



Aumento de la inocuidad del polen fermentado con empleo del ácido acético

Increasing the innocuity of the pollen fermented with the use of acetic acid

Autor (es): MSc. Carlos Alberto del Risco Ríos, Téc. Rosalina García Neninger.

Centro de Investigaciones Apícolas, Ministerio de la Agricultura, Carretera Cano-Wajay, Km 0,
El Cano, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana. Teléfonos: 7280 7027 y 7280 7890.

microb1@ciapi.minag.cu

Recibido: 12 – 12 - 19

Aprobado: 14 – 12 - 19

RESUMEN

El ensilaje es un método de bioconservación aplicado al polen apícola y basado en una fermentación ácido láctica. Existen pérdidas económicas por el desarrollo de mohos y levaduras en la superficie de los silos, dado al contacto directo con el oxígeno y la contaminación ambiental. Por tanto, este trabajo tiene como objetivo: Seleccionar la concentración mínima de ácido acético en miel más eficaz para inhibir el desarrollo de mohos y levaduras en la superficie de silos de polen apícola a escala productiva. Fueron probados 0, 1, 3 y 5 % de ácido acético en miel en silos elaborados a escala de laboratorio. Se realizó el recuento de mohos y levaduras, el control visual de los silos, y se compararon los resultados de acidez y pH a través de un análisis de varianza simple y prueba de Tukey. La concentración más eficaz fue probada en 83 silos a escala productiva. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en 92 silos donde solo se empleó miel para cubrir la superficie. El 5 % de ácido acético fue la concentración más eficaz para inhibir los mohos y levaduras a escala de laboratorio. A escala productiva hubo una disminución de los silos no conformes por mohos y levaduras desde un 18,5 a un 0 %; un aumento de los silos sin la detección de mohos y levaduras, desde un 9,8 y 50 % hasta un 32,6 y 90,4 % respectivamente. El ácido acético al 5 % en miel es eficaz para inhibir el desarrollo de mohos y levaduras en la superficie de los silos de polen y de este modo aumentan la producción y la inocuidad del producto final.

Palabras clave: ensilaje, polen apícola, bacterias ácido lácticas, fermentación.

ABSTRACT. Silage is a method of bioconservation applied to bee pollen and is based on a lactic acid fermentation. There are economic losses in the silage process due to the development of molds and yeasts on the silos surface. Microbial development is due to direct contact with oxygen and environmental pollution. Therefore, this work aims to: Select the minimum and effective concentration of acetic acid diluted in honey to inhibit the development of molds and yeasts on the surface of apicultural pollen silos on a productive scale. 0, 1, 3 and 5% acetic acid were tested in silos made on a laboratory scale. Mold and yeast count and visual control of silos were performed. The acidity and pH results were compared through a simple variance analysis and Tukey test. The most effective concentration was tested in 83 silos on a productive scale. The results were compared with those obtained in 92 silos where honey was used to cover the surface. 5% acetic acid was the most effective concentration to inhibit mold and yeast on a laboratory scale. On a productive scale there was a decrease in non-compliant silos due to molds and yeasts from 18.5 to 0%; an increase in silos without the detection of

molds and yeasts, from 9.8 and 50% to 32.6 and 90.4% respectively. Acetic acid diluted to 5% in honey is effective in inhibiting the development of molds and yeasts on the surface of pollen silos and thus increases the production and safety of the final product.

Keywords: silage, bee pollen, lactic acid bacteria, fermentation.

INTRODUCCIÓN

El polen apícola seco es un alimento beneficioso para la salud humana con una amplia gama de propiedades nutricionales y terapéuticas.¹⁻⁶ Sin embargo, en varios países y Cuba se ha comprobado que tiene altos recuentos de los microorganismos indicadores de la calidad sanitaria, principalmente: microorganismos a 30° C, hongos filamentosos, levaduras y coliformes totales.⁶⁻¹¹

Con el propósito de disminuir la microbiota del polen, en el Centro de Investigaciones Apícolas se lleva a cabo el ensilaje dirigido de este producto a una escala productiva de 35 kg/silos. Se emplea una fina capa de miel para cubrir la superficie aeróbica de los silos y un inóculo ácido láctico heterofermentativo. La superficie aeróbica de estos silos, es sensible al desarrollo de mohos y levaduras dado a que está en contacto directo con el oxígeno ambiental y esto ha ocasionado pérdidas económicas.

