrenados, a diferentes tiempos en condiciones de refrigeración (5ºC), temperatura de almacenamiento recomendada para bebidas lácteas. Cabe aclarar que dentro del plan de muestreo planteado en la Tabla 3-2, no se evaluó sensorialmente el octavo punto dado que no cumplían criterios de calidad microbiológica.

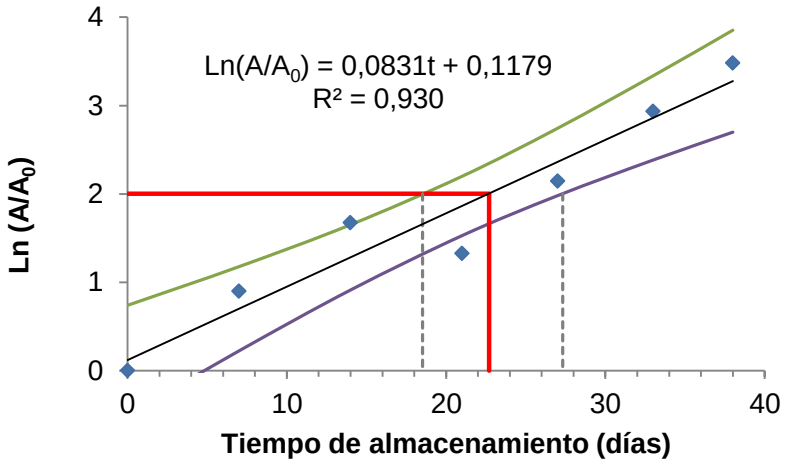
En el caso del yogur, se encontró que el punto en el cual los consumidores empiezan a notar que la calidad del producto disminuye significativamente fue 5,6 sobre la escala hedónica de 7 puntos. Al correlacionar la valoración promedio dada por los consumidores con la valoración promedio de acidez dada por los panelistas entrenados, se encuentra que ésta se corresponde con una intensidad de acidez en escala no estructurada de 1,58 (Figura 4-15). Dicho valor corresponde al valor límite de aceptabilidad o punto de corte.

Figura 4-15: Determinación del punto de corte en el estudio de vida útil del yogur desarrollado almacenado a 5ºC.



La intensidad en la acidez evaluada por el panel entrenado en función del tiempo de almacenamiento se ajustó a una cinética de primer orden como se muestra en la Figura 4-16, donde es linealizada la función al tomar el logaritmo natural del cociente entre la acidez (A) y la acidez inicial del producto (A_0). Al interpolar el punto de corte calculado anteriormente, se obtiene que la vida útil de yogur con inclusión de 5% de polen fermentado es de 23 días con un intervalo de confianza (α=0,05) entre 19 y 27 días.

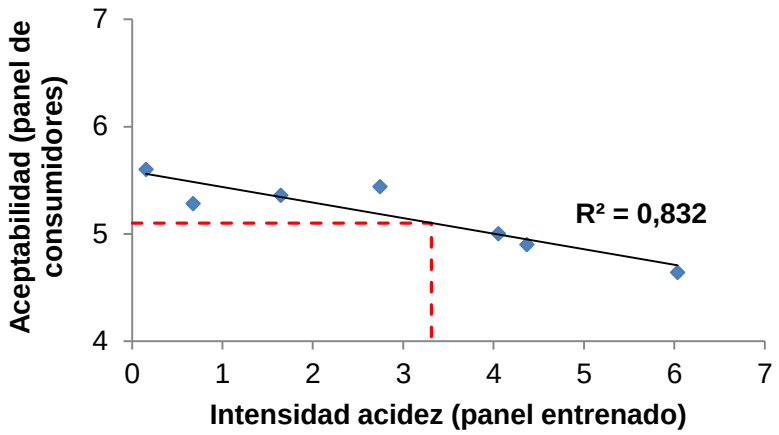
Figura 4-16: Determinación del tiempo de vida útil sensorial a 5ºC de yogur con inclusión de 5% de polen fermentado con intervalos de confianza del 95%



De manera análoga para el kumis con inclusión de polen fermentado, los consumidores notaron que la calidad del producto disminuía significativamente cuando la valoración sobre escala hedónica de 7 puntos estaba por debajo de 5,13. La correlación de la valoración de los consumidores con la valoración de los panelistas entrenados (

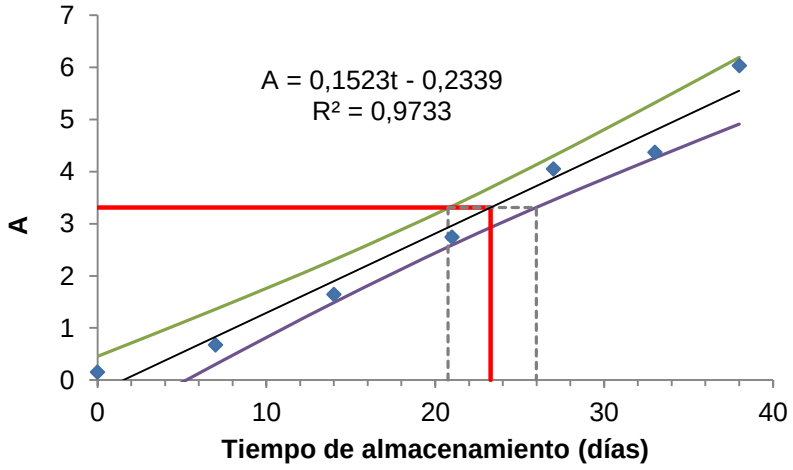
Figura **4-17**) arrojó un punto de corte sobre la escala no estructurada de 3,31 y de 2,56 para cada uno de los lotes evaluados.

Figura 4-17: Determinación del punto de corte en el estudio de vida de kumis desarrollado almacenado a 5ºC para cada lote evaluado.



La acidez evaluada por panel entrenado en función del tiempo de almacenamiento se ajustó a una cinética de orden cero. Al interpolar el punto de corte calculado, se obtiene que el producto tiene una vida útil de 22 días con un intervalo de confianza (α=0,05) comprendido entre 21 y 26 días (Figura 4-18).

Figura 4-18: Determinación del tiempo de vida útil sensorial a 5ºC de kumis con inclusión de 5% de polen fermentado con intervalos de confianza del 95%



Los tiempos de vida útil encontrados en condiciones de refrigeración para los productos con inclusión de 5% de polen fermentado, de 23 días para el yogur y 22 días para el kumis, está en concordancia con bebidas lácteas fermentadas saborizados con diferentes matrices vegetales que reportan en literatura científica duraciones entre 18 y 31 días de almacenamiento bajo condiciones similares (Al-Kadamany *et al.*, 2003; Cruz

et al., 2010; Curia *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2016; Mataragas *et al.*, 2011; Supavititpatana & Wirjantoro, 2010)

4.5.1 Modelamiento de la vida útil bajo condiciones aceleradas

El establecimiento de constantes cinéticas y modelos matemáticos de deterioro fisicoquímico que permitan predecir la vida útil de los productos desarrollados se basó en el seguimiento del pH, la acidez titulable (expresada como porcentaje de ácido láctico) y el conteo en capa profunda de mohos y levaduras. Se aclara que también se realizó seguimiento de coliformes totales en los productos, pero no se presentó crecimiento de estos microorganismos de forma tal que permitiría realizar un modelamiento como factor de deterioro. Los resultados del seguimiento realizado en función del tiempo de almacenamiento para el yogur con inclusión de polen fermentado se resume en la Tabla 4-9.

Tabla 4-9: Seguimiento de pH y acidez titulable (%ácido láctico) en yogur con inclusión de 5% de polen fermentado

Temperatura (ºC)	Tiempo (días)	pH	Acidez (% ácido láctico)	Mohos y levaduras (UFC/g)
5	0	4,267±0,021 [a]	1,025±0,018 [a]	10±5 [a]
	7	4,225±0,018 [a]	1,031±0,025 [a]	80±54 [a]
	14	4,176±0,042 [a]	1,021±0,017 [a]	15±7 [a]
	21	4,239±0,077 [a]	1,034±0,019 [a]	200±41 [a]
	27	4,202±0,019 [a]	1,064±0,033 [a]	500±111 [a]
	33	4,198±0,057 [a]	1,107±0,092 [a]	1200±141 [a]
	38	4,278±0,028 [a]	1,114±0,109 [a]	2950±71 [a]
	42	4,286±0,023 [a]	1,111±0,247 [a]	8850±415 [a]
	Valor-p	*0,181*	*0,737*	*0,046*
20	0	4,234±0,041 [a]	1,030±0,011 [a]	< 3 [a]
	3	4,232±0,017 [a]	1,137±0,092 [a]	27±13 [a]
	7	4,198±0,001 [a]	1,209±0,032 [a]	42±24 [a]
	10	4,197±0,004 [a]	1,198±0,008 [a]	117±52 [a]
	13	4,119±0,004 [a]	1,209±0,015 [a]	4350±98 [a]
	15	4,153±0,011 [a]	1,223±0,028 [a]	4850±134 [a]
	16	4,109±0,099 [a]	1,211±0,017 [a]	6700±99 [a]
	20	4,171±0,001 [a]	1,440±0,361 [a]	8200±566 [a]
	Valor-p	*0,060*	*0,407*	*0,049*

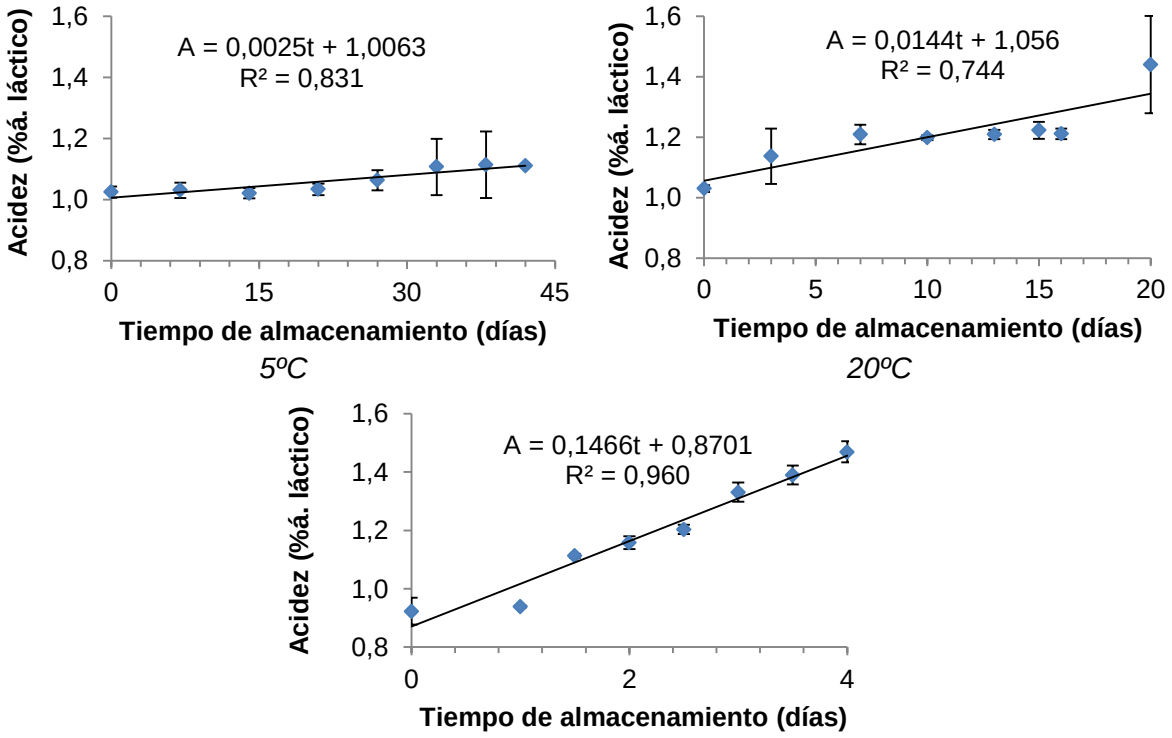
35	0	4,383±0,040 [a]	0,923±0,046 [a]	< 3 [a]
	1	4,386±0,033 [a]	0,939±0,004 [a]	< 3 [a]
	1,5	4,268±0,003 [a]	1,113±0,007 [a]	< 3 [a]
	2	4,189±0,029 [a]	1,158±0,022 [a]	< 3 [a]
	2,5	4,168±0,061 [a]	1,203±0,016 [a]	< 3 [a]
	3	4,157±0,011 [a]	1,331±0,033 [a]	< 3 [a]
	3,5	4,149±0,008 [a]	1,390±0,032 [a]	15±7 [a]
	4	4,142±0,003 [a]	1,469±0,036 [a]	35±21 [a]
	Valor-p	*0,081*	*0,041*	*0,038*

Promedios en la misma columna y una misma temperatura con la misma letra (superíndice) indican que no existe diferencias significativas mediante prueba de Kruskal-wallis, α=0,05. $X \pm DS$, n=3

A nivel fisicoquímico se estableció la acidez como factor de deterioro; la variable pH no tuvo un tendencia clara en función del tiempo de almacenamiento. Al modelar este factor por medio de modelos cinéticos de orden cero, uno y dos (Ec. 2.1), el mejor ajuste se obtuvo para una cinética de orden cero como se muestra en la Figura 4-19, con las constantes cinéticas que se resumen en la

Tabla **4-10**.

Figura 4-19: Ajuste de la acidez como factor de deterioro fisicoquímico en yogur desarrollado a 5, 20 y 35ºC.



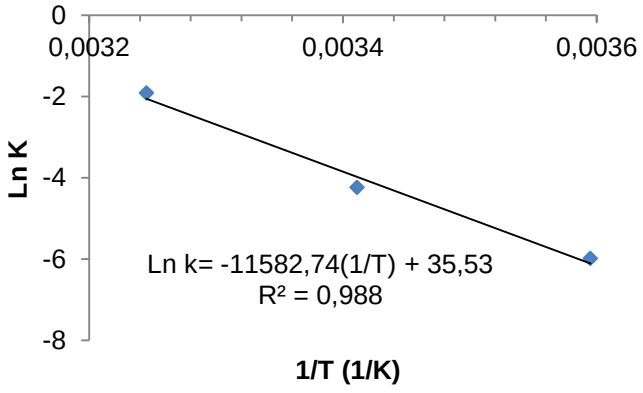
35ºC

Tabla 4-10: Constantes de reacción en función de la temperatura en cinética de deterioro fisicoquímico de yogur con inclusión de polen apícola fermentado.

