

Efecto de la Fermentación Láctica sobre las Características Físicoquímicas de un Complemento Nutricional para Aves Elaborado a partir de Polen Apícola

Effect of Lactic Fermentation on the Physicochemical Characteristics of a Nutritional Complement for Birds Prepared From Bee-Pollen

Bautista, J.; Zuluaga, C.

Programa de Ingeniería Agroindustrial. Fundación Universitaria Agraria de Colombia. Calle 170 No. 54^a10, Bogotá D.C., Colombia
bautista.jhonny@uniagraria.edu.co

Fecha de recepción: mayo de 2016 / **Fecha de aceptación:** noviembre de 2016

Resumen

El objetivo principal de esa investigación fue evaluar el efecto de la fermentación láctica sobre las características físicoquímicas de un complemento para aves elaborado a partir de polen apícola. Por consiguiente, se midieron los parámetros humedad, proteína, ceniza, pH, fibra y acidez. Luego se llevó a cabo la segunda fase, en la que se realizó una fermentación, utilizando bacterias ácido lácticas comerciales con una mezcla de polen y agua. Así mismo, se evaluó el efecto de la inclusión de miel como fuente adicional de carbohidratos. Las muestras elaboradas se fermentaron durante 15 días a 35 °C y se hicieron los respectivos seguimientos microbiológicos entre los días 0, 8 y 15, luego se llevó a cabo una nueva caracterización físicoquímica del producto fermentado. El polen apícola mostró una composición de humedad 6,77 %, grasa 7,05 %, ceniza 1,38 %, proteína 5,03 % y fibra cruda en base seca y desengrasada 23,21 %. Por otra parte, los ensayos de fermentación mostraron que un bioproceso realizado con el cultivo comercial Choozit® con inclusión de miel se puede considerar como la opción más atractiva de transformación de polen, con las siguientes características físicoquímicas humedad 49,17 %, grasa 34,91 %, ceniza 2,51 %, proteína 10,28 % y fibra cruda seca y desengrasada 41,69 %. Con estos resultados se pretende mostrar el potencial del polen como una fuente nutricional de valor para la alimentación de aves.

Palabras clave: bacterias ácido lácticas, bioprocesos, exina, fermentación láctica, polen.

Abstract

The main objective of this research was to evaluate the effect of lactic fermentation on the physicochemical characteristics of a complement for birds made from bee pollen. Thus, the parameters moisture, protein, ash, pH, fiber and acid were measured, followed by a second stage where a fermentation was carried out using commercial lactic acid bacteria with a mixture of pollen and water. In addition, the effect of honey inclusion as an additional source of carbohydrate was evaluated. The samples were fermented for 15 days at 35 °C and a microbiological monitoring were performed between days 0, 8 and 15. Later, a new physicochemical characterization of the fermented product was carried out. The bee pollen showed a composition of moisture 6.77 %, fat 7.05 %, ash 1.38 %, protein 5.03 % and crude fiber in a dry and degreased base 23.21 %. On the other hand, the fermentation tests showed that a bioprocess performed with the commercial culture Choozit[®] with the inclusion of honey may be considered as the most attractive option for bee-pollen transformation, with the following physicochemical characteristics: moisture 49.17 %, fat 34.91 %, ash 2.51 %, protein 10.28 % and crude fiber in a dry and defatted base 41.69 %. With these results, it is intended to show the potential of bee-pollen as a valuable nutritional source for poultry feed.

Keywords: Lactic acid bacteria, bioprocesses, exine, lactic fermentation, bee-pollen.

Introducción

Para poder determinar una combinación adecuada de ingredientes, es necesario definir características en función a la fisiología y nivel productivo animal, por medio de nutrientes y complementos, para conseguir su máximo rendimiento, por medio de materias primas vegetales, animales o minerales. Lo anterior ha llevado a realizar diversas investigaciones, con el fin de crear un producto con las características adecuadas del animal a tratar, en este caso aves, teniendo en cuenta aspectos económicos, nutricionales, comerciales y de accesibilidad. En este orden de ideas se encuentra el polen que se presenta como un complemento nutricional de interés para la alimentación animal, ya que aporta elementos esenciales en cantidades variables como carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales, proteínas y aminoácidos. Es también rico en hormonas naturales, carotenoides, flavonoides, fitosteroles y contiene enzimas y coenzimas (Apimondia, 1993), siendo un producto que dentro del organismo animal realiza diferentes funciones como lo son: la mejora de la flora intestinal, poder anabolizante y poder energizante entre otras.