El ensilaje es una práctica conocida en todo el mundo, se realiza con el objetivo de preservar los alimentos y conservar todo su valor nutritivo.^{12, 13,14} Las bacterias ácido lácticas se aplican como inóculo inicial en los ensilajes (ensilajes dirigidos). Estas causan la acidificación de la materia prima por la producción de ácido láctico (homofermentativas) o ácidos láctico y acético (heterofermentativas) como principales compuestos inhibidores de los microorganismos.¹⁵ Otras sustancias inhibidoras también se pueden producir, tales como: diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina (b- hidroxipropionaldehído) y bacteriocinas.^{16,17,18}

Es importante en los silos de polen la aplicación de un antifúngico económico, asequible, inóculo, eficaz y que altere lo menos posible las características organolépticas del producto final. Por estas razones pudiera ser uno de los metabolitos producidos por las bacterias ácido lácticas en el proceso fermentativo y que se aplique en la superficie aeróbica de los silos desde un inicio de la incubación. Los compuestos fundamentales producidos durante la fermentación por bacterias ácido lácticas heterofermentativas son el ácido láctico y el acético. El ácido láctico baja el pH más rápido que el acético, inhibiendo el crecimiento de bacterias. Sin embargo, el ácido acético es un mayor inhibidor de mohos y levaduras, y mantiene en los silos una mayor estabilidad aeróbica que el láctico.^{15, 19,20}

Por tanto, este trabajo tiene como objetivo: Seleccionar la concentración de ácido acético en miel más eficaz para inhibir el desarrollo de mohos y levaduras en la superficie de silos de polen apícola a escala productiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

En una primera fase a escala de laboratorio (80 g) se elaboraron silos de polen apícola a 36 % de humedad y con empleo de un inóculo ácido láctico liofilizado.²¹ Se cubrieron las superficies con miel a distintas concentraciones de ácido acético 0, 1, 3, y 5 %. Los silos fueron incubados por 15 días a 35° C. Las variables respuestas fueron: hongos filamentosos y levaduras,²² acidez y pH,^{23,24} aumento o no de la masa ensilada y el desarrollo visible de mohos y levaduras en la superficie de los silos. Esta última variable comprobada por microscopía.

Los datos de acidez y pH fueron procesados a través de un análisis de varianza simple y prueba de Tukey, con un grado de confianza del 95 % en el paquete estadístico IBM SPSS Versión 22.

La concentración de ácido acético más eficaz en la primera fase se probó en 83 silos elaborados a escala productiva (35 kg) y comparados los resultados con 92 silos de igual escala y elaborados entre el 2014 e inicios del 2017, donde solo se empleó miel para cubrir la superficie. Las variables respuestas fueron: hongos filamentosos y levaduras,²² y el desarrollo visible de mohos y levaduras en la superficie de los silos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al inicio todos los silos presentaron recuentos de levaduras y mohos superiores a lo establecido para el polen apícola ensilado (Recuento de levaduras y mohos combinado $\leq 10^3$ UFC/g).²⁵ Una vez fermentados, disminuyeron los recuentos iniciales pero con mayor eficacia a partir del empleo del ácido acético, con un máximo de inhibición en 5 %, tabla 1. A esta concentración y en todos los silos, los dos parámetros microbiológicos ensayados fueron inferiores a 10^2 UFC/g. Es importante destacar que las levaduras fueron más sensibles que los mohos a la fermentación láctica y al ácido acético empleado, puesto que fueron inferiores a 10^2 UFC/g en todos los silos a partir del 1 %. Además, se observa que ninguno de los silos donde se empleó el ácido acético presentó crecimiento visible en la superficie y sí en cuatro de los silos donde no fue empleado.

Está demostrada la propiedad antifúngica del ácido acético,^{15, 19,20} así como el efecto sinérgico cuando se combina con el ácido láctico, con lo cual disminuyen las concentraciones mínimas inhibitorias de ambos ácidos por separados.²⁰ La inoculación de silos de maíz con bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus hilgardii*) dio como resultado una mayor cantidad de ácido acético resultó, un recuento de levadura más bajo y una mayor estabilidad aeróbica.²⁶

Al comparar las medias de las variables acidez y pH, no hubo diferencia significativa entre los silos fermentados y sí con respecto a las medias iniciales. Esto demuestra la acidificación del medio por el inóculo y que el empleo del ácido acético, a las concentraciones ensayadas, no altera de forma significativa la concentración de ácidos orgánicos que se producen durante la fermentación. Esto es relevante dada a la importancia de evitar el desarrollo de mohos y levaduras con la mínima modificación de las características generales del producto final.