Temperatura (K)	Constante de reacción (%acidez/día)
278	0,0025
293	0,0144
308	0,1466

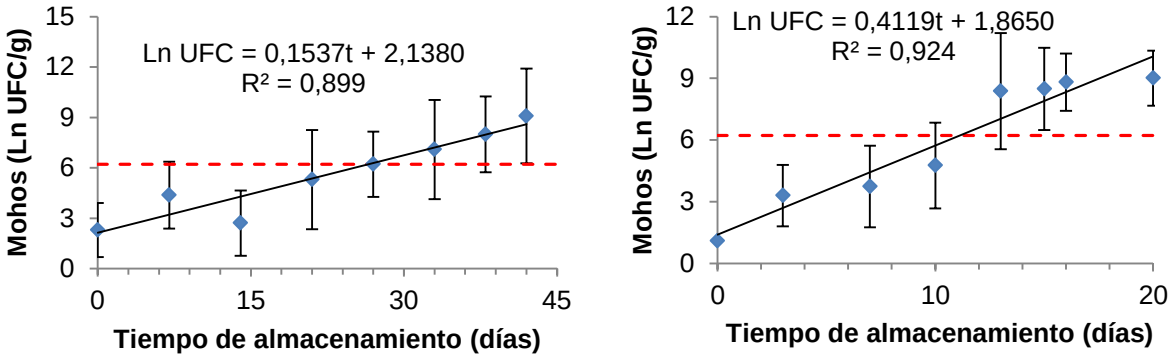
Linealizando la expresión de Arrhenius dada por la Ec. 2.2. y graficando las constantes de reacción de deterioro en función de la temperatura (Figura 4-20), se obtiene para la cinética de deterioro fisicoquímico del yogur que la energía de activación fue de 96,30 kJ/mol. Dicho valor esta en concordancia con otras publicaciones donde se ha modelado el tiempo de vida útil de yogures con adición de oligofructosa con la acidez titulable como factor de deterioro (E_a=74,8 kJ/mol) (Gualdron & González, 2013), resulta ser más estable que un yogurt base modelado a partir del análisis sensorial hedónico como factor de deterioro (E_a=46,9 kJ/mol) (Al-Kadamany *et al.*, 2003) y menos estable frente a cambios de temperatura que un yogurt con inclusión de frutas donde el crecimiento de mohos y levaduras fuera el parámetro de modelamiento (E_a=214,8 kJ/mol) (Mataragas *et al.*, 2011)

Figura 4-20: Ajuste lineal del modelo de Arrhenius de la cinética de deterioro fisicoquímico de yogur



El deterioro microbiológico del yogur bajo las mismas condiciones de almacenamiento tuvo un comportamiento exponencial, ajustándose a una cinética de reacción de primer orden a 5 y 20ºC que supera el límite máximo establecido en la normatividad (Figura 4-21) tras 27 y 10,6 días respectivamente. Como se puede observar en la Tabla 4-9, el producto a 35ºC no tuvo crecimiento de mohos en el periodo evaluado. Se podría pensar que a altas temperaturas no se ve favorecido el crecimiento de mohos y levaduras, teniendo en cuenta que son microorganismos mesófilos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 15 y 30ºC (Madigan *et al.*, 2010). Otra hipótesis es que la fase *lag* a esta temperatura sea de 3,5 horas, tiempos después del cual se empieza a tener un crecimiento de estos microorganismos.

Figura 4-21: Ajuste del crecimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en yogur a 5 y 20ºC respecto a límite normativo (línea roja)



5ºC *20ºC*

Dado que a nivel microbiológico solo fue posible obtener dos constantes de reacción no es posible modelar la dependencia de la cinética de reacción en función de la temperatura por medio de la ecuación de Arrhenius. Expresando la dependencia de la cinética de reacción con la temperatura por medio del térmico Q_{15}, se tiene que:

$$Q_{15} = \frac{k|_{20°C}}{k|_{5°C}} = \frac{0{,}4119\ Ln\ (mohos)/día}{0{,}1537\ Ln(mohos)/día} = 2{,}68 \qquad (4.1)$$

Luego se podría estimar el tiempo de vida útil del producto a una temperatura mayor, por ejemplo 35ºC, dado que la velocidad de reacción es inversamente proporcional al tiempo. Dado que el límite máximo permisible de mohos y levaduras para bebidas lácteas

fermentadas esta dado en la normatividad como 500 UFC/g, en la Figura 4-19 se puede fijar el tiempo de vida útil microbiológico del producto almacenado a 20ºC en 10,6 días. Luego a partir de la Ec. 2.4 se tiene que la vida útil del producto estimada a 35ºC está dada por:

$$t_{vida\ util}|_{35°C} = \frac{t_{vida\ util}|_{20°C}}{Q_{15}} = \frac{10{,}6\ días}{2{,}68} = 4{,}0\ días \tag{4.2}$$

En cuanto al estudio de vida útil del kumis con inclusión de 5% de polen apícola, el seguimiento de variables fisicoquímicas y microbiológicas se resumen en la Tabla 4-11.

Tabla 4-11: Seguimiento de pH y acidez titulable (%ácido láctico) en kumis con inclusión de 5% de polen fermentado

Temperatura (ºC)	Tiempo (días)	pH	Acidez (% ácido láctico)	Mohos y levaduras (UFC/g)
5	0	4,271±0,026 [a]	1,060±0,029 [a]	20±12 [a]
	7	4,148±0,104 [a]	1,059±0,008 [a]	100±69 [a]
	14	4,236±0,037 [a]	1,076±0,021 [a]	130±24 [a]
	21	4,004±0,012 [a]	1,079±0,006 [a]	200±59 [a]
	27	4,072±0,114 [a]	1,107±0,028 [a]	350±35 [a]
	33	4,225±0,011 [a]	1,103±0,008 [a]	800±71 [a]
	38	4,25±0,006 [a]	1,155±0,050 [a]	9000±283 [a]
	42	4,145±0,099 [a]	1,180±0,169 [a]	12500±707 [a]
	Valor-p	0,113	0,262	0,064
20	0	4,335±0,037 [a]	0,972±0,035 [a]	< 3
	3	4,312±0,025 [a]	1,008±0,027 [a]	100±15 [a]
	7	4,269±0,050 [a]	1,076±0,053 [a]	130±0 [a]
	10	4,250±0,028 [a]	1,110±0,046 [a]	150±71 [a]
	13	4,197±0,024 [a]	1,094±0,025 [a]	2750±354 [a]
	15	4,203±0,065 [a]	1,126±0,095 [a]	3950±212 [a]
	16	4,222±0,014 [a]	1,102±0,043 [a]	14150±1485 [a]
	20	4,266±0,045 [a]	1,177±0,003 [a]	202500±2121 [a]
	Valor-p	0,060	0,147	0,045
35	0	4,490±0,005 [a]	0,862±0,023 [a]	< 3
	1	4,383±0,037 [a]	0,930±0,016 [a]	< 3
	1,5	4,281±0,034 [a]	1,098±0,029 [a]	< 3
	2	4,144±0,130 [a]	1,153±0,024 [a]	< 3
	2,5	4,282±0,190 [a]	1,183±0,007 [a]	< 3

	3	4,128±0,074 [a]	1,321±0,029 [a]	< 3
	3,5	4,162±0,005 [a]	1,373±0,007 [a]	10±5 [a]
	4	4,045±0,004 [a]	1,468±0,007 [a]	65±49 [a]
	Valor-p	0,102	0,038	0,082

Promedios en la misma columna y una misma temperatura con la misma letra (superíndice) indican que no existe diferencias significativas mediante prueba de Kruskal-wallis, α=0,05. $X \pm DS$, n=3

De manera análoga para modelar la cinética de deterioro fisicoquímico del kumis a partir de la acidez titulable, el mejor ajuste se obtuvo para una reacción de orden cero para las tres temperaturas trabajadas (Figura 4-22), mientras que el deterioro microbiológico se ajustó a una cinética de primer orden para el almacenamiento a 5 y 20ºC (Figura 4-23).

Figura 4-22: Modelamiento de acidez como factor de deterioro fisicoquímico en kumis desarrollado en función de la temperatura de almacenamiento

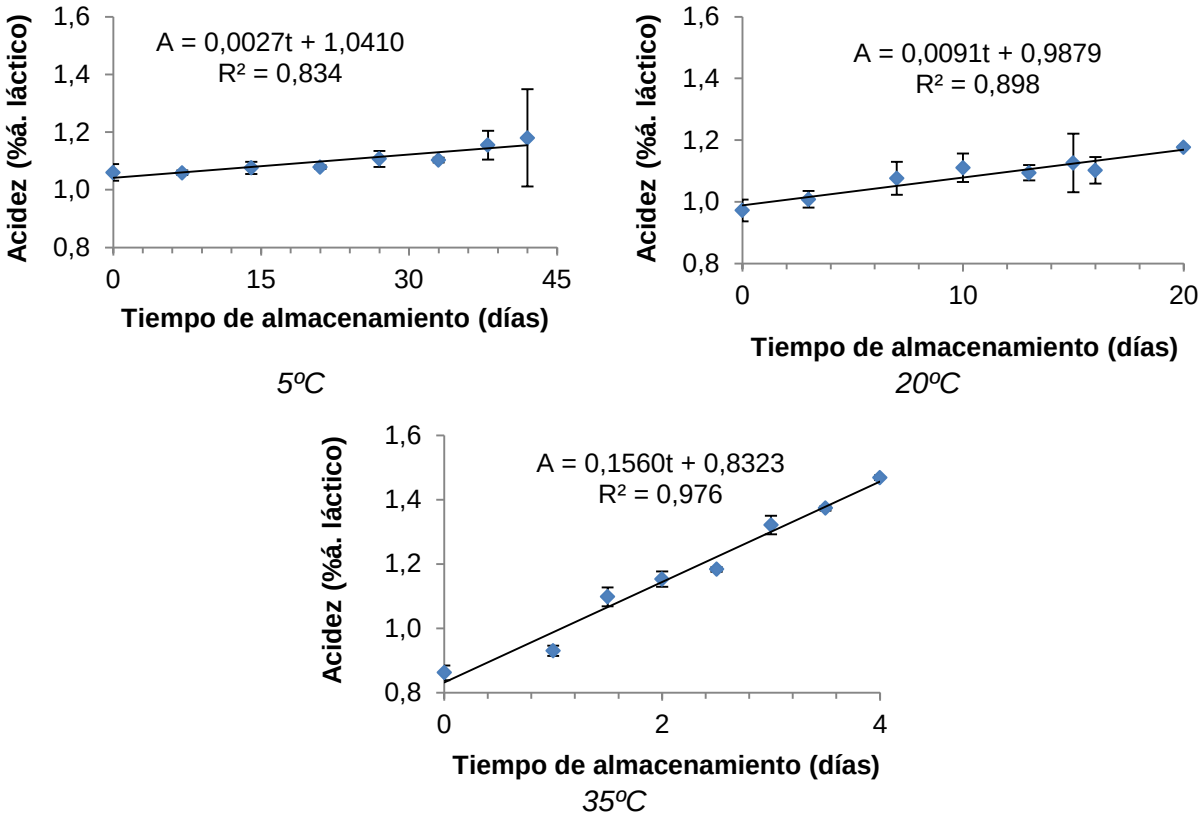
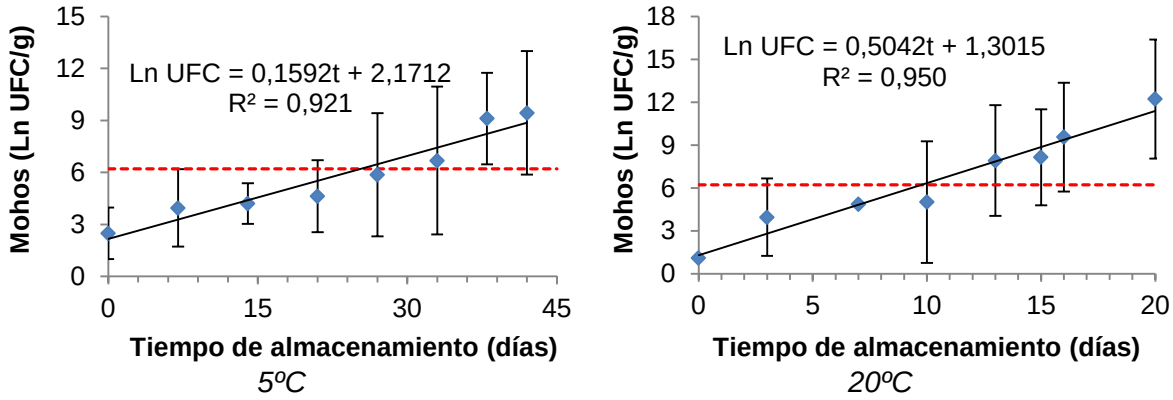


Figura 4-23: Ajuste del crecimiento de mohos y levaduras como factor de deterioro microbiológico en yogur a 5 y 20ºC respecto a límite normativo (línea roja)



En así que para el deterioro fisicoquímico del kumis las constantes cinéticas a las tres temperaturas de almacenamiento trabajadas se muestran en la Tabla 4-12 y se ajustan al modelo de Arrhenius linealizado en la Figura 4-24 con una energía de activación de 95,62 kJ/mol.

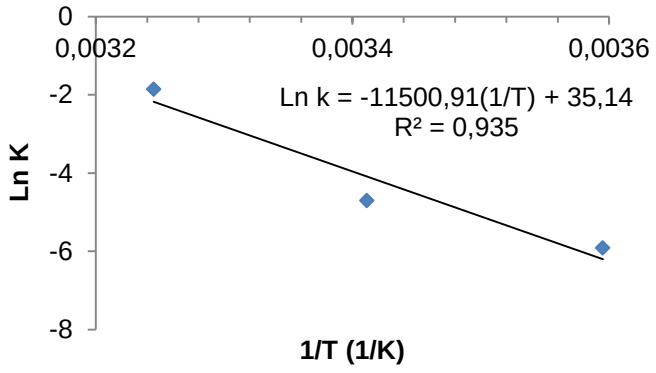
Tabla 4-12: Constantes de reacción en función de la temperatura en cinética de deterioro fisicoquímico de kumis con inclusión de polen apícola fermentado.