Sin embargo, para utilizar el polen como alimento, es necesario someterlo a procesos de transformación, por medio de bioprocesos. Esto se debe a que su estructura es muy rígida y está conformada por la exina, que es la capa dura exterior de los granos polen, cubierta de una sustancia principal llamada esporopolenina que es un politerpeno impermeable resistente a

los agentes químicos y dando a la exina una duración de vida de miles de años, lo que hace que impida la liberación de algunos bioactivos presentes (Scott y Gilbert, 2005). Esto conlleva que las aves no realicen una adecuada digestión, ya que usan su estómago como un sitio de almacenamiento y posteriormente, una digestión parcial. Luego, una preparación para una posterior digestión en el intestino, donde se dividen porciones delgadas de absorción y asimilación de nutrientes que se desintegran en compuestos químicos simples, mediante la acción de enzimas, lo que produce que las aves no asimilen el grano de polen.

Para realizar dicha transformación se utilizan diferentes métodos para modificar la estructura del polen (química, térmica y biológica). En este caso se pretende utilizar la fermentación a través de bacterias ácido lácticas para obtener un producto hidrolizado de polen con mejores características físicoquímicas. En esta investigación se utilizarán distintos cultivos de bacterias ácido lácticas comerciales para evaluar el efecto de la fermentación sobre las características físicoquímicas de un complemento alimenticio para aves, elaborado a partir de polen. De acuerdo con la actividad del sector de alimentos balanceados para aves en Colombia depende del mercado y precio internacional, debido a que la producción interna de las principales materias primas (maíz, soya y torta de soya) no alcanza a cubrir los requerimientos de la industria nacional, ni cumple con los criterios de calidad necesarios para la elaboración de este tipo de productos. Por esto, se buscan alternativas como este caso;

un complemento nutricional a partir de los granos de polen. En Colombia, la apicultura tiene más influencia en el mercado año tras año, donde se pueden implementar nuevas alternativas y enriquecer las materias primas en el sector avícola.

Materiales y Métodos

Muestras. El polen utilizado en la parte experimental fue proporcionado por apicultores en el altiplano cundiboyacense. Las muestras fueron recolectadas en bolsas de polietileno de 1 kg y almacenadas en refrigeración hasta realización de los experimentos. Por otra parte, se empleó un cultivo comercial de bacterias ácido lácticas Choozit MY800 (Danisco, Dinamarca), el cual es una mezcla de las especies: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Caracterización fisicoquímica

Determinación de humedad: 3 g de muestra se pesaron sobre una caja de Petri y luego se sometieron a secado a 65 °C, durante 24 h. Luego, se retiró la caja de Petri de la estufa y se tomó el peso de la muestra seca. El contenido de humedad fue calculado gravimétricamente por diferencia de peso entre la muestra seca y húmeda (NTC 529, 2009).

Determinación de cenizas: 5 g de muestra fueron puestos en un crisol que

posteriormente fue ingresado a una mufla a 600 °C por 3 horas. Luego de la calcinación se pesó el contenido remanente en el crisol. El contenido de cenizas fue calculado gravimétricamente por diferencia de peso entre la muestra final e inicial (Bolaños, s.f.).

Determinación de grasa: En un balón de 100 ml, se pusieron 50 ml de éter de petróleo. Se realizó el montaje Soxhlet, introduciendo aproximadamente 3 g de muestra seca. Una vez realizado el montaje Soxhlet, se inició el calentamiento y se realizaron al menos, dos ciclos de flujo de solvente. Al finalizar los ciclos, se retiró la muestra del dedal y se eliminó el solvente remanente a través de un secado a 65 °C, durante 30 min. Al mismo tiempo, se hizo de nuevo el montaje Soxhlet para recuperar el solvente. Posteriormente, se retiró de la estufa y se registró el peso de la muestra. El contenido de grasa fue calculado gravimétricamente por diferencia de peso entre la muestra final e inicial (Instituto de Salud Pública Chile, 1990).