Resultados similares de acidez y pH fueron obtenidos por del Risco *et al.* en silos de polen apícola a escala de laboratorio, con el objetivo de obtener los niveles más adecuados de las variables controladas: inóculo y humedad.²¹ Todos los silos fermentados aumentaron su masa, lo cual evidencia, junto con el incremento de la acidez y pH, el desarrollo microbiano y el cúmulo de CO₂ en el interior de los silos. Esto garantiza la atmósfera anaerobia necesaria para el desarrollo de los lactobacilos, así como, la inhibición de otras especies microbianas, y de este modo prevalece el perfil fermentativo deseado.

En la tabla 2 se observa el impacto de la aplicación del ácido acético al 5 % en miel sobre silos elaborados a escala productiva (35 kg), con lo cual se logró eliminar el crecimiento visible de mohos y levaduras en la superficie de los silos, recuperar las pérdidas existentes (18,5 % de las producciones) por inconformidad microbiológica del producto final, así como, aumentar el número de silos fermentados sin la detección de mohos y levaduras en un 22,8 y 40,4 % respectivamente. Estos últimos datos demuestran una vez más que las levaduras fueron más sensibles al empleo de ácido acético.

Tabla 1. Control microbiológico y químico de silos de polen a escala de laboratorio.

Ácido acético en miel (%)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	Acidez (meq/10g)	pH	Mohos y levaduras visible	Aumento de la masa ensilada
0-Inicial	4,5 x 10 ⁵	2,5 x 10 ²	2,53	4,72	-	no
0-Inicial	9 x 10 ⁵	3 x 10 ³	2,68	4,68	-	no
0-Inicial	2,5 x 10 ⁵	6,5 x 10 ²	2,43	4,71	-	no
0-Inicial	8,5 x 10 ⁵	8 x 10 ²	2,51	4,65	-	no
0-Inicial	3 x 10 ⁵	4 x 10 ²	2,59	4,7	-	no
-	-	-	2,55 (0,093) a	4,69 (0,028) a	-	-
0	1,5 x 10 ²	2 x 10 ²	5,02	4,01	Si	si
0	1,5 x 10 ²	< 10 ²	5	4,02	no	si
0	3 x 10 ²	< 10 ²	5,12	4,02	si	si
0	2,5 x 10 ²	< 10 ²	5,3	4	Si	si
0	2 x 10 ²	< 10 ²	5,2	4,01	Si	si
-	-	-	5,13 (0,125) b	4,012 (0,008) b	-	-
1	1,5 x 10 ²	< 10 ²	5,12	4,02	no	si

1	< 10 ²	< 10 ²	5	4	no	si
1	1 x 10 ²	< 10 ²	5,3	3,98	no	si
1	< 10 ²	< 10 ²	5,12	4,01	no	si
1	1,5 x 10 ²	< 10 ²	5,1	4	no	si
-	-	-	5,13 (0,108) b	4,002 (0,015) b	-	-
3	10 ²	< 10 ²	5,02	4,02	no	si
3	10 ²	< 10 ²	5,2	4,01	no	si
3	< 10 ²	< 10 ²	5,6	3,99	no	si
3	< 10 ²	< 10 ²	5,02	4,02	no	si
3	< 10 ²	< 10 ²	5,14	4,02	no	si
-	-	-	5,20 (0,239) b	4,012 (0,013) b	-	-
5	< 10 ²	< 10 ²	5,38	4,02	no	si
5	< 10 ²	< 10 ²	5,22	4,02	no	si
5	< 10 ²	< 10 ²	5,3	4,01	no	si
5	< 10 ²	< 10 ²	5,4	4,02	no	si
5	< 10 ²	< 10 ²	5,1	4,03	no	si
-	-	-	5,28 (0,123) b	4,02 (0,007) b	-	-

Tabla 2. Efectos del empleo del ácido acético en silos de polen a escala productiva

Parámetros	Enero 2014 - mayo 2017	Junio 2017-diciembre 2018
Cantidad de silos	92	83
Cubierta	Miel	Miel - ácido acético 5 %
Silos con desarrollo visible de hongos y levaduras en la superficie (%)	14,8	0
Silos no conformes por hongos y levaduras (%)	18,5	0
Silos sin detección de mohos (%)	9,8	32,6
Silos sin detección de levaduras (%)	50	90,4

CONCLUSIONES

El empleo del ácido acético al 5 % en miel es eficaz para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras en la superficie de silos de polen a escala productiva y de este modo aumentar la producción y la inocuidad del polen fermentado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. El-Kholy WM, Soliman TN, Darwish AMG. Evaluation of date palm pollen (*Phoenix dactylifera* L.) encapsulation, impact on the nutritional and functional properties of fortified yoghurt. PLoS One. 2019; 14(10): e0222789.