Temperatura (K)	Constante de reacción (%acidez/día)
278,15	0,0027
293,15	0,0091
308,15	0,1560

Es claro que los procesos de acidificación, al igual que en el almacenamiento de yogur, se ven favorecidos a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento y por lo tanto la constante de la reacción. Este comportamiento era de esperarse dado que a medida que aumentamos la temperatura de trabajo, nos acercamos a las condiciones óptimas de incubación de las bacterias ácido lácticas presentes en la bebida.

Dado que no existe un límite máximo permisible para la acidez en bebidas lácteas fermentadas que nos permita establecer un tiempo de vida útil únicamente a partir de esta variable, la determinación debe realizarse correlacionando otras variables.

Figura 4-24: Ajuste lineal del modelo de Arrhenius de la cinética de deterioro fisicoquímico de kumis



A nivel microbiológico el producto es apto para su consumo en un periodo de 23,52 días (a 5ºC) y 9,52 días (a 20ºC) cuando el producto cuenta con una acidez titulable de 1,104% y 1,073%, respectivamente. De esta manera, se puede predecir el tiempo de vida útil de los productos a partir del ajuste de los datos experimentales (ver Figura 4-22) y la acidez inicial (A_0, expresada como %ácido láctico) de acuerdo a la Ec. 4.3 y la Ec. 4.4 cuando el producto se almacena a 5ºC y 20ºC respectivamente.

$$t_{util}|_{5°C}(días) = \frac{1{,}104 - A_O}{0{,}0027} \tag{4.3}$$

$$t_{util}|_{20°C}(días) = \frac{1{,}073 - A_O}{0{,}0091} \tag{4.4}$$

Otra alternativa sería conocer el tiempo de vida útil del producto a una temperatura de almacenamiento diferente. Bajo el supuesto que se desee conocer cuál sería la vida útil del kumis al dejarlo a temperatura ambiente promedio de la ciudad de Bogotá (14ºC o 287,15 K), se podría estimar la constante de reacción (*k*) de acuerdo al modelo linealizado de Arrhenius como sigue :

$$Ln(k) = -11500{,}9141\left(\frac{1}{287{,}15\ K}\right) + 35{,}1423 = -4{,}91 \quad \therefore \quad k|_{14°C} = 0{,}0074\frac{\%acidez}{día} \tag{4.5}$$

Relacionando la constante de reacción calculada teóricamente con una constante de reacción calculada experimentalmente por medio del parámetro *Q* tenemos que:

$$Q_6 = \frac{k|_{20°C}}{k|_{14°C}} = \frac{0{,}0091\ \%acidez/día}{0{,}0074\ \%acidez/día} = 1{,}23$$

Luego el tiempo de vida estaría dado por:

$$t_{vida\ util}|_{14°C} = Q_6 * t_{vida\ util}|_{20°C} = 9{,}52 * 1{,}23 = 11{,}7\ días \quad (4.6)$$

5. Ficha técnica de elaboración de bebidas lácteas fermentadas con inclusión de polen fermentado.

ANTECEDENTES.

Las tendencias observadas en el consumidor actual están orientadas a la obtención de nuevos productos que aporten a una vida más saludable, razón por la cual alimentos de alto valor nutricional o que reporten propiedades bioactivas cobran fuerza. De estos productos cabe destacar los productos lácteos fermentados (queso, yogur, kumis) y los cereales que reportan propiedades benéficas para combatir enfermedades cardiovasculares, ciertos tipos de cáncer, alergias, problemas intestinales, entre otros (Branco *et al.*, 2014).

El polen apícola, “alimento producido a partir de la aglutinación del polen de las flores efectuado por abejas pecoreadoras mediante néctar y sus propias sustancias salivares, que el hombre utiliza tras su recolección en los cazapolenes y subsiguiente elaboración (secado, limpieza y envasado)” (Peris, 1984, citado por Baldi Coronel, Dall’Oglio, Lezcano, Berna, & Yañez, 1999), reporta en literatura no científica infinidad de efectos y amplios beneficios derivados de su consumo. Entre ellos cabe destacar el mejoramiento del sistema digestivo, en el rendimiento de atletas, de la vitalidad, en el apetito, en el contenido de hemoglobina y como afrodisiaco. También se le atribuyen efectos positivos en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, resfriados, acné, anemia y de desórdenes nerviosos y endocrinos (Krell, 1996). En cuanto a composición, se ha reportado en diversos estudios la calidad nutricional del polen, como excelente fuente de proteína, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Fuenmayor *et al.*, 2014; Herbert & Shimanuki, 1978).

La literatura correspondiente a la adición de polen fermentado en bebidas lácteas fermentadas es prácticamente nula, ya que no se tenía un procedimiento estandarizado claro para la obtención del polen en condiciones estables tras un proceso fermentativo. Sin embargo, se ha reportado la adición de polen apícola seco o fresco en este tipo de matrices.

En el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá se ha desarrollado la inclusión de polen en diversas matrices como pulpas, salsas de frutas, barras con cereal y bebidas fermentadas de soya y leche semidescremada (Longo Ordoñez, 2012, 2013). A excepción de las bebidas fermentadas de soya y leche semidescremada, ninguno de estos alimentos tiene un efecto probiótico en humanos, como lo tienen las bebidas lácteas fermentadas (Lomova, Narizhnyi, *et al.*, 2014).

Se reportan en la literatura estudios donde se evaluaron características fisicoquímicas y microbiológicas de yogures producidos con cultivos probióticos (*Bifidobacterium sp.)* saborizados con miel y con la adición de polen en proporciones de 0%, 2,5%, 5%, 7,5% y 10%, obteniendo un producto de características reológicas propias de este tipo de matrices, además de cumplir con la normatividad brasilera referente a bebidas lácteas fermentadas (Branco *et al.*, 2014).

Lomova y colaboradores han estudiado el efecto de la inclusión de productos apícolas, como fuente natural de componentes bioactivos, sobre la consistencia y la acidez de yogur, obteniendo un producto aceptable bajo los parámetros de estudio con la adición de 5% de miel de acacia, 0,2% de jalea real congelada y 0,15% de polen molido (tamaño de partícula 5 – 10 µm) (Lomova, Snezhko, *et al.*, 2014). También se evaluó la inclusión de polen seco molido con diferentes contenidos de humedad (2%, 4%, 6%, 8% y 10%) tratado con lámparas de luz UV como tratamiento antimicrobiano que aseguró la calidad microbiológica del producto final (Lomova *et al.*, 2014).

Pop y colaboradores han investigado el efecto de la inclusión de polen, semillas de chía y arándanos en las características físicas y probióticas del yogur, concluyendo que la

adición de polen (1%) y arándanos mejoran la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas en el periodo de vida útil del producto (Pop *et al.*, 2014).

Yerlikaya estudió el efecto de suplementar bebidas lácteas fermentadas con polen comercial proveniente de Turquía, sobre las propiedades antimicrobianas, químicas, reológicas, sensoriales y la viabilidad de cultivos probióticos. Para tal fin estudió la adición de polen en concentraciones de 2,5, 5, 7,5, 10 y 20 mg/mL, detectando inhibición en el crecimiento de *S. thyphimurium* y *E. coli* cuando se trabajó con concentraciones de polen superiores a 10 mg/mL. En términos generales se encontró un efecto positivo sobre las características fisicoquímicas del producto y sobre la viabilidad de cultivos probióticos, aunque con un efecto negativo en su aceptación (Yerlikaya, 2014). Igualmente Rosero y Herrera estudiaron el efecto de la inclusión de miel y polen seco en las características físicas, químicas y sensoriales de yogur natural batido (Chacún & Herrera, 2010).

En China se ha patentado una metodología para producir un yogur funcional con adición de polen apícola entre 0,1% y 2% del peso total y un contenido de microrganismos probióticos de 10^6 – 10^9 UFC/mL. En dicho procedimiento se asegura obtener un yogur con una composición nutricional y una vida útil superior comparada con la composición nutricional y vida útil respectivamente de yogures tradicionales. El procedimiento patentado afirma que el producto obtenido tiene un sabor agradable y un gran valor agregado (Wang *et al.*, 2015).

Aunque actualmente se utiliza el polen fresco o seco como ingrediente en diversas preparaciones, las ventajas de buscar un producto con inclusión de polen fermentado, radica en la asimilación de los nutrientes del polen por parte del ser humano (Herbert & Shimanuki, 1978), ya que en el polen fresco algunos de sus nutrientes no pueden ser aprovechados al ser ingeridos, particularmente en el caso de animales monogástricos, debido principalmente a la resistente microestructura que recubre las partículas de polen para proteger la célula generativa, conocida como exina (Quicazán, Parra, & Tobón, 1990, Bell *et al.*, 1983, Human & Nicolson, 2006, Fernandes-Da Silva & Serrao, 2000 citados por Fuenmayor, Quicazán, & Figueroa, 2011).

ALCANCE

El presente documento establece las condiciones del proceso de elaboración, control de calidad y condiciones de almacenamiento de yogur y kumis entero con inclusión del 5% de polen apícola fermentado.

FUNDAMENTO TEÓRICO.

- **Fermentación.**

El término fermentación denota la propagación de microorganismos y la generación de productos bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. La secreción de metabolitos desde el interior de las células microbianas al medio circundante y su acumulación se produce como consecuencia de la oxidación de monosacáridos, particularmente glucosa, tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Mosier & Ladisch, 2009).

Como técnica, la fermentación se desarrolló para conservar los alimentos con un bajo requerimiento energético anterior al desarrollo de otras técnicas de conservación como la refrigeración, congelación y enlatado. Los ejemplos más extendidos de ésta han sido el uso de bacterias del ácido láctico para reducir el pH y el empleo de levaduras para efectuar fermentaciones alcohólicas (Bamforth, 2008).

En el área de la ciencia y tecnología de alimentos, se han definido los alimentos fermentados como “aquellos alimentos que han sido sometidos a la acción de microorganismos o enzimas para que generen cambios bioquímicos deseables y una modificación significativa en el alimento”. Los procesos pueden hacer los alimentos más nutritivos o digeribles, más seguros o desarrollar sus características sensoriales (Bamforth, 2008).

- **Fermentación láctica.**

Se entiende por fermentación láctica al bioproceso llevado por bacterias ácido-lácticas donde la energía celular se deriva de la fermentación de carbohidratos para producir ácido láctico principalmente. Para ello, llevan a cabo dos posibles rutas: fermentación homoláctica sí produce lactato como producto mayoritario a partir de la degradación de

glucosa y fermentación heteroláctica sí produce cantidades aproximadamente equimolares de lactato, etanol / acetato, y dióxido de carbono a partir de glucosa.

Las bacterias ácido-lácticas se caracterizan por generar un efecto inhibitorio a otros microorganismos y ésta es la base para mantener la calidad y seguridad de gran variedad de productos alimenticios. Los principales factores que contribuyen a esta inhibición son: bajo pH y producción de bacteriocinas, etanol y diacetilo (Adams & Moss, 2000).

- **Bebidas lácteas fermentadas.**

Se entiende por bebida láctea fermentada al producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en su composición, por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación (FAO, 2003).

Ciertas leches fermentadas se caracterizan por un cultivo específico (o cultivos específicos) utilizado en la fermentación, aunque esto no implica que se puedan emplear otros microrganismos en el proceso.

Yogur

Se denomina yogur al producto lácteo pasteurizado obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* a partir de leche entera, semidescremada o descremada fortificada o no con sólidos de leche. Pueden contener compuestos prebióticos (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, 2006) al igual que bacterias vivas benéficas, que al ser ingeridas favorecen la protección de la microflora intestinal (cultivos probióticos) como *L. casei, L. acidophilus, Bifidobacterium spp.,* etc. (ICONTEC, 2005). Se utiliza leche de cabra, de oveja o de yegua como materia prima, aunque en el país el más extendido es el fabricado a partir de leche de vaca.

Kumis

El kumis, producto de origen ruso utilizado en gran medida en ese país con fines terapéuticos se produce con una fermentación ácida y alcohólica combinada,

tradicionalmente a partir de leche de yegua aunque también se utiliza leche de vaca. La fermentación se lleva a cabo con una combinación de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y levaduras que fermentan la lactosa. El producto final contiene 1,0-1,8% de ácido láctico, 1,0-2,5% de etanol y dióxido de carbono. Este último hace del kumis tradicional un producto espumoso (Fernandes, 2009; Marth & Steele, 2001).

PROCESO DE ELABORACIÓN

- **Materias primas**

A continuación se realiza una descripción de cada una de las materias primas involucradas en la elaboración de yogur y kumis con inclusión de polen fermentado, acompañada de los requisitos fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales según aplique para cada una.

Polen apícola

"El polen apícola es el resultado de la aglutinación del polen de las flores efectuado por las abejas pecoreadoras mediante néctar y sus propias sustancias salivares, que el hombre utiliza tras su recolección en los cazapolenes y subsiguiente elaboración (secado, limpieza y envasado)" (Peris, 1984, citado por Baldi Coronel *et al.*, 1999).

Para efectos del presente desarrollo, se empleará polen apícola libre de cualquier tipo de impureza macroscópica (ramas, partes vegetales, larvas, insectos, fibras sintéticas), seco (contenido de humedad menor al 6%) y sin signos evidentes de deterioro microbiológico.

Leche pasteurizada

Se entiende por leche pasteurizada al producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo o discontinuo, aplicado a la leche cruda o a la termizada, para destruir su flora patógena sin alterar su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas. Para efectos del presente desarrollo, se puede emplear cualquier tipo de leche entera pasteurizada que cumpla con los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos del decreto 616 de 2006 (Ministerio de la Protección Social, 2012).

Agua potable.

Toda el agua involucrada en el proceso de producción del yogur y del kumis con inclusión de polen fermentado debe ser apta para el consumo humano, de modo que no se comprometa la inocuidad ni el valor nutricional del producto terminado.

