

## RESULTADOS DEL ESTUDIO PRELIMINAR DE LA RELACIÓN DE HUMEDAD Y ACTIVIDAD DE AGUA (AW) EN LA MIEL DE ABEJAS Y LA EFECTIVIDAD DEL AGAR MIEL EN EL CRECIMIENTO DE *SACCHAROMYCES BISPORUS* VAR *MELLIS*.

**Autores:** Gisela Valdés González\*, Ana Silvia Falco Manzo\*\*, Eva Sevillano\*\*, Elin Caridad Mora Laguna\*\*, Miguel Ruiz Rodríguez\* y Jesús Abreu\*\*.

\* Estación Experimental Apícola

\*\* Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia.

### Resumen

La miel de abejas, producto imperecedero que puede sufrir alteración por fermentación motivada por microorganismos osmotolerantes provocándose el deterioro.

Su consumo directo o como ingrediente tanto en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética por sus propiedades nutricionales y biológicas que presenta, hace necesario garantizar una calidad óptima por lo que es necesario desarrollar correctas reglas de higiene en la extracción y almacenamiento, como también mantener el producto con reducida cantidad de humedad que garantice una baja aw para evitar de esta forma que se desencadene un proceso de fermentación.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la relación de la humedad de la miel y la aw con el crecimiento de una levadura osmotolerante (*Saccharomyces bisporus* var) empleando 2 medios de cultivo: Agar Miel y Agar Extracto de Malta ambos a 50° Brix para determinar la eficiencia de los mismos en la enumeración de este grupo de microorganismos para ello se prepararon diferentes humedades (18-21%) determinándose los correspondientes valores de aw hasta los 90 días y los resultados fueron que el Agar Miel a 50° Brix y Agar Extracto de Malta a 50° Brix con sirope de glucosa-sacarosa no difieren significativamente aunque este ultimo presentó mejores condiciones de solidificación y transparencia, la miel de abejas de 18.2% de humedad y aw de 0.635 fue la menos propicia para el crecimiento del microorganismo, no ocurrió deterioro de las mieles con de humedad de 18.2 y 19.8%, solo fue evidente a 21.3% de humedad y con aw de 0.696 al finalizar el tiempo de estudio, encontrándose diferencias significativas entre las humedades, los tiempos y la interacción entre ellos

### Introducción.

La miel de abejas puede ser considerada un alimento imperecedero debido a que presenta un alto contenido de azúcares (80%), bajos valores de humedad y de aw (no mayor de 0.72) y a la acidez que presenta ( $\text{pH} \leq 4.2$ ), no obstante la alteración por fermentación motivada por microorganismos osmotolerantes es la causante del deterioro de este producto.

La miel no es sometida a transformaciones, modificaciones, purificaciones ni a ningún tipo de manipulación industrial como sucede con los alimentos modernos en su mayor parte siendo por tanto un alimento ideal que conserva todos sus componentes, solo se considera en algunos casos una pasteurización a pedido del cliente.

Este producto apícola además de significar un alimento ideal por su composición química constituye también un producto con propiedades biológicas que permite un uso terapéutico como germicida en la cura de heridas, quemaduras y cirugía, entre otras. (Molan, 1992, Valdés y col, 2000, Molan P y colb, 2001 y Molan P, 2006 citados por Aguilera. G y colb, 2009)

Además de su consumo directo es utilizado como ingrediente en la elaboración de otros productos tanto en la industria alimenticia como en el desarrollo actual de la medicina natural, por lo que es necesario garantizar una calidad óptima del producto tanto físico-químico como microbiológico.

Los microorganismos de la miel proceden principalmente del néctar de las flores y de las abejas, donde se ha comprobado que las levaduras y algunas bacterias provienen del néctar y del contenido intestinal, además puede adquirir los presentes en el suelo del apiario, en las áreas de extracción y del almacenamiento (White citado por Poncini, L y Wimmer, 1985).

La microflora de un producto depende directamente de las características físico-químicas y de la elaboración del mismo, lo que condiciona la presencia de una u otra especie. Es por ello que la alta presión osmótica, la acidez y el potencial oxidoreductor son los principales factores que limitan la presencia o multiplicación de los microorganismos en la miel (Ano, 1970; Tysset y colb, 1980 y Periz, 1984).