Determinación de fibra cruda: Se puso la muestra desengrasada obtenida en un balón de 250 ml, el cual tuvo previamente perlas de ebullición. En él, se adicionaron 100 ml de agua y 1.25 ml de ácido sulfúrico. Luego se puso el balón en una plancha de calentamiento y se conectó a un condensador de serpentín. Luego se contaron 30 min desde el momento que empezó a ebullición. Una vez finalizado, se retiró el balón y se filtró su contenido, empleando una bomba de vacío. Un nuevo proceso se llevó a cabo, adicionando 100 ml de agua y 1,2 g de hidróxido de sodio. Finalmente, se realizó un lavado con 30 ml

de etanol. El sólido retenido se ingresó en la estufa a 65 °C durante 2 h, mientras que la muestra seca fue sometida a calcinación para la realización de la corrección por cenizas. Los cálculos se realizaron tal como se muestra en la ecuación 1.

$$\% \text{ Fibra} = \frac{mf - mc}{mi} \quad (1)$$

Donde:

mi: masa inicial tomada para el análisis.

mf: masa final del sólido filtrado.

mc: masa de cenizas luego del proceso de calcinación.

Determinación de pH y acidez: En un vaso de precipitados de 100 ml, se puso 1 g de muestra y 20 ml de agua destilada y se agitó vigorosamente durante 5 min. Se filtró el contenido, dejando únicamente la solución acuosa, a la cual se le midió el pH. Posteriormente, se realizó una titulación potenciométrica con NaOH 0.1 N, hasta que se alcanzó un pH de 8,2. Los cálculos se realizaron tal como se muestra en la ecuación 2.

$$\% \text{ acidez} = \frac{a * b * c}{d} * 100 \% \text{ m} \quad (2)$$

Donde:

a: volumen gastado en la titulación (L)

b: concentración del NaOH (0.1 N)

c: peso equivalente del ácido láctico 90,08 g/mol

d: peso de la muestra (g) (NTC 5114, 2003)

Procedimiento para la realización de los ensayos de fermentación

Preparación del sustrato para la fermentación:

En un frasco de vidrio tapa rosca, se ingresaron alrededor de 100 g de sustrato de acuerdo con una relación polen: agua 1:1, una vez se preparó el sustrato, se llevó a la autoclave y luego fue sometido a una esterilización (121 °C, 15 min). Se realizaron adicionalmente ensayos con una inclusión de 20% de miel con relación a la mezcla de sustrato, con el fin de establecer si la adición de una fuente externa de carbohidratos favorece el rendimiento del bioproceso.

Preparación del cultivo láctico como inóculo:

En un tubo tapa rosca se colocaron 10 ml de la solución estéril de glucosa. En este tubo se agregó el contenido de un cultivo comercial de bacterias ácido lácticas. Después de haber agitado el tubo con las bacterias ácido lácticas y la glucosa se tomó 1ml y se inoculó la muestra, dependiendo la relación sustrato: agua. De esta manera, se dejaron las muestras en una incubadora a 35°C y se calcularon las nuevas características físicoquímicas de cada una.

Fermentación:

Se tomó 1 ml del cultivo láctico preparado y se puso en el frasco que contiene el sustrato estéril. Se realizó un mezclado homogéneo y se llevó a la incubadora durante ocho días a 35 °C.

Seguimiento microbiológico:

Se realizó un monitoreo microbiológico, a través del conteo de bacterias ácido lácticas al inicio y final del bioproceso, con el fin de evaluar su viabilidad a lo largo de la fermentación. En síntesis, el procedimiento para la siembra

de las bacterias y posterior conteo se indica a continuación (Santambrosio, 2009).

En un tubo tapa rosca que contiene 10 ml de glucosa se ingresó 1 g de muestra inoculada. Se prepararon tubos Eppendorf para la realización de diluciones sucesivas en series de 10, hasta que se alcanzaron concentraciones de 10^{-5} . Posteriormente, se tomaron 100 μ L de la solución obtenida en el tubo tapa rosca y se pasaron a un Eppendorf para obtener la primera dilución. Las diluciones sucesivas se prepararon, haciendo pases de alícuotas de 100 μ L a otros Eppendorf. Al finalizar, se hizo un servido del agar MRS sobre las cajas de Petri. Las cajas de Petri fueron puestas en incubación a 35 °C durante 48 h, tiempo en el cual se realizó el correspondiente conteo de las unidades formadoras de colonias.