Para efectos del presente desarrollo, el agua a utilizar en la elaboración debe cumplir con todos los requisitos físicos, químicos y microbiológicos según las condiciones y límites reglamentados en la Resolución 2115 de 2007 (Ministerio de la Protección Social y de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2007).

Azúcar.

Se entiende por azúcar al producto sólido cristalizado constituido esencialmente por sacarosa (99,5% min.), obtenido mediante procedimientos industriales apropiados y que no ha sido sometido a proceso de refinación, que cumpla con los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos establecidos en la NTC 611 (ICONTEC, 2004b). En el presente desarrollo, el azúcar será utilizada para ajustar el contenido de carbohidratos totales a 9% en el producto terminado.

Hidróxido de sodio.

El hidróxido de sodio (NaOH) está relacionado con el proceso de neutralización de la mezcla agua:polen hasta lograr un pH cercano a 6,0, previa a la inoculación de los cultivos de bacterias acido-lácticas encargados de desarrollar la fermentación acido-láctica del polen.

En el presente desarrollo se trabajó con una solución estandarizada de NaOH 1 N para llevar a cabo la neutralización del sustrato agua: polen.

Cultivos de bacterias acido-lácticas.

Se empleara cultivo mixto liofilizado CHOOZIT MY800 LYO (Danisco, Dinamarca) recomendado para la producción de yogures altamente viscosos, compuesto por una mezcla de cepas seleccionadas (*S. thermophilus, L. delbrueckii subsp. lactis y L. delbrueckii subsp. bulgaricus)* y cultivo mixto liofilizado CHOOZIT MA4001 LYO 5DCU (*L.*

lactis subsp. lactis, L. lactis subsp. cremoris, L. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis, S. thermophilus) recomendado para la producción de kumis.

- **Descripción del proceso de elaboración.**

El proceso de elaboración de yogur o kumis con inclusión de polen fermentado consta de tres etapas de producción: obtención del polen fermentado, elaboración de la bebida láctea fermentada (yogur o kumis) e inclusión del polen fermentado en la bebida láctea fermentada.

A continuación se describen cada una de las etapas de producción para la obtención de yogur o kumis con inclusión de un 5% de polen apícola fermentado con bacterias acido-lácticas viables.

Dado que se trata de un proceso que se enmarca en el procesamiento de alimentos, todos los equipos y utensilios nombrados involucrados deben estar en excelente condiciones de limpieza. Posteriormente se debe realizar una desinfección de utensilios tales como cucharones, recipientes y termómetros por inmersión en una disolución de cualquier desinfectante comercial o en agua hirviendo y dejando actuar por un periodo de 10 a 15 minutos; enjuagar con abundante agua para eliminar cualquier resto de desinfectante que pueda tener efectos negativos sobre los procesos fermentativos.

Elaboración de polen fermentado.

En la obtención del polen fermentado se requiere de los siguientes equipos y utensilios:

- Olla a presión doméstica
- Báscula
- Balanza analítica
- Termómetro digital de punzón
- Estufa
- Baño termostático sin agitación.
- Cucharón o espátula de acero inoxidable
- Recipiente para fermentación con tapa (puede ser en acero inoxidable, material plástico o vidrio grado alimenticio)

Fijando una cantidad de polen apícola seco y limpio (m_{polen} en gramos) como base de cálculo se procede como sigue:

1) Pesar la cantidad de polen apícola fijada (m_{polen}) en olla a presión limpia y desinfectada.
2) Adicionar un peso equivalente de agua potable al recipiente donde se tiene el polen apícola y mezclar con ayuda de un cucharon, espátula o cualquier utensilio equivalente hasta lograr una mezcla homogénea.
3) Neutralizar la mezcla resultante adicionando NaOH 1 N estandarizado hasta lograr un pH de 6,0 ± 0,1. Anotar el volumen de hidróxido de sodio adicionado (V_{NaOH}).
4) Adicionar agua potable a la mezcla agua:polen neutralizada de modo que se obtenga una relación final agua: polen de 2:1: La cantidad de agua potable a adicionar se calcula como:

$$Agua\ potable\ adicional\ (g) = m_{polen} - 0{,}04 * V_{NaOH}$$

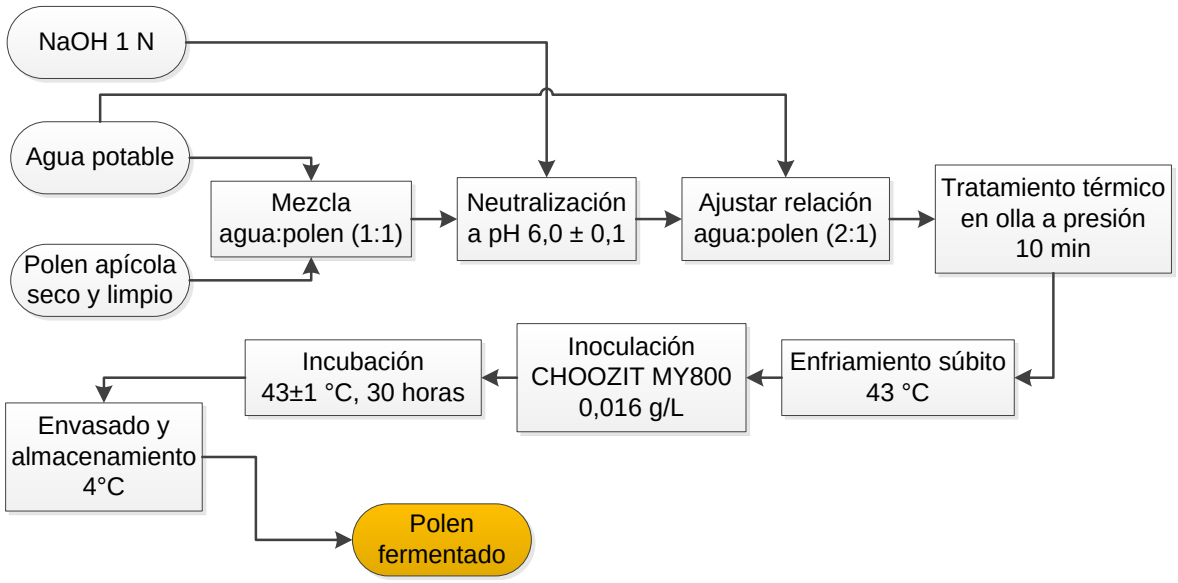
Donde m_{polen} es la cantidad de polen pesado (g) en el numeral 1) y V_{NaOH} el volumen de NaOH 1 N (mL) adicionado en el numeral 3).

5) Colocar la tapa a la olla a presión y calentar en estufa hasta observar la primera liberación de vapor. Colocar la fuente de calentamiento en bajo/mínimo y dejar reposar durante 10 minutos.
6) Liberar la presión remanente en la olla a presión, quitar la tapa y enfriar súbitamente la mezcla agua:polen hasta 43°C por inmersión de la olla en agua con hielo (0 – 4 ° C).
7) Adicionar 0,016 g del cultivo CHOOZIT MY800 por cada litro de mezcla y homogenizar con ayuda de un cucharon, espátula o cualquier utensilio equivalente. Previa a la adición del cultivo, éste debe estar a temperatura ambiente.
8) Envasar la mezcla agua-polen neutralizada, tratada térmicamente e inoculada en recipientes de fermentación y tapar.

9) Ubicar los recipientes de fermentación en baño termostático a 42±1 °C durante 30 horas sin efectuar agitación del producto
10) Retirar los recipientes de fermentación del baño termostático, dejar enfriar a temperatura ambiente y almacenar en condiciones de refrigeración (4 °C).

En la Figura 5-1 se resume a modo de diagrama de flujo el proceso de elaboración de polen fermentado.

Figura 5-1: Diagrama de flujo para la elaboración de polen fermentado.



Elaboración de bebida láctea fermentada (yogur o kumis).

El proceso de elaboración de yogur o kumis aquí presentado parte de leche de vaca entera pasteurizada comercial. En el proceso descrito a continuación, se requiere de los siguientes equipos y utensilios.

- Recipiente en acero inoxidable
- Báscula
- Balanza analítica
- Termómetro digital
- Estufa

- Baño termostático sin agitación.
- Cucharón o espátula de acero inoxidable
- Recipiente para fermentación con tapa (puede ser en acero inoxidable, material plástico o vidrio grado alimenticio)

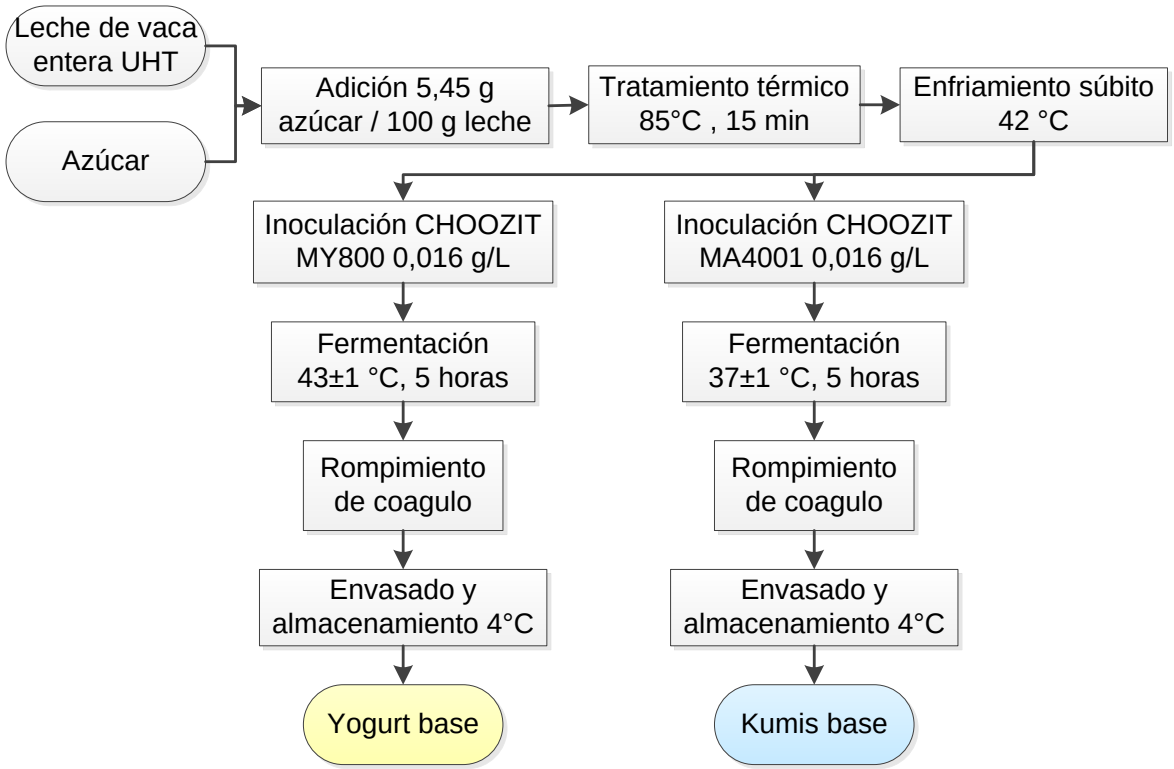
Fijando como base de cálculo la cantidad de leche utilizada para la producción de yogur (m_{leche} en gramos) se procede como sigue:

1) Pesar la cantidad de leche fijada (m_{leche}) en un recipiente de acero inoxidable limpio e higienizado
2) Pesar y adicionar 5,45 g de azúcar blanca comercial por cada 100 g de leche pesada en el numeral 1). Mezclar con ayuda de un cucharon, espátula o cualquier utensilio equivalente hasta lograr una mezcla homogénea.
3) Aplicar tratamiento térmico a la mezcla de leche con azúcar a 85°C durante 15 minutos y enfriar súbitamente a 43 °C
4) Inocular la mezcla con 0,016 g/L del cultivo mixto comercial CHOOZIT MY800 y homogenizar con ayuda de un cucharon, espátula o cualquier utensilio equivalente limpio y desinfectado.
5) Incubar a 42°C ± 1 °C durante 5 horas
6) Romper el coagulo generado en el proceso fermentativo mediante agitación suave y continua hasta la desaparición de grumos. El producto obtenido corresponde al yogur base.
7) Dejar enfriar lentamente el yogur y almacenar en condiciones de refrigeración (4°C).

De manera análoga se da la producción del kumis, cambiando el cultivo láctico inoculado (CHOOZIT MA4001) y la temperatura a la cual se da el proceso fermentativo (37±1ºC).

El diagrama de flujo relacionado a la elaboración del yogur y kumis base, se muestra en la Figura 5-2.

Figura 5-2: Diagrama de flujo para la elaboración de yogur o kumis base.



Inclusión de polen fermentado en bebida láctea fermentada.

Esta fase del procedimiento corresponde a la inclusión de 5% del polen fermentado en las bebidas lácteas fermentadas base. Para tal fin, se toma como base de cálculo la cantidad de bebida láctea con inclusión de polen fermentado que se quiere obtener ($m_{producto}$) y se desarrolla el procedimiento descrito a continuación:

1. Determinar la cantidad de bebida láctea fermentada (kumis o yogur) y de polen fermentado como:

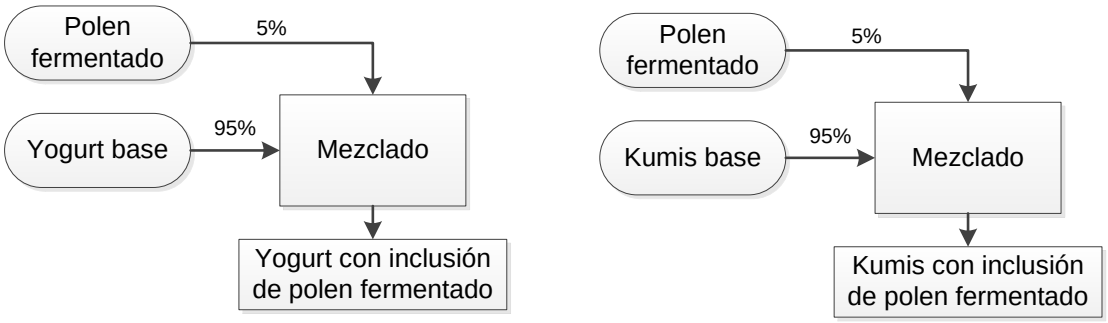
$$m_{bebida\ láctea\ fermentada} = 0{,}95 * m_{producto}$$

$$m_{polen\ fermentado} = 0{,}05 * m_{producto}$$

2. Adicionar las cantidades de bebida láctea fermentada y de polen fermentado calculados en el numeral 1) en un recipiente limpio e inocuo.
3. Mezclar de forma homogénea y continua hasta obtener el producto de interés.