En la miel podemos encontrar microorganismos como flora normal los géneros *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor* en forma de esporas que no pueden multiplicarse y que no causan daños al hombre, pero las especies de levaduras osmófilas como su nombre lo indica son las únicas capaces de desarrollarse en productos con alta concentración de azúcar y provocar un proceso fermentativo que provoca el deterioro del producto al aumentar su número. Entre ellas se encuentra el género *Saccharomyces* y en particular las especies *S. bisporus*, *S.*

rouxii y *S. baillii*, su acción depende de su número y el aumento de agua libre ( $a_w$ ) durante el proceso de extracción y almacenamiento de la miel de abejas. El contenido de humedad y la  $a_w$  son factores que posibilitan el crecimiento de los microorganismos y el desarrollo de diferentes reacciones químicas de deterioro de los productos.

Por estas razones es importante velar por desarrollar correctas reglas de higiene en la extracción y almacenamiento de la miel como también extraer y mantener un producto con reducida cantidad de humedad que garantice una baja  $a_w$  para evitar de esta forma que se desencadene un proceso de fermentación.

No existe en el país una regulación oficial que considere la determinación de la presencia de las levaduras osmófilas ni tampoco los límites de aceptación de las mismas en los productos alimenticios y en el caso de las producciones de la apicultura se hace necesario por las características de los productos y por ser este el grupo de microorganismos capaces de provocar su deterioro

Con respecto a los medios de cultivo para la determinación de este grupo de microorganismos aparece en la literatura que Pitt y Hocking, Stecchini y Beuchat citados por Baros y Lenovich, 1992 no determinaron la existencia de un medio de cultivo estandar para la enumeración de este grupo de microorganismos sino que plantean que el mejor medio de cultivo debe ser determinado sobre el tipo de alimento que se requiere analizar, Piunick y Gabis citados por Baros y Lenovich, 1992 proponen la utilización del Agar de malta, extracto de levadura con 40% de glucosa p/p y para el caso de la miel de abejas Poncini y Wimmer, 1985 trabajaron con un medio de cultivo que consistió en emplear la miel como sustrato al 25, 50, 75 y 100% (diluciones con agua esterilizada y un 2% de Agar (Agar No 1 Oxoid) y obtuvieron como resultado que el medio de cultivo preparado al 50% de miel de abejas fue el que mejor resultado ya que manifestó condiciones ideales de desarrollo tanto para levaduras, como para bacterias y el crecimiento exponencial se mantuvo incluso después de 3 semanas de incubación

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación del % de humedad de la miel, la  $a_w$  con el crecimiento de una levadura osmotolerante empleando 2 medios de cultivo: Agar Miel y Agar Extracto de Malta ambos a 50° Brix, para determinar la eficiencia de los mismos en la enumeración de este grupo de microorganismos.

## **Materiales y Métodos.**

Se utilizó 20 Kg de miel de abejas polifloral clase A proveniente de la UBPC de Rodas de la provincia de Camaguey.

Para conocer la calidad de la miel se procedió a realizarle análisis físico-químicos y microbiológicos.

Los análisis físico-químicos consistieron en la determinación de humedad, conductividad eléctrica, azúcares reductores, índice de hidroximetilfurfural y actividad diastásica (NC: 371:04). La calidad sanitaria se determinó utilizando como diluyente agua peptonada al 0.1%, para la determinación del Conteo total de microorganismos

mesófilos viables fue empleado el método de placa vertida en el medio de cultivo Agar para conteo en placas a 37 °C por 48 horas de incubación, para el Conteo de hongos filamentosos y levaduras viables se utilizó Agar Extracto de Malta acidificado con ácido láctico al 10% a pH 3.5-4.0 e incubadas a 25 °C por 3-5 días, el Conteo de coliformes totales fue realizado en Agar Rojo Violeta Bilis por 24 horas a 44 ° de incubación y el Conteo de levaduras osmofílicas fue utilizando Agar Miel a 50° Brix (Poncini y Wimmer, 1985) y Agar Extracto de Malta suplementado con 2 % de peptona al cual le fue añadido en condiciones de esterilidad un sirope de glucosa-sacarosa a 50° Brix

Posteriormente se prepararon porciones de 1 kg de miel a las cuales se les adicionó agua destilada estéril hasta alcanzar valores de humedad entre 18-21% que fue determinado por el método descrito en NC: 371:04y a las que se les determinó la aw mediante un higrómetro electrónico marca Novasina con un sensor de cloruro de litio a 30 °C.

La miel con cada una de las humedades fueron dispensadas a razón de 100 g de miel en frascos ámbar estériles hasta obtener 3 replicas, las que fueron inoculadas con un cultivo fresco de una cepa de *Saccharomyces bisporus var mellis* quedando inoculada a una concentración final de 10<sup>5</sup> ufc/g.