2. Li Q, Sun M, Wan Z, Liang J, Betti M, Hrynets Y, Xue X, Wu L, Wang K. Bee Pollen Extracts Modulate Serum Metabolism in Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Mice with Anti-Inflammatory Effects. *J Agric Food Chem.* 2019; 67(28): 7855-7868.
3. Themelis T, Gotti R, Orlandini S, Gatti R. Quantitative amino acids profile of monofloral bee pollens by microwave hydrolysis and fluorimetric high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 173:144-153.
4. Campos MGR, Bogdanov S, Almeida LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, *et al.* Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World.* 2008; 47(2): 156-163.
5. Silva TMS, Camara CA, Lins ACS, Agra MF, Silva EMS, Reis IT, *et al.* Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2009; 81(2): 173-178.
6. Alvarez E, campos J. Diversidad y criterios microbiológicos en polen usado como suplemento alimenticio para humano. *Revista Digital@UAQRO.* 2017; 10(2): 218-219.
7. Nikolaieva N, Kačániová M, González JC, Grygorieva O, Nôžková J. Determination of microbiological contamination, antibacterial and antioxidant activities of natural plant hazelnut (*Corylus avellana* L.) pollen. *J Environ Sci Health B.* 2019; 54(6): 525-532.
8. Kacániová M, Pavlicová S, Hařčík P, Kociubinski G, Kmazovická V, Sudzina M, *et al.* Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.* 2009; 56(3): 285-295.
9. Puig Y, del Risco C, Álvarez V, Leiva V, Garcías R. Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2012; 43(1): 23-27
10. Valdés G, García O, Ruiz M, Martín M, Giral T. Evaluación de las condiciones higiénicas del polen. *Zootécnica.* 1992; 2(1): 87-93.
11. Valdés G, Martín M, García O, Ruíz M, Giral T. Evaluación de la calidad sanitaria de diferentes modelos de trampas de polen. *Zootécnica.* 1992; 2(1) 79-86.
12. Kung L Jr, Shaver RD, Grant RJ, Schmidt RJ. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 2018; 101(5):4020-4033.
13. Ávila CLS, Carvalho BF. Silage fermentation-updates focusing on the performance of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2019.

14. Fernández M, Zambrano S, Zumba L, López G. Consideraciones generales sobre el proceso de elaboración de silos. Revista científico-educacional de la provincia Granma. 2017; 13(3).
15. Muck RE, Nadeau EMG, McAllister TA, Contreras Govea FE, Santos MC, Kung L Jr. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. J. Dairy Sci. 2018; 101(5):3980-4000.
16. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microbiology Reviews. 1995; 59: 171-200.
17. Juturu V, Wu JC. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Biotechnol Adv. 2018; 36(8):2187-2200.
18. Kareb O, Aïder M. Quorum Sensing Circuits in the Communicating Mechanisms of Bacteria and Its Implication in the Biosynthesis of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria: a Review. Probiotics Antimicrob Proteins. 2019.
19. Mier M. caracterización del valor nutritivo y estabilidad aeróbica de ensilados en forma de microsilos para maíz forragero. Tesis de maestría. 2009.
20. Caro C, León A. Inhibición del crecimiento de *Aspergillus ochraceus* mediante panela fermentada con gránulos de Kefir de agua. VITAE, Revista de la facultad de química farmacéutica. 2014; 21(3): 191-200.
21. Del Risco Ríos CA, Puig Peña Y, Rodríguez Castro G, Leiva Castillo V, García Neninger R, Artilles Cervera ZM. Selección de la humedad y bacteria ácido láctica más eficaz para la fermentación del polen apícola a escala de laboratorio. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2016; 47(2): 86-92.
22. NC 1004:2016. Microbiología de los alimentos de consumo humano y animal – Guía general para la enumeración de levaduras y mohos – Técnica a 25° C.
23. NC-ISO 750: 2001. Producto de frutas y vegetales. Determinación de la acidez valorable.
24. NC-ISO 1842: 2001. Producto de frutas y vegetales. Determinación del pH.
25. NRAG 341:2017 Apicultura. Pan de abejas industrial dirigido. Especificaciones.
26. Ferrero F, Prencipe S, Spadaro D, Gullino ML, Cavallarin L, Piano S, Tabacco E, Borreani G. Increase in aflatoxins due to *Aspergillus* section Flavi multiplication during the aerobic deterioration of corn silage treated with different bacteria inocula. J Dairy Sci. 2019; 102(2):1176-1193.