En la Figura 5-3 se muestra el diagrama de flujo para la inclusión de polen fermentado en yogur y kumis.

Figura 5-3: Diagrama de flujo para la producción de yogur y kumis con inclusión de polen fermentado.



EMPACADO Y ALMACENAMIENTO DEL PRODUCTO.

Por disposición de la normatividad colombiana, los derivados lácteos higienizados, con destino al consumo público directo, deben distribuirse en envases de material atóxico, inalterables al contacto con el producto, de modo que eviten la contaminación externa y permitan la refrigeración, cuando sea del caso. Los envases para los derivados lácteos deberán garantizar la protección del producto y mantener las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas del mismo durante su vida útil (Ministerio de salud, 1986).

Se recomienda envasar o empacar productos derivados lácteos en plástico sanitario, cartón parafinado o encerado, cartón plastificado, vidrio, diferentes laminados de papel, aluminio y plástico (Tetrapack®), hojalata estañada o aluminio con laca sanitaria.

De acuerdo a los lineamientos dados y siguiendo las tendencias del mercado, los productos finalizados serán almacenados y distribuidos en recipientes de poliestireno (PS) con tapa hermética conservando la cadena de frio a temperatura de refrigeración (2 a 4°C), en su almacenamiento, transporte, distribución y comercialización.

Etiquetado.

De acuerdo a la Resolución 5109 de 2005, por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado que deben cumplir los alimentos envasados y materias primas de alimentos para consumo humano (Ministerio de la Protección Social, 2005), se presenta un modelo de etiqueta para el yogur con inclusión de polen apícola (Figura 5-4) y para el kumis con inclusión de polen apícola (En los productos desarrollados se recomienda establecer una fecha de vencimiento de 21 días siempre y cuando sea envasado en recipientes herméticos y se conserve la cadena de frio.

Figura 5-5).

Figura 5-4: Modelo de etiqueta para yogur con inclusión de polen apícola fermentado desarrollado.

En los productos desarrollados se recomienda establecer una fecha de vencimiento de 21 días siempre y cuando sea envasado en recipientes herméticos y se conserve la cadena de frio.

Figura 5-5: Modelo de etiqueta para kumis con inclusión de polen apícola fermentado desarrollado.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Se observó mejora en la calidad microbiológica del polen apícola suministrado por *Apiarios los cerezos* tras la implementación del sistema de beneficio sugerido en investigaciones anteriores. El polen de mayor calidad, tanto en impurezas como microbiológica, fue el que es limpiado únicamente por el separador de impurezas tipo ciclón.

- Los resultados encontrados en la caracterización de impurezas macroscópicas permitió generar una guía para determinar la calidad del polen a partir de estas análoga a la propuesta canadiense para la evaluación de granos y cereales.

- A pesar de las mejoras en el procesamiento del polen por parte del proveedor, es necesario la implementación de tratamientos para mejorar la calidad microbiológica del producto. El polen tratado térmicamente en recipiente presurizado (80 kPa) durante 10 minutos fue suficiente para reducir significativamente las cargas microbiológicas y alterar la morfología del grano antes de someterlo a procesos fermentativos.

- Las mejores condiciones fermentativas del polen inoculado con los cultivos lácticos comerciales CHOOZIT MY800 LYO, CHOOZIT MA4001 y HOWARU Dophilus, reflejadas en un mayor aumento de la acidez y mayor descenso de pH, se dieron para la matriz acondicionada con una relación másica final agua-polen de 2:1 en un medio neutralizado con NaOH 1N a pH 6,0. Las mayores acidificaciones se obtuvieron con el cultivo HOWARU Dophilus.

- Al realizar seguimiento cinético de las bacterias lácticas viables y producción de ácido láctico en los tratamientos con mejor rendimiento, se observó que el número de colonias viables iniciaba en 5,0±0,2 unidades logarítmicas por gramo y aumentaba hasta 6,6 en el cultivo HOWARU Dophilus, 7,8 en el cultivo MA4001 y 8,3 en el cultivo MY800, con un descenso marcado de las poblaciones después de 30 horas, posiblemente por la alta acidez del medio. Se estableció en 30 horas la duración de los procesos fermentativos de polen bajo las condiciones de trabajo.

- Al realizar la inclusión del polen fermentado con cada uno de los cultivos comerciales trabajados en bebidas lácteas fermentadas, se determinó que los productos con mayor potencial para un público general son el yogur y el kumis con inclusión del 5% de polen fermentado con cultivo CHOOZIT MY800. No se descartan otras mezclas con potencial similar dirigidas a nichos de mercado especializados, por ejemplo, vegetarianos y población de la tercera edad.

- La caracterización de los productos de mayor potencial muestran bebidas lácteas fermentadas que cumplen con los requisitos establecidos en la normatividad colombiana. Se destaca que los productos desarrollados no tienen colorantes, estabilizantes o conservantes añadidos y su aporte superior de compuestos bioactivos frente al producto base y frente a otras formulaciones de yogur con inclusiones de diversas matrices vegetales con reconocida capacidad antioxidante.

- La determinación del tiempo de vida útil de los productos desde el análisis sensorial ponderado de consumidores y panelistas entrenados permitió establecer una duración promedio de 23 días para el yogur y 22 días para el kumis desarrollado siempre y cuando se conserven en refrigeración (5ºC). El almacenamiento del producto a diferentes temperaturas (5, 20 y 35ºC) permitió establecer diferentes casos de estudio para el modelamiento y la predicción de la vida útil a diferentes temperaturas.

- El desarrollo logrado con esta investigación quedó resumida de forma sencilla y pedagógica a modo de ficha técnica, en aras de facilitar su difusión e implementación de la industria nacional en la pequeña y mediana escala.

6.2 Recomendaciones

En el desarrollo del trabajo surgen diversas posibilidades para continuar la investigación alrededor del polen fermentado. A continuación se enumeran algunas de ellas.

- Evaluar la factibilidad de utilizar el polen apícola fermentado como inóculo de la leche en los procesos productivos de bebidas lácteas fermentadas específicamente o como parte de otros procesos de fermentación ácido-láctica.

- Comprobada la capacidad nutricional y bioactiva del polen, explorar la inclusión de polen fermentado en otros alimentos como jugos de fruta, quesos o confitería.

A. Fichas técnicas de cultivos comerciales empleados

PRODUCT DESCRIPTION - PD 206875-4.0FR **No. de produit 50574**

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU
CHOOZIT™ Cheese Cultures

Description

Ferment lactique lyophilisé concentré pour l'ensemencement direct du lait et des bases lactées.

Dosages d'utilisation

Produit	Dose
Lait fermenté	20 DCU / 100 l de lait
Type Reblochon	5 - 8 DCU / 100 l de lait
Fromages de spécialités	5 - 8 DCU / 100 l de lait

Température : 42°C

Les doses d'ensemencement préconisées sont données à titre indicatif. Des ferments supplémentaires peuvent être rajoutés en fonction de la technologie, du taux de matières grasses et des caractéristiques produits recherchées.

Notre responsabilité ne serait être engagée dans le cas d'une utilisation autre que celle recommandée.

Conseils d'utilisation

Conserver à une température < 4°C dans un endroit sec. Lorsque le produit est conservé à une température négative, laisser le sachet pendant 30 à 60 minutes, à température ambiante, avant de l'ouvrir. Dans le cas contraire, les propriétés de la culture en seront affectées. Prolonger l'exposition à température ambiante diminuera également les performances. Vérifier avant utilisation que la culture utilisée est sous forme de poudre. Ajouter directement au lait de fabrication dès que les pâles d'agitation de la cuve sont recouvertes de lait. Eviter la formation de mousse et d'air dans le lait.
Recommandations importantes :
Si le produit forme une masse compacte, il doit être mis au rebut. Afin de garder la contamination bactériophagique sous contrôle, s'assurer que l'environnement et les équipements soient nettoyés avec des produits appropriés, à intervalles réguliers. Supprimer tout système qui pourrait recycler une partie du produit fini au début de la chaîne de fabrication afin de limiter la propagation phagique. Notre responsabilité ne serait être engagée en cas d'une utilisation autre que celle recommandée.

Composition

Streptococcus thermophilus
Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis
Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

Propriétés

- La forme lyophilisée facilite le stockage et la manutention des cultures.
- CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU est un mélange de souches sélectionnées pour l'ensemencement direct des laits de fabrication. Ces souches ont été spécialement choisies et associées pour répondre à vos besoins en termes d'acidification, de texture et de goût.
- CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU assure une acidification rapide jusqu'à un pH 4.70 - 4.60 puis une acidification plus lente pour un pH moins élevé. Ces caractéristiques permettent un parfait contrôle du pH pour une qualité de produit optimisée et constante.

Spécifications physiques/chimiques

Normes d'activité acidifiante

Milieu test :
Lait stérilisé reconstitué (12% matières sèches)
Chauffé 20 min à 110°C. Standardisé à un pH 6,60

Température :	42 °C
Taux d'ensemencement :	20 DCU / 100 l
Delta pH :	1.00
Temps pour atteindre le delta pH :	<= 3 heures

Les informations contenues dans cette publication sont fondées sur nos travaux de recherche et développement et sont, dans l'état actuel de nos connaissances, fiables. Toutefois, les utilisateurs doivent effectuer leurs propres essais afin de déterminer si nos produits sont adaptés à leurs besoins spécifiques et de définir le statut juridique de l'usage qu'ils prévoient de faire de ces produits. Les déclarations contenues dans ce document ne constituent en aucune manière une garantie expresse ou implicite et la société n'assume aucune responsabilité concernant la contrefaçon éventuelle de brevets.

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

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 206875-4.0FR

No. de produit 50574

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU

CHOOZIT™ Cheese Cultures

Spécifications microbiologiques

Normes bactériologiques (données standard et méthodes de référence)

Coliformes	< 10 / g [1]
enterococci	< 20 / g [2]
Levures	< 10 / g [3]
Moisissures	< 10 / g [3]
Staphylococci coagulase positive	< 10 / g [4]
Listeria monocytogenes	neg. / 25 g [5]
salmonellae	neg. / 25 g [6]

[1] NF V08-015, IDF 73A-1985
[2] Gélose bile esculine azide de sodium / 48 h à 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

Stockage

18 mois à compter de la date de production à <= 4°C

Conditionnement

Sachets fabriqués en film 3 couches (polyéthylène, aluminium, polyester). Les informations suivantes sont imprimées sur chaque sachet : nom du produit, taille de conditionnement, n° de lot et durée de vie.

Quantité

Cartons de transport contenant 50 sachets

Pureté et législation

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU répond aux exigences définies par la législation européenne.

Les réglementations d'étiquetage alimentaires doivent systématiquement être consultées quant au statut de ce produit ; la législation liée à l'utilisation dans l'industrie alimentaire pouvant varier d'un pays à l'autre.

Sécurité et manutention

Fiche de Données de Sécurité disponible sur demande.

Statut Kasher

KASHER O-U-D

Statut Halal

Certifié Halal AHA

Allergènes

Le tableau ci-dessous indique la présence des allergènes et produits dérivés suivants:

Oui	Non	Allergènes	Description des composants
	X	céréales contenant du gluten	
	X	crustacés	
	X	oeufs	
	X	poisson	
	X	arachides	
	X	soja	
	X	lait (lactose inclus)	
	X	fruits à coques	
	X	céleri	
	X	moutarde	
	X	graines de sésame	
	X	Sulfite et dioxyde de soufre (> 10 mg/kg)	

Renseignements complémentaires

certifié ISO 9001

Les informations contenues dans cette publication sont fondées sur nos travaux de recherche et développement et sont, dans l'état actuel de nos connaissances, fiables. Toutefois, les utilisateurs doivent effectuer leurs propres essais afin de déterminer si nos produits sont adaptés à leurs besoins spécifiques et de définir le statut juridique de l'usage qu'ils prévoient de faire de ces produits. Les déclarations contenues dans ce document ne constituent en aucune manière une garantie expresse ou implicite et la société n'assume aucune responsabilité concernant la contrefaçon éventuelle de brevets.

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

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 206875-4.0FR

No. de produit 50574

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU

CHOOZIT™ Cheese Cultures

Statut OGM

CHOOZIT™ MY 800 LYO 25 DCU n'est composé d'organismes génétiquement modifiés, n'en contient ou n'en est issu selon les définitions établies par le Règlement du 1829/2003 (CE), et le Règlement du 1830/2003 du Parlement Européen et du Conseil du 22 Septembre 2003. En ce qui concerne les matières premières susceptibles d'être produites à partir d'organismes génétiquement modifiés, nous avons obtenus de nos fournisseurs des déclarations écrites affirmant que les matières premières ne proviennent pas d'organismes génétiquement modifiés selon les définitions établies par les règlements de la communauté européenne mentionnés ci-dessus.

Les informations contenues dans cette publication sont fondées sur nos travaux de recherche et développement et sont, dans l'état actuel de nos connaissances, fiables. Toutefois, les utilisateurs doivent effectuer leurs propres essais afin de déterminer si nos produits sont adaptés à leurs besoins spécifiques et de définir le statut juridique de l'usage qu'ils prévoient de faire de ces produits. Les déclarations contenues dans ce document ne constituent en aucune manière une garantie expresse ou implicite et la société n'assume aucune responsabilité concernant la contrefaçon éventuelle de brevets.