Esta cepa de *Saccharomyces bisporus var mellis* fue aislada de una muestra de miel de abejas de *Melipona*, con evidente proceso fermentativo y durante su identificación quedó probada su capacidad de crecer en un medio de cultivo con 60% p/p de glucosa.

Las muestras de miel de abejas a diferentes % de humedad e inoculadas fueron sometidas a la enumeración de este microorganismo (*Saccharomyces bisporus var mellis*) a diferentes tiempos 0, 10, 25, 30, 40, 70 y 90 días donde permanecieron almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Para la cuantificación del crecimiento de este microorganismo se procedió a sembrar en los medios de cultivos de Agar Miel a 50° Brix y Agar Extracto de Malta a 50° Brix con sirope de glucosa-sacarosa. El conteo de las colonias fue

efectuado entre los 7-10 días después de una incubación a 28 °C .

El análisis estadístico aplicado a los resultados consistió en un test de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos y aplicar transformación en Log X, Anova Factorial con 3 niveles y el test de Rangos Múltiples de Duncan.

#### Resultados y Discusión.

Se encontró que los resultados obtenidos de los análisis físico-químicos y sanitarios realizados (ver tabla 1) para conocer las condiciones o calidad de la miel empleada en este estudio, que todos los parámetros físico-químicos se encontraron con las condiciones establecidas (según NC; 371:04) y con una buena calidad microbiológica, incluso con ausencia de levaduras osmotolerantes, señalando que las condiciones en que se llevó a cabo el proceso de extracción y beneficio de la miel de abejas fue realizado con buenas prácticas de higiene y además favorecidas por el bajo contenido de humedad (17.2%) que presentó.

Tabla 1: Resultados de la caracterización físico-química y microbiológica de la miel.

Parámetros físico-químicos	
Humedad (%)	17.4
Azúcares reductores (%)	68.5.
Hidroximetil furfural (HMF)(mg/kg)	6.72
Diastasa (U Schade)	27.26
Parámetros microbiológicos	
Conteo total de microorganismos mesófilos viables (ufc/g)	5 x 10 <sup>1</sup>
Conteo de hongos filamentos (ufc/g)	1 x 10 <sup>1</sup>
Conteo de levaduras viables (ufc/g)	< 10
Conteo de levaduras osmofílicas (ufc/g)	< 10
Conteo de coliformes totales (ufc/g)	< 10

Los valores de humedad y la *a<sub>w</sub>* correspondientes a cada muestra (ver tabla 2), abarcaron desde 18.2 a 21 % siendo este último superior al valor máximo de aceptación (21%) para este producto. Estas fueron las condiciones de *a<sub>w</sub>* y humedad a las cuales se enfrentó el microorganismo en este estudio.

Tabla 2: Resultados de los % de humedad y el correspondiente valor de *a<sub>w</sub>* .

Humedad (%)	aw
18.2	0.635
19.8	0.662
20.5	0.669
21.3	0.696

Las muestras a pesar de los valores bajos de aw incluso 0.669 no impidió el crecimiento de las levaduras, lo cual coincide con lo reportado por Alcalá (citado por Esteban Quilez. y Marcos Barrado, 1976), quien encontró crecimiento de estos microorganismos a valores de 0.68.

A pesar de la variación de la humedad que fue casi de un 1% entre ellas no hubo un comportamiento similar de la aw pudiéndose pensar que esto se corresponde por lo planteado por Alcalá y Anon ((citados por Poncini, L y Wimmer, 1985) que plantearon que no siempre existe una estrecha relación entre el contenido de agua y la presión del agua en la miel de abejas, lo que pudiera deberse a la avidez de los azúcares presentes en la miel de absorber las moléculas de agua, a su carácter de ser altamente higroscópico.

Para los valores de humedad de 18.2 y 19.8% (ver tabla 3) a los 7 días hubo una disminución del conteo inicial de *Saccharomyces bisporus var mellis* que se mantiene durante el tiempo de estudio y para el caso de la humedad más baja a los 70 días se encontró otra disminución de casi también un logaritmo para después finalmente una recuperación pero siempre con un valor por debajo del inicial.