Resultados y Análisis

Caracterización del polen

La caracterización del polen apícola de origen cundiboyacense muestra un patrón de caracterización teórico, según el origen de la materia prima. Se obtuvieron porcentajes de humedad 1,8-8,9 %, de grasa 8,3-3,5 %, ceniza 1,4-3,1 %, proteína 16,7-29,5 % (Fuenmayor, 2009).

En los valores expuestos en la Tabla 1 se puede observar que los resultados están acordes con las bases teóricas que se ubican dentro de los rangos de caracterización, mencionadas anteriormente. En cuanto a

pH y acidez se reportan valores de 4,2. Una norma argentina de polen apícola expone que el pH del polen debe estar entre 4 y 6, y una acidez titulable que oscila entre 200 meq/kg y 350 meq/kg (Fuenmayor, 2009), lo que en porcentaje estaría alrededor de 1,8 % y 2,7 % y comparado con la parte experimental, se observa un porcentaje que se adecua en los rangos teóricos, que es de 2,16 %.

Entre tanto, las regulaciones brasileñas sobre el contenido de proteína del polen apícola establecen un valor mínimo del 8 % (peso seco) mientras que las regulaciones argentinas establecen un rango del 15 % al 28 % (peso seco). Según la bibliografía, el polen del altiplano cundiboyacense está por encima del mínimo para los valores anteriores (Fuenmayor, 2009).

En el caso particular de esta investigación, se observa que el porcentaje de proteína fue menor al registrado en las muestras bibliográficas tomadas en el altiplano boyacense; estas diferencias pudieron ser causadas por el origen botánico del polen apícola o algún inconveniente en la experimentación, ya que no se acerca ni siquiera al valor mínimo de 8 %, según las regulaciones brasileñas sobre contenido de proteína en polen.

El contenido medio de cenizas para el polen de abeja colombiano fue 2,5 (± 0.4) g/100 g (base seca) que varía desde 1,5 a 3, 2 % (Fuenmayor, 2009).

Analizando los datos experimentales, se observa que las muestras de ceniza se asemejan a los resultados bibliográficos, con un porcentaje de 1,39 %.

Tabla 1. Caracterización físicoquímica del polen apícola.

| Humedad (%) | Grasa (%) | Ceniza (%) | Proteína (%) | Fibra cruda (%) | pH | Ácido (%) |
|-------------|-------------|-------------|--------------|-----------------|-------------|------------|
| 6,77 ± 0,12 | 7,05 ± 0,53 | 1,39 ± 0,04 | 5,03 ± 0,64 | 23,21 ± 0,18 | 4,46 ± 0,03 | 2,16 ± 0,1 |

Monitoreo de la fermentación

El cultivo Choozit dio resultados satisfactorios en los que se encontró

que en el conteo de UFC después de una fermentación láctica inducida en la mezcla del polen y agua, hay una carga elevada de microorganismos.

Tabla 2. Promedio conteo de UFC del cultivo de bacterias ácido lácticas (Choozit).

| Tratamiento antes de ser fermentado | Tratamiento fermentado | | | |
|-------------------------------------|------------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
| PROMEDIO | 6,08 ± 0,02 | 7,02 ± 0,10 | 7,59 ± 0,02 | 8,56 ± 0,06 |

*Promedio conteo de UFC después de la fermentación.

Los resultados obtenidos señalan que ocho días es un tiempo suficiente para inducir una producción significativa de ácido láctico, conservando un valor apropiado de número de células viables.

Caracterización del polen fermentado

Se evaluaron nuevamente las características físicoquímicas y las respectivas modificaciones, a las cuales fueron sometidas los granos de polen, dentro de la

fermentación y se obtuvo una ponderación alta en los resultados expuestos en la tabla 3, comparando con los resultados arrojados experimentales del polen apícola sin tratamiento de humedad 6,77 ± 0,12, grasa 7,05 ± 0,53, ceniza 1,39 ± 0,04, proteína 5,03 ± 0,64, fibra seca y desengrasada 23,21 ± 0,18, pH 4,46 ± 0,03, ácido 2,16 ± 0,1.