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

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 207082-4.0EN

Material no. 50430

CHOOZIT™ MA 4001 LYO 25 DCU

CHOOZIT™ Cheese Cultures

Description

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

Usage levels

Product	Dose
soft cheese	5 - 10 DCU / 100 l of vat milk
semi-hard cheese	5 - 10 DCU / 100 l of vat milk
quark type	2.5 - 5 DCU / 100 l of vat milk
sour cream	2.5 - 5 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

Lactococcus lactis subsp. lactis
Lactococcus lactis subsp. cremoris
Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis
Streptococcus thermophilus
Carrier:
Sucrose
Maltodextrins

Properties

- Heterofermentative farmhouse culture with a mesophilic predominance.
- Direct vat inoculation.
- A phage alternative is available on request

Physical/chemical specifications

Quantitative/Activity standard

Test medium:
Sterilised reconstituted milk (10% solids)
Heated 20 min at 110 °C. Standardised to pH 6.60

Temperature:	30 °C
Inoculation rate:	6.25 DCU / 100 l
Delta pH:	0.9
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.

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

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 207082-4.0EN

Material no. 50430

CHOOZIT™ MA 4001 LYO 25 DCU

CHOOZIT™ Cheese 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

18 months from date of production at <= 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

CHOOZIT™ MA 4001 LYO 25 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	wheat	
	X	other cereals containing gluten	
	X	crustacean shellfish	
	X	eggs	
	X	fish	
	X	peanuts	
	X	soybeans	
	X	milk (including lactose)	used as fermentation nutrient*
	X	nuts	
	X	celery	
	X	mustard	
	X	sesame seeds	
	X	sulphur dioxide and sulphites (> 10 mg/kg)	
	X	lupin	
	X	molluscs	

* used as fermentation nutrient. Danisco has determined that fermentation nutrients are outside the scope of US and EU food allergen labelling requirements.
Local regulation has always to be consulted as allergen labelling requirements may vary from country to country.

Additional information

ISO 9001 certified
ISO 22000 certified

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

DANISCO
First you add knowledge...

PRODUCT DESCRIPTION - PD 207082-4.0EN **Material no. 50430**

CHOOZIT™ MA 4001 LYO 25 DCU
CHOOZIT™ Cheese Cultures

GMO status

CHOOZIT™ MA 4001 LYO 25 DCU does not consist of, nor contains, nor is produced from genetically modified organisms according to the definitions of Regulation (EC) 1829/2003 and Regulation (EC) 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003.

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

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

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 personnel 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

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) 1830/2003 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.

B. Evaluación sensorial en bebidas lácteas fermentadas

La evaluación sensorial de calidad en las bebidas lácteas con inclusión de polen apícola se basó en la metodología descrita por Zamora para la evaluación de yogures naturales saborizados de acuerdo a puntuaciones dadas en el intervalo de 1 a 5, siendo 1 la menor y 5 la mayor, a parámetros visuales, olfativos, gustativos y táctiles por parte de panelistas entrenados (Zamora, 2007) haciendo uso del formato ilustrado en la

Figura B-1: Formato utilizado en la evaluación sensorial de bebidas lácteas fermentadas con inclusión de polen apícola

Nombre: _____ **Fecha:** _____

CÓDIGO	ATRIBUTO	DEFECTOS	INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN (muy ligero – ligero – medio – marcado – muy marcado)	PUNTAJE
Visual	*Color (uniformidad/tipicidad)*			
	Homogeneidad			
Olfativo	*Calidad e intensidad del olor*			
Gustativo	*Intensidad del sabor*			
	Dulzor			
	Acidez			
Táctil	*Consistencia / viscosidad*			
	Granulosidad			

- **Evaluación visual.**

Se evaluará características visuales relacionadas con el color y la homogeneidad de la muestra presentada. En este sentido el yogur/kumis en cualquiera de sus formas de presentación, deberá tener aspecto de coágulo uniforme, libre de grumos y/o burbujas y estará libre de suero separado. El producto con fruta deberá tener aspecto característico con la fruta uniformemente distribuida. Respecto al color, el yogur natural deberá tener color blanco o ligeramente amarillento; los otros productos deberán tener el color característico para cada forma de presentación.

- **Evaluación olfativa.**

La evaluación del olor en productos envasados se realizará abriendo o destapando el envase en el momento en que éste se abre y aspirando por la nariz, centrando su atención en los atributos del modelo de evaluación correspondiente (calidad e intensidad de la sensación olfativa). El producto deberá tener el olor característico para cada forma de presentación y estará libre de cualquier olor extraño.

- **Evaluación gustativa.**

Para la evaluación del sabor se toma una cantidad considerable de modo que la porción degustada entre en contacto con las áreas de sensibilidad bucal, centrando la atención en un atributo cada vez (intensidad, dulzor y acidez). La evaluación se realizará de los sabores más débiles a los más fuertes.

- **Evaluación táctil.**

La textura se evaluará eminentemente en la boca, en caso necesario se evaluará con los dedos para determinar consistencia y granulosidad. La textura también se evalúa con los ojos, cuando se trata de evaluar el aspecto textural.

El puntaje se asigna de acuerdo a la presencia o ausencia de defectos en la muestra evaluada. Como se resume en la Tabla B-1, el puntaje es máximo si hay ausencia de defectos o se tiene un defecto leve con intensidad muy ligera; los puntajes disminuyen a medida que los defectos pasan a ser graves o críticos (Tabla B-2) y se perciben con mayor intensidad.

Tabla B-1: Calificación de parámetros sensoriales en bebidas lácteas según el tipo e intensidad de defecto encontrado

Puntaje	Magnitud de puntuación de cada atributo
5	Ausencia de defectos: • El defecto que presenta es *LEVE* con intensidad *MUY LIGERA*
4	Poca afectación en su valor sensorial: • El defecto es *LEVE* y se encuentra en forma *LIGERA*. • El defecto siendo *GRAVE*, se encuentra en forma *MUY LIGERA*
3	Mediana afectación en su valor sensorial: • Cuando el defecto siendo LEVE se presenta en forma MODERADA • Si el defecto siendo GRAVE se presenta en forma LIGERA
2	Afectación severa: • El defecto es *LEVE* y está en forma *MARCADA*. • Si el defecto es *GRAVE* y está en forma *MODERADA*. • Si el defecto es *CRITICO* y se encuentra en forma *MUY LIGERA*
1	*Afectación severa:* • *El defecto es GRAVE y está en forma MARCADA.* • *Si el defecto es LEVE y está en forma MUY MARCADA.* • *Si el defecto es CRITICO y se encuentra en forma LIGERA*

Adaptado (Zamora, 2007)

Tabla B-2: Defectos clasificados por atributos para leches fermentadas.

		Defectos		
Atributo	**Parámetro**	**Leves**	**Graves**	**Críticos**
Visual	*Color*	Intensidad y uniformidad del color	Tipicidad del color	
	Homogeneidad		Defectos en homogeneidad	Sedimentación, sinéresis, burbujas
Olfativo	*Calidad e intensidad del olor*	Intensidad del olor	Indefinición o tipicidad del olor	
Gustativo	*Intensidad del sabor*	Intensidad del sabor	Indefinición o tipicidad del sabor	Sabor rancio , moho, químico, anamú, metálico
	Dulzor	Intensidad del dulzor		
	Acidez		Acidez alta	
Táctil	*Consistencia*		Defectos en la consistencia	
	Granulosidad		Grumoso, arenoso	

Adaptado (Zamora, 2007)

Bajo la metodología adaptada y previamente explicada, a continuación se muestran los resultados para la evaluación de calidad visual, olfativa, gustativa y táctil de cada uno de los niveles de inclusión de polen fermentado en las matrices de yogur y kumis descritas en el numeral 4.4 de este documento acompañado de la valoración hedónica realizada por consumidores habituales de este tipo de productos (Ver Figura B-2 a Figura B-7).

Figura B-2: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de yogur con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MY800.

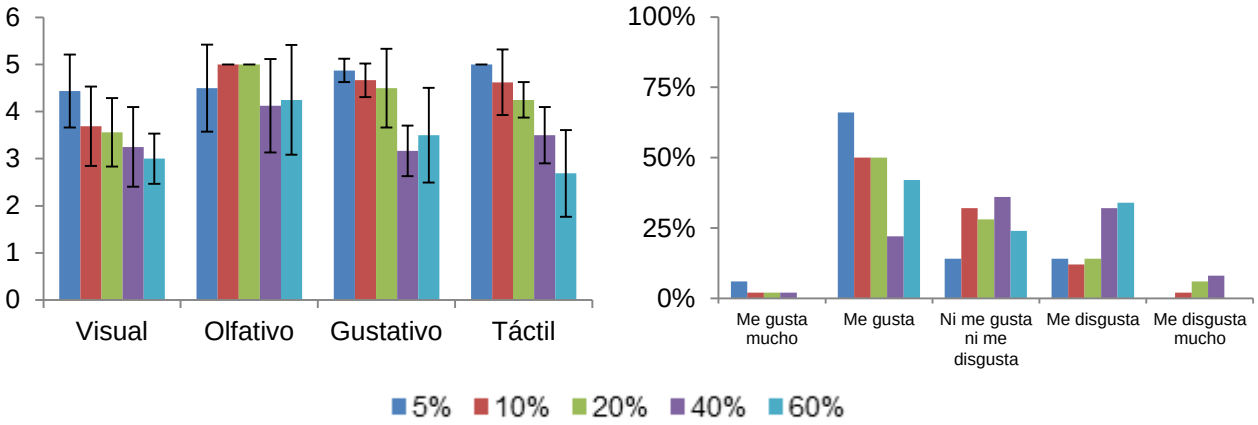


Figura B-3: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de yogur con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MA4001.

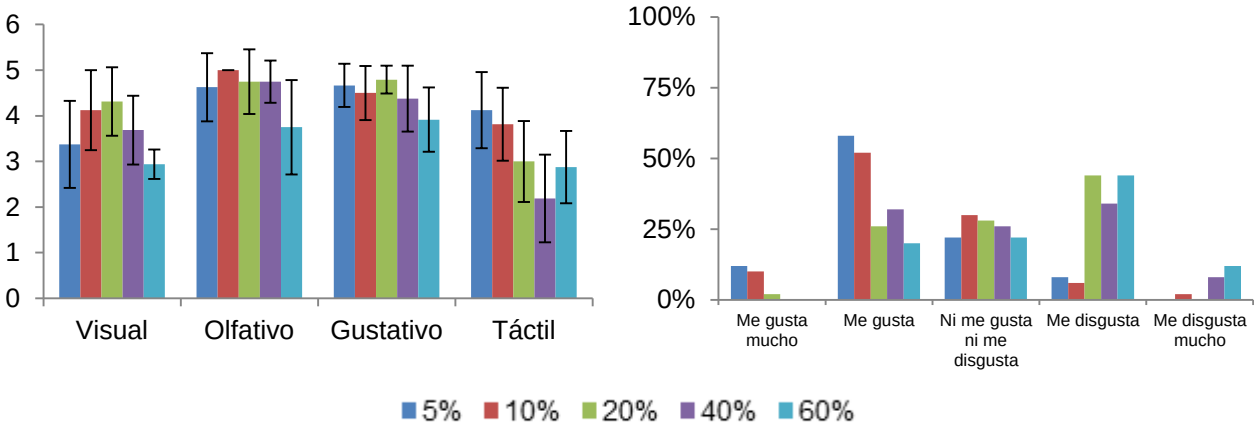


Figura B-4: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de yogur con inclusión de polen fermentado con HOWARU DOPHILUS.

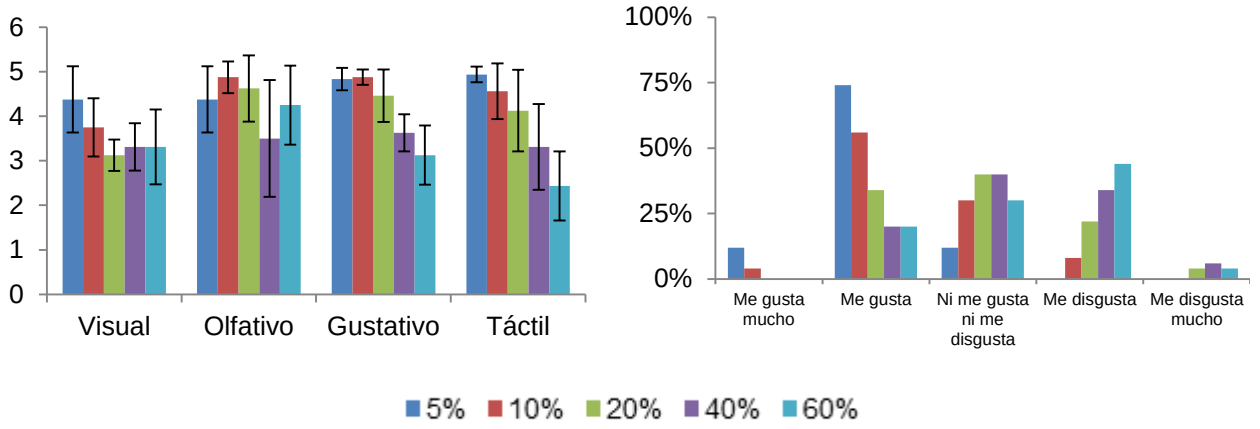


Figura B-5: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de kumis con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MY800.

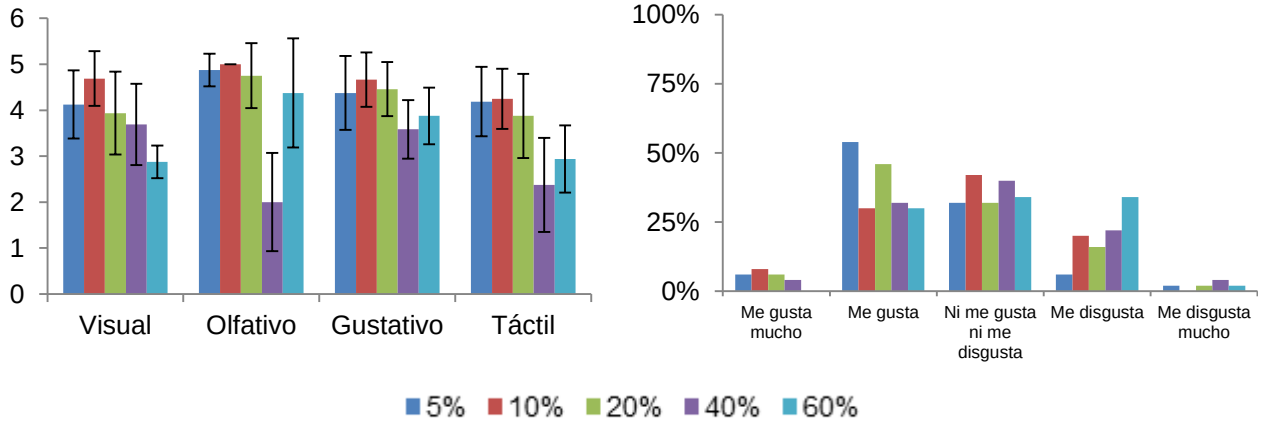


Figura B-6: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de kumis con inclusión de polen fermentado con CHOOZIT MA4001.