Tabla 3: Valores medios del conteo de *Saccharomyces bisporus var mellis* (ufc/g)

Tiempo (días)	Humedad 18,2%	Humedad 19,8%	Humedad 20,5%	Humedad 21,3%



	Agar Miel	Agar Malta	Agar Miel	Agar Malta	Agar Miel	Agar Malta	Agar Miel	Agar Malta
0	2,9x10 <sup>5</sup>	2,4x10 <sup>5</sup>	4,1x10 <sup>5</sup>	3,6x10 <sup>5</sup>	2,1x10 <sup>5</sup>	4,7x10 <sup>5</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	2,7x10 <sup>5</sup>
7	3,0x10 <sup>4</sup>	1,9x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	2,2x10 <sup>4</sup>	3,4x10 <sup>4</sup>	3,0x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>
15	1,0x10 <sup>4</sup>	4,3x10 <sup>3</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	4,0x10 <sup>4</sup>	9,2x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>
30	2,4x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>4</sup>	6,1x10 <sup>4</sup>	7,1x10 <sup>4</sup>	9,2x10 <sup>4</sup>	8,1x10 <sup>4</sup>	4,5x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>6</sup>
40	3,1x10 <sup>4</sup>	2,7x10 <sup>4</sup>	6,8x10 <sup>4</sup>	8,6x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	1,3x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>6</sup>	4,1x10 <sup>6</sup>
70	3,0x10 <sup>3</sup>	3,8x10 <sup>3</sup>	2,5x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>5</sup>	3,3x10 <sup>5</sup>	6,9x10 <sup>6</sup>	2,7x10 <sup>6</sup>
90	2,6x10 <sup>4</sup>	4,7x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	1,0x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>

Igualmente con las humedades de 20.5 y 21.3% hubo un detrimento del conteo a los 7 días, y para el menor valor de estas humedades un aumento a los 40 y vuelve a disminuir a los 90 días, no sucediendo de igual forma para el mayor valor de humedad donde siguió en aumento a partir de los 15 días para finalizar con valores de 107 ufc/g

El ligero decremento del conteo en un orden logarítmico detectado a los 7 días (ver figuras 1,2,3,4) debe estar provocado por el mecanismo de adaptación de la cepa a las nuevas condiciones de la miel en estudio, la célula se enfrasca a un proceso de adaptabilidad y recuperación para lograr su estado de homeostasis (Leitner, 1994) mecanismo para adaptarse a un medio adverso, la célula debe hacer cambios en la composición de la membrana, en el sistema enzimático y en el pH interno fundamentalmente, lo cual conlleva a un elevado gasto energético que no le permite reproducirse manteniéndose por ello en una fase de latencia.

Figura 1. Crecimiento de *Saccharomyces bisporus var mellis* en los medios de cultivo a 18.2% de humedad

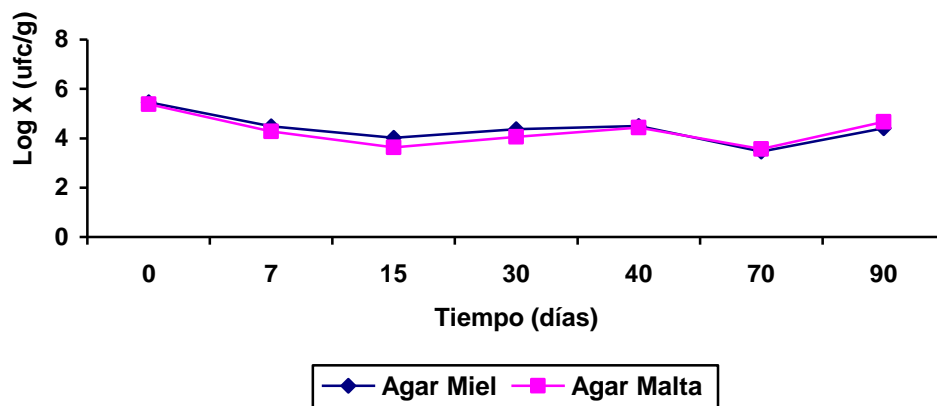
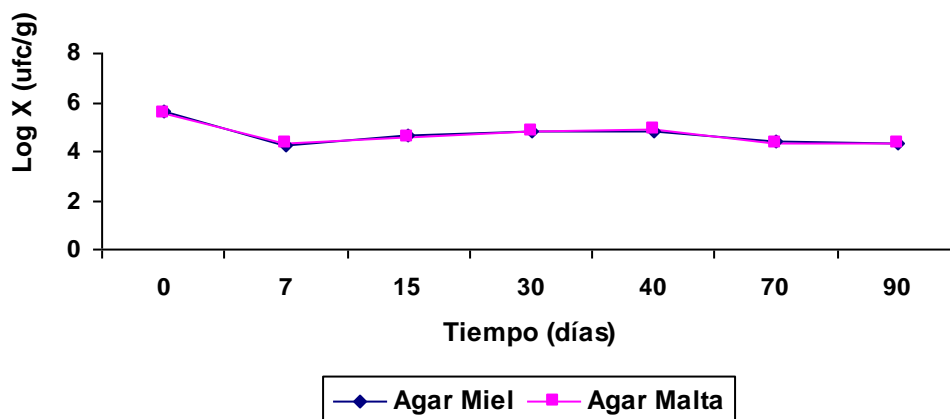