Esto indica que el proceso de fermentación con la mezcla de bacterias Choozit poseen un rendimiento alto dentro de la liberación de ácido láctico y modificación físicoquímica dentro de las características de los granos de polen.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del polen fermentado con inclusión de miel

| Humedad (%) | Grasa | Ceniza | Proteína (%) | Fibra cruda | pH | Acidez |
|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| | (%) | (%) | | (%) | | (%) |
| 49,17 ± 0,78 | 34,91 ± 0,40 | 2,51 ± 0,09 | 10,28 ± 1,35 | 41,69 ± 1,29 | 3,75 ± 0,02 | 8,83 ± 0,02 |

Se observó además que hay una alta correspondencia entre el pH que pasó de $4,46 \pm 0,03$ a $3,75 \pm 0,02$ y la acidez pasó de $2,16 \pm 0,1$ a $8,83 \pm 0,02$ y se encontró que el efecto de la adición del cultivo sobre la producción de acidez es significativo por la interacción del cultivo y el tiempo.

En general se observa la inducción de un incremento en la acidez libre para el cultivo con tratamiento de BAC Choozit® e inclusión de miel, luego de haber fermentado durante ocho días. Una posible explicación de este comportamiento relativamente inusual es que los ácidos orgánicos podrían estar siendo metabolizados en otros ácidos con menor capacidad acidificante, como es el caso de la fermentación maloláctica, común en vinos, en la cual algunos lactobacilos, entre ellos el *L. paracasei* (Du Plessis 2004; Patarata, et al., 2008).

Conclusiones

Por medio de los resultados experimentales se demostró que es posible inducir una fermentación láctica en una matriz conformada por polen apícola, utilizando una mezcla de bacterias Choozit®, por medio de una fermentación a 35 °C para la obtención de un nuevo producto con nuevas características nutricionales para ser incluidas

dentro de un complemento animal. En términos de rendimiento, el cultivo Choozit® demostró tener una buena adaptación en el polen apícola en términos de producción de acidez, descenso de pH y modificación fisicoquímica. Este producto se muestra como una opción dentro del mercado de complementos nutricionales para aves, según los resultados obtenidos como opción para entrar en el mercado, ya que en Colombia se suele depender de otros países que exportan parte de soya y maíz que no alcanzan a suplir las necesidades del productor. La miel intervino satisfactoriamente en el proceso de fermentación del polen apícola, favoreciendo el mantenimiento y crecimiento de los cultivos lácticos, al presentarse como una opción adicional de nutrientes, lo que en términos globales permitió una mejora del bioproceso. El bioproceso arrojó cambios notorios en la proporción disponible de nutrientes, por ejemplo la grasa, que pasó de 7,05 % a 34,91 % o proteína que pasó de 5,03 % a 10,28 %.

Otro dato que resaltar es la incidencia de las bacterias ácido lácticas en los resultados de pH y acidez que pasaron de 4,46 pH a 3,75 y de 2,16 % a 8,83 %, respectivamente, con el tratamiento de BAC Choozit® e inclusión de miel, lo que indica que durante la fermentación produjo ácido láctico, reflejado en los resultados.

Referencias Bibliográficas

- Apimondia (1993). *XXXIII International Congress of Apiculture*. Memorias. Beijing, China.
- Bolaños, N. (s.f.). *Química de alimentos*. Recuperado de <https://books.google.com.co/s?id=8VpJ8foyDiIC&pg=PA127&dq=Determinaci%C3%B3n+de+cenizas+CAFE&hl=es&sa=X&ved=oahUKewi4sqHGgdrPAhWF7iYKHYEVCskQ6AEIGjAA#v=onepage&q=Determinaci%C3%B3n%20de%20cenizas%20CAFE&f=false>
- Du Plessis, H.W. (2004). Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *International Journal of Food Microbiology*, 9,19-29.
- Fuenmayor, C.A. (2009). *Laboratorio de Microbiología*. Bogotá, Colombia: Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.
- Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. (2009). *ICTA. Laboratorio de Microbiología*. Bogotá, Colombia: Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.
- Instituto de Salud Pública Chile. (1990). *Official Methods of Analysis A.O.A.C.* 15th Edition. Recuperado de http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/doc/ambiente%20pdf/GrasSoxhlet.pdf
- Scott, G. (2005). *Biología del desarrollo*. Colombia: Editorial Médica Panamericana.