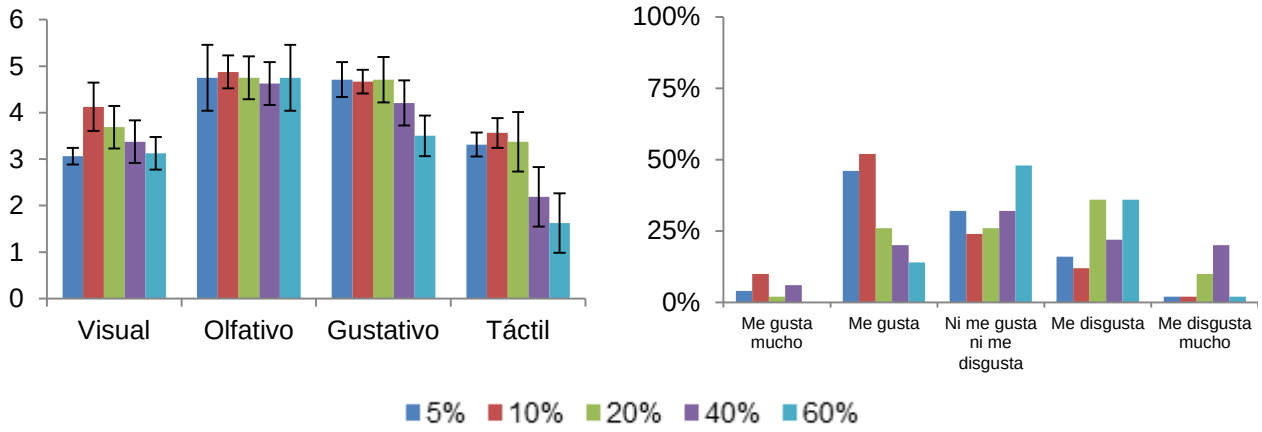
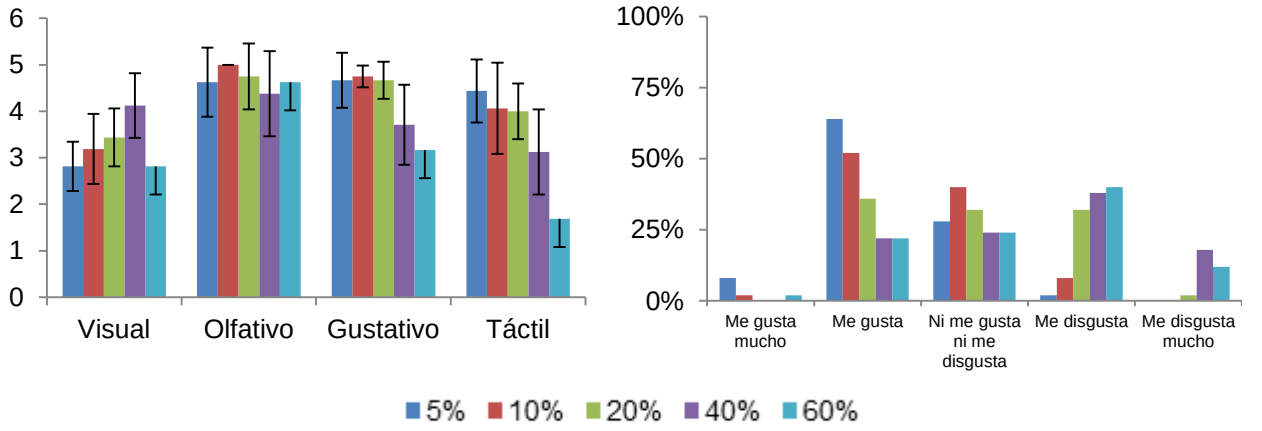


Figura B-7: Resultados discriminados de la evaluación sensorial de calidad (izq.) y evaluación sensorial hedónica (der.) de kumis con inclusión de polen fermentado con HOWARU DOPHILUS.



Bibliografía

Adams, M., & Moss, M. (2000). *Food Microbiology*. Cambridge, GBR: Royal Society of Chemistry.

Al-Kadamany, E., Khattar, M., Haddad, T., & Toufeili, I. (2003). Estimation of shelf-life of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. *LWT - Food Science and Technology*, *36*(4), 407-414.

Alarcón, A. (2016). *Evaluación del proceso fermentativo de polen utilizando microorganismos aislados de productos apícolas del altiplano Cundiboyacense*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Alarcón, A., & Quicazán, M. (2016). Evaluación del proceso fermentativo de polen utilizando microorganismos aislados de productos apícolas del altiplano Cundiboyacense. *Agronomía colombiana*, *1*, 896-899.

Almanza, F., & Barrera, E. (1991). *Tecnología de leches y derivados*. Bogotá: UNISUR.

Almeida-Muradian, L., Pamplona, L., Coimbra,, & Barth, O. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, *18*, 105-111.

Araneda, X., Velásquez, C., Morales, D., & Martínez, I. (2014). Producción de pan de abejas (*Apis mellifera L.*) bajo condiciones de laboratorio. *IDESIA*, *32*(4), 63-69.

Association of Official Analytical Chemists. (2002). *Official methods of analysis of the AOAC*.

Audisio, M., Terzolo, H., & Apella, M. (2005). Bacteriocin from honeybee beebread *Enterococcus avium*, active against *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(6), 3373-3375.

Baldi Coronel, B., Dall'Oglio, A., Lezcano, S., Berna, G., & Yañez, A. (1999). Influencia

del proceso de secado del polen para uso alimenticio. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, *10*(18), 241.274.

Baldi Coronel, B., Grasso, D., Chaves, S., & Fernández, G. (2004). Caracterización bromatológica del polen apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, *29*, 145-181.

Bamforth, C. (2008). *Food, fermentation and micro-organisms*. Chichester, GBR: Wiley.

Barkallah, M., Dammak, M., Louati, I., Hentati, F., & Hadrich, B. (2017). Effect of *Spirulina platensis* fortifi cation on physicochemical , textural , antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. *LWT - Food Science and Technology*, *84*, 323-330.

Bell, R., Thornber, E., Seet, J., Groves, M., Ho, N., & Bell, D. (1983). Composition and protein quality of honeybee-collected pollen of *Eucalyptus marginata* and *Eucaliptus calophylla*. *American Institute of Nutrition*, *113*(12), 2479-2484.

Benavides, A. (2009). *Evaluación de la fermentación láctica de bebida de soya empleando células inmovilizadas de un cultivo probiótico*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Benavides, R. (2016). *Evaluación de pretratamientos en el polen apícola como alternativa de adecuación para un sustrato de fermentación láctica*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, *239*, 70-76.

Beristain-Bauza, S., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas : antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, *6*(2), 64-78.

Bertolino, M., Belviso, S., Dal Bello, B., Ghirardello, D., Giordano, M., Rolle, L., Zeppa, G. (2015). Influence of the addition of different hazelnut skins on the physicochemical, antioxidant, polyphenol and sensory properties ofyogurt. *LWT - Food Science and*

Technology, *63*(2), 1145-1154.

Blanco, A., Quicazán, M., & Cuenca, M. (2012). Efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel. *Vitae*, *19*(1), 234-236.

Bosnea, L., Kopsahelis,, Kokkali, V., Terpou, A., & Kanellaki, M. (2016). Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L . casei* enriched fresh apple pieces , dried raisins and wheat grains. *Food and Bioproducts Processing*, *102*, 62-71.

Branco, G., Barros, A., Barros, H., Neves, E., & Ferreira, D. (2014). Probiotical yogurt honey flavor added bee pollen as a technological innovation. En *3rd International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional & Baby Foods* (Vol. 2, p. 105). Naples.

Cabeza, E. (s. f.). Cultivos estárter: Seguridad, funcionalidad y propiedades tecnológicas. Recuperado 6 de noviembre de 2015, a partir de https://www.academia.edu/992790/Cultivos_Estárter_Seguridad_funcionalidad_y_propiedades_tecnológicas

Cabeza, E. A. (2011). Aplicación de la microbiología predictiva para la determinación de la vida útil de los alimentos. Recuperado 1 de noviembre de 2015, a partir de https://www.academia.edu/992792/Aplicación_de_la_Microbiología_Predictiva_en_la_determinación_de_la_vida_útil_de_los_alimentos

Castro, L., Zuluaga, C., Quicazán, M., Pastrana, Y., & De Paula, C. (2014). Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. En *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID* (pp. 1-4). Bogotá.

Charm, S. E. (2007). Food engineering applied to accommodate food regulations, quality and testing. *Alimentos Ciencia e Ingeniería*, *16*(1), 5-8.

Chevtchik, V. (1950). Mikrobiologie pylového kvaseni. *Publ. Fac. Sei. Univ. Masaryk*, *323*, 103-130.

Collison, C. (2014). A closer look: Bee bread. *Bee culture*, 19-22.

CONACYT. (2004). *NSO 65.38.01:04. Calidad del polen de abejas*. El Salvador.

Condony, R., Mariné, A., & Rafecas, M. (1988). *Yogur: Elaboración y valor nutritivo*. Madrid: Fundación española de la nutrición.

Connor, L., & Muir, R. (2013). The remarkable honey bee. Pollen and bee bread. *American Antiquity*, 727-729.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2006). *NSO 67.01.10 Productos lácteos. Yogur. Especificaciones*. El Salvador.

Cruz, A., Cavalcanti, R., Guerreiro, L., Sant'Ana, A., Nogueira, L., Oliveira, C., Bolini, H. (2013). Developing a prebiotic yogurt: Rheological, physico-chemical and microbiological aspects and adequacy of survival analysis methodology. *Journal of Food Engineering*, *114*(3), 323-330.

Cruz, A., Walter, E., Cadena, R., Faria, J., Bolini, H., Pinheiro, H., & Sant'Ana, A. (2010). Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. *Food Research International*, *43*(5), 1444-1448.

Curia, A., Aguerrido, M., Langohr, K., & Hough, G. (2005). Survival analysis applied to sensory shelf life of yogurts - I: Argentine formulations. *Journal of Food Science*, *70*(7), S442-S445.

Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, *7*(8-9), 537-545. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00053-8

Del Risco-Ríos, C., Pérez-Piñeiro, A., Álvarez-Rivera, V., Rodríguez-Castro, G., Leiva-Castillo, V., Puig-Peña, Y., & García-Neninger, R. (2012). Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *CENIC Ciencias Biológicas*, *43*(1), 17-21.

Del Risco, C. (2002). Polen-pan de abejas: Composición, nutrición, acción en la salud humana y microbiología. En *Estación experimental Apícola de la Habana* (pp. 1-7). La Habana.

Díaz-Moreno, A., Zuluaga-Dominguez, C., Fuenmayor, C., & Martinez, T. (2009). Special

features of pollen production in Colombia. En *Apimondia*. Montpellier, France.

Díaz, C., Zuluaga, C., Morales, C., & Quicazan, M. (2012). Determinación de fibra dietaria en polen apícola colombiano. *Vitae*, *19*(1), 454-456.

Durán, A. (2014). *Diseño de un sistema de secado y separación de impurezas para polen apícola en Colombia*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Dustmann, J. (2007). Fresh pollen offers best therapeutic and nutritional benefits. En *5th German Apitherapy Congress* (p. 2). Passau, Alemania.

Elizalde, F., Hargreaves, A., & Wernik, C. (1996). Conservación de forrajes. In: Praderas para Chile. I. Ruiz. Santiago, Chile: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile.

Endo, A., & Salminen, S. (2013). Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*(6), 444-448.

Espinal, C. F., Martínez, H. J., & Peña, Y. (2006). *La cadena de las abejas y la apicultura en Colombia*. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. Bogotá.

Estevinho, L. M., Rodrigues, S., & Pereira, A. P. (2012). Portuguese bee pollen : Palynological study , nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science & Technology*, *47*, 429-435. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02859.x

FAO. (2001). *Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. *Food and Nutrition Paper* (Vol. 85).

FAO. (2003). CODEX STAN 243. Norma para leches fermentadas. Food & Agriculture Organization.

Fernandes-Da Silva, P., & Serrao, J. (2000). Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, Scaptotrigona postica Latr. (*Hymenoptera, Apidae, Meliponini*). *Apidologie*, *31*, 39-45.

Fernandes, A., e Colpa, P., Paiva, E., Paiva, L., Nachtigall, A., & Boas, B. (2016). Shelf life of yogurt taste coffee. *Coffee Science*, *11*(4), 538-543.

Fernandes, R. (2009). *Microbiology handbook dairy products* (First ed.). Cambridge: Leatherhead Food International Ltd.

Fuenmayor, C. (2009). Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia

Fuenmayor, C., Quicazán, M., & Figueroa, J. (2011). Desarrollo de un suplemento nutricional mediante la fermentación en fase sólida de polen de abejas empleando bacterias ácido lácticas probióticas. *Alimentos hoy*, *20*(23), 18-40.

Fuenmayor, C., Zuluaga, C., Díaz, C., Quicazán, M., Cosio, M. S., & Mannino, S. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *MVZ Córdoba*, *19*(1), 4003-4014.

Giannuzzi, L., Pinottii, A., & Zaritzky, N. (1998). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol*, *39*, 101-110.

Gilliam, M. (1979a). Microbiology of pollen and bee bread: the genus *bacillus*. *Apidologie*, *10*(3), 269-274.

Gilliam, M. (1979b). Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, *10*(1), 43-53.

Gilliam, M., Roubik, D. W., & Lorenz, B. J. (1990). Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. *Apidologie*, *21*(2), 89-97.

Giménez, A., Ares, F., & Ares, G. (2012). Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. *Food Research International*, *49*(1), 311-325.

Gomes, A., & Malcata, F. (1999). *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, *10*(4-5), 139-157.