Figura 2. Crecimiento de *Saccharomyces bisporus var mellis* en los medios de cultivo a 19.8 % de humedad



02468071530407090Tiempo (días)Log X (ufc/g)Agar MielAgar Malta



Figura 3. Crecimiento de *Saccharomyces bisporus var mellis* en los medios de cultivo a 20.6 % de humedad

02468071530407090Tiempo (días)Log X (ufc/g)Agar MielAgar Malta

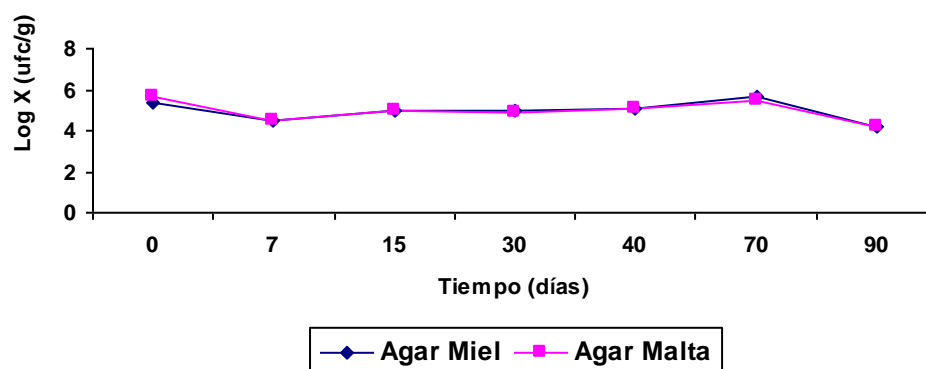
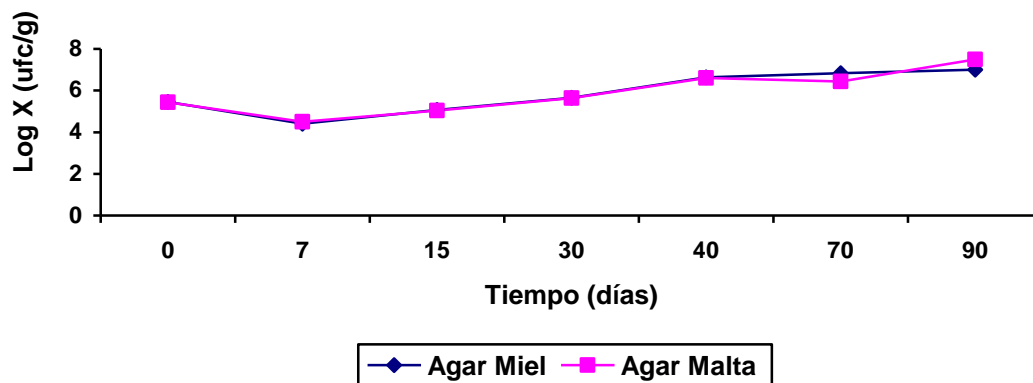


Figura 4. Crecimiento de *Saccharomyces bisporus var mellis* en los medios de cultivo a 21.3 % de humedad

02468071530407090Tiempo (días)Log X (ufc/g)Agar MielAgar Malta



En el caso de las humedades de 18.2 y 19.8% con  $a_w$  de 0.635 y 0.662 respectivamente la levadura prácticamente no salió de la fase de latencia (no alcanzó ni superó el conteo inicial). Estos resultados están avalados por los encontrados por Pinvick (1980) que plantea que una  $a_w$  por debajo de 0.65 impide el desarrollo microbiano en las mieles, mientras que para las restantes humedades que se corresponden con valores superiores de  $a_w$  (0.669 y 0.696) hay un ligero incremento en el conteo sobre todo para la de mayor humedad que se hace más acentuado y supera el inicial hasta el final del tiempo de estudio, estas condiciones fueron más favorables para el desarrollo de *Saccharomyces bisporus var mellis*. En el análisis estadístico se encontró diferencias significativas para