Gualdron, J., & González, R. (2013). Evaluación de un yogurt con características

simbióticas y su efecto sobre la vida útil del producto. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, *3*(1), 6-17.

Gutierrez, A., Osorio, M., & Salamanca, G. (2010). Implementación de un modelo de calidad y trazabilidad en el proceso de agroindustrialización del polen. *Revista de la asociación colombiana de Ciencias Biológicas*, *22*, 18-30.

Herbert, E. (1992). *Honey bee nutrition. In: The hive and the honey bee*. Hamilton, Illinois: Dadant and Sons.

Herbert, E., & Shimanuki, H. (1978). Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, *9*(1), 33-40.

Hidalgo, A., Quicazán, M., & Figueroa, L. (2014). Desarrollo de pan con inclusión de polen y sustitución de grasa hidrogenada por aceite vegetal. *Revista Facultad Nacional De Agronomía*, *67*(2), 638-640.

Horwitz, W. (2002). *Official methods of analysis of the AOAC*.

Hough, G. (2010). *Sensory shelf life estimation of food products* (Primera ed). Boca Ratón: CRC Press.

Hülya, Ö., Sevil, P., Ahmet, K., Musa, D., C., F., Birol, B., … Safi, B. (2010). Pollen morphology of the genus *Salvia L.* (*Lamiaceae*) in Turkey. *Revista Flora*, *206*(2), 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*, 1486-1492. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.05.023

ICONTEC. (2004a). NTC 3856. Productos lácteos. Leche UAT (UHT) Ultra Alta Temperatura larga vida y leche ultrapasteurizada. Bogotá.

ICONTEC. (2004b). NTC 611. Industrias alimentarias. Azúcar blanco. Bogotá.

ICONTEC. (2005). NTC 805. Productos lácteos. Leche fermentadas. Bogotá.

Instituto Colombiano de Bienestar Familiar - ICBF. (2011). *Encuesta nacional de la*

situación nutricional en Colombia - ENSIN 2010 (Primera ed). Bogotá. https://doi.org/9789586231121

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2011). Milk and dairy products. En *Microorganisms in Foods 8: Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance* (Illustrate, pp. 305-327). Springer Science & Business Media.

Ismail, A., Owayss, A., Mohanny, K., & Salem, R. (2013). Evaluation of pollen collected by honey bee, *Apis mellifera L.* colonies at Fayoum Governorate, Egypt. Part 1: Botanical origin. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *12*(2), 129-135.

ISO. (2007). ISO 8589. Sensory analysis. General guidance for the design of test rooms. ISO.

ISO. (2010). ISO 27205. Fermented milk products - bacterial starter cultures. ISO.

Kessler, H. (1998). The structure of fermented milk products as influenced by technology and composition. IDF.

Kilcast, D., & Subramaniam, P. (2000). *The stability and shelf-life of food* (First ed.). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Kong, F., & Singh, R. P. (2011). *Chemical deterioration and physical instability of foods and beverages*. *Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Woodhead Publishing Limited.

Krell, R. (1996). *Value-added producs from beekeeping*. *FAO Agriculture Services Bulletin* (Issue 124).

Laverde, J., Egea, L., Rodríguez, D., & Peña, J. (2010). *Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y la apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas*. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*. Bogotá.

Lee, W., & Lucey, J. (2003). Rheological properties, whey separation, and microstructure

in set-style yogurt: Effects of heating temperature and incubation temperature. *Journal of Texture Studies*, *34*(5-6), 515-536. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2003.tb01079.x

Lomova, N., Narizhnyi, S., & Snizhko, O. (2014). Yoghurt enrichment with natural bee farming products. *Ukrainian Food Journal*, *3*(3), 415-421.

Lomova, N., Snezhko, O., & Narizhnyi, S. (2014). Effect of beekeeping products on consistency and acidity of yogurt. *Біоресурси і природокористування*, *6*, 3-4.

Longo, D. (2012). *Inclusión de productos apícolas en bebidas fermentadas y subproductos de soya*. Tesis de pregrado. Universidad de la Amazonia.

Longo, D. (2013). *Desarrollo de una pulpa de fruta con inclusión de polen apícola como alimento funcional*. Universidad de la Amazonia.

López, L., Braña, D., & Hernández, I. (2013). *Estimación de la vida de anaquel de la carne* (Primera ed). Ajuchitlán: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Macbean, R. D. (2009). Packaging and the shelf life of yogurt. En *Food packaging and shelf life: A practical guide* (Illustrate, pp. 143-156). Australia: CRC Press.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., & Clark, D. (2010). *Brock biology of microorganisms* (13.ª ed.). Benjamin Cummings.

Mărghitas, L., Stanciu, O., Dezmirean, D., Bobis, O., Popescu, O., Bogdanov, S., & Campos, M. (2009). In vitro antioxidant capacity of honey-bee collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*, *115*(3), 878-883.

Marth, E. H., & Steele, J. L. (2001). *Applied dairy microbiology*. *International Dairy Journal* (Second ed). New York: Marcel Dekker Inc.

Martínez, T. (2006). *Diagnostico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia*. *Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura (IICA)*.

Mataragas, M., Dimitriou, V., Skandamis, P. N., & Drosinos, E. H. (2011). Quantifying the spoilage and shelf-life of yoghurt with fruits. *Food Microbiology*, *28*(3), 611-616.

Maurizio, A. (1975). Microscopy of honey. En *E. Crane (ed). Honey: a comprehensive survery* (pp. 240-257). London: Crane, Russak.

Ministério da agricultura e do abastecimento. Instrução normativa N°3 (2001). Brasil.

Ministerio de agricultura ganadería y pesca. Código argentino alimentario (2005). Buenos Aires.

Ministerio de la Protección Social. Resolución 5109 de 2005 (2005). Bogotá.

Ministerio de la Protección Social. Decreto 616 de 2006 (2012). Bogotá.

Ministerio de la Protección Social y de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución 2115 de 2007 (2007). Bogotá.

Ministerio de salud. (1986). Resolución 2310. Bogotá: Republica de Colombia. Recuperado a partir de https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_02310_1986.pdf

Mizrahi, S. (2011). *Accelerated shelf life testing of foods*. *Food and Beverage Stability and Shelf Life*. Woodhead Publishing Limited.

Morais, M., Moreira, L., Feás, X., & Estevinho, L. (2011). Honeybee-collected pollen from five Portuguese natural parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidante propierties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(10), 1096-1101.

Mosier, N. S., & Ladisch, M. R. (2009). *Modern Biotechnology : Connecting Innovations in Microbiology and Biochemistry to Engineering Fundamentals*. Hoboken, NJ, USA: American Institute of Chemical Engineers.

Muniandy, P., Shori, A. B., & Baba, A. S. (2015). Comparison of the effect of green, white and black tea on *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus spp.* in yogurt during refrigerated storage. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*, *8*, 1-8. https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2015.11.002

Nguz, K., Shindano, J., & Samapundo, S. (2005). Microbiological evaluation of fresh-cut

organic vegetables produced in Zambia, *16*, 623-628.

Nielsen, S. (2010). *Food Analysis* (4th ed.). Springer US.

O'Neal, R. J., & Waller, G. D. (1984). On the pollen harvest by the honey bee (*Apis mellifera L.*) near Tucson, Arizona (1976-1981). *Desert Plants*, *6*(2), 81-109.

Okafor, N. (2007). *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. Enfield, NH, USA: Science Publishers.

Ott, A., Fay, L., & Chaintreau, A. (1997). Determination and origin of the aroma impact compounds of yogurt flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 850-858.

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*. Luxemburg.

Pietrzak, E. (2009). *Guidelines for the general cleanliness of food - an overview*. Ottawa, Ontario.

Pihlanto, A., Virtanen, T., & Korhonen, H. (2010). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, *20*(1), 3-10.

Pin, C., & Baranyi, J. (1998). Predictive models as a means to quantify the interactions of spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol*, *41*, 59-72.

Pop, C., Vlaic, R., Farcas, A., Salanta, L., Ghicasan, D., Semeniuc, C., & Rotar, A. (2014). Influence of pollen, chia seeds and cranberries addition on the physical and probiotics characteristics of yogurt. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, *72*(1), 141-142.

Pulido, N. (2013). *Influencia del proceso de deshidratación en la calidad fisicoquímica y bioactiva del polen apícola*. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Quicazán, M., Parra, B., & Tobón, G. (1990). *Evaluación biológica de la calidad nutricional del polen*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

Ramos, F. NMX-FF-094-SCFI (2008). Ciudad de méxico: Secretaria de economía.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.

Restrepo, A., & Montoya, C. (2010). *Implementación y diseño de procedimiento para determinación de vida útil de quesos frescos, chorizos frescos y aguas en bolsa*. Universidad Tecnologica de Pereira.

Rosero, M., & Herrera, D. (2010). *Efecto de la miel y el polen en las características físicas, químicas y sensoriales de yogur natural batido*. Universidad de Zamorano.

Salazar-González, C., & Díaz-Moreno, C. (2016). The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process. *Journal of Apicultural Research*, *55*(2), 161-175.

Salazar, C., Céspedes, C., & Díaz-Moreno, C. (2013). Propiedades bioactivas y antioxidantes de polen apícola proveniente del bosque alto-andino. En *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID* (pp. 1-3). Medellín.

Salazar, C., Díaz, C., & Quicazán, M. (2012). Contenido mineral de polen apícola proveniente del altiplano Cundiboyacense. En *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID* (pp. 11-13). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Sánchez, N., Sepúlveda, J., & Rojano, B. (2013). Desarrollo de una bebida láctea con extractos de curuba (*Passiflora mollissima bailey*) como antioxidante natural. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *11*(1), 164-173.

Sánchez, O., Castañeda, P., Muños, G., & Tellez, G. (2013). Aportes para el análisis del sector apícola colombiano. *CienciAgro*, *2*(4), 469-483.

Scheper, T. (2008). *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. Springer Science & Business Media.

Sert, D., Mercan, E., & Dertli, E. (2017). Characterization of lactic acid bacteria from yogurt-like product fermented with pine cone and determination of their role on

physicochemical , textural and microbiological properties of product. *LWT - Food Science and Technology*, *78*, 70-76.

Shori, A., & Baba, A. (2014). Comparative antioxidant activity, proteolysis and in vitro α-amylase and α-glucosidase inhibition of *Allium sativum*-yogurts made from cow and camel milk. *Journal of Saudi Chemical Society*, *18*(5), 456-463.

Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, *299*, 152-178.

Sinha, N. (2007). *Handbook of food products manufacturing*. (Y. Hui, R. Chandan, S. Clark, N. Cross, J. Dobbs, W. Hurst, S. Suparat, Eds.). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Sousa, M., & Mahajan, P. (2011). *Modelling chemical and physical deterioration of foods and beverages*. *Food and beverage stability and shelf life*. Woodhead Publishing Limited.

Srisuvor, N., Chinprahast, N., Prakitchaiwattana, C., & Subhimaros, S. (2013). Effects of inulin and polydextrose on physicochemical and sensory properties of low-fat set yoghurt with probiotic-cultured banana purée. *LWT - Food Science and Technology*, *51*(1), 30-36.

Supavititpatana, P., & Wirjantoro, T. I. (2010). Characteristics and shelf-life of corn milk yogurt, *9*, 133-150.

Telleria, I., & Sarasola, M. (s. f.). Análisis de polen corbícular recolectado durante los años 2002 y 2003 en los colmenares de estudio ecoetológico de Oñati y Goizueta. Recuperado a partir de http://www.euskadi.eus/contenidos/informe_estudio/eco_etologico_abejas/es_doc/adjuntos/analisis_polinico.pdf

Temesgen, M. (2015). Effect of application of stabilizers on gelation and syneresis in yoghurt. *Food Science and Quality Management*, *37*(2005), 90-103.

Universidad Tecnológica de Bolívar. (2005). Productos fermentados. Recuperado a partir

de http://assets00.grou.ps/0F2E3C/wysiwyg_files/FilesModule/profeleo/20110602211558-lelcwmzjjtgohmgjs/Yogurt_y_Kumis.pdf

Vamaru, A., Vamanu, E., Popa, O., Campeanu, G., Albulescu, R., Drugulescu, M., … Babeani, N. (2008). Obtaining of a symbiotic product based on lactic bacteria, pollen and honey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *11*(4), 613-617.

Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, *48*(3), 189-195.

Wang, C., Fang, S., Wu, J., Song, J., Cuihua, W., Shuguang, F., Jinan, S. (2015). Functional yoghourt and production method thereof. China: CN20081202070 20081031.

Wang, W., Wang, N., Liu, C., & Jin, J. (2017). Effect of silkworm pupae peptide on the fermentation and quality of yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, *41*, 1-7.

Yerlikaya, O. (2014). Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. *Mljekarstvo*, *64*(4), 268-279. Recuperado a partir de http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=191970

Zamora, E. (2007). *Evaluación objetiva de la calidad sensorial de alimentos procesados*. (R. Toricella Morales, Ed.). Ciudad de la Habana: Editorial Universitaria.

Zapata, I., Sepúlveda-Valencia, U., & Rojano, B. (2015). Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las propiedades fisicoquímicas, probióticas y antioxidantes de yogurt saborizado con mortiño (*Vaccinium meridionale Sw*). *Información*

Zuluaga, C. (2016). *Valorización de polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia.

Zuluaga, C., Serrato, J., & Quicazán, M. (2014). Valorization alternatives of colombian

bee-pollen for its use as food resource - a structured review. *Vitae*, *21*(3), 237-247.

Zuluaga, C., Quicazán, M., & Serrato, J. C. (2014). Efecto de la inclusión de nutrientes sobre la fermentación de polen apícola utilizando bacterias ácido-lácticas. En *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID* (pp. 1-5). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Zuluaga, C., Quicazán, M., & Serrato, J. (2014). Influencia de tratamientos térmicos sobre el contenido de flavonoides totales y actividad antioxidante en polen apícola. En *Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo – ENID* (pp. 1-4). Medellín.

Zuluaga, C., Serrato, J., & Quicazán, M. (2015). Bee-pollen structure modification by physical and biotechnological processing : Influence on the availability of nutrients and bioactive compounds. *Chemical Engineering Transactions*, *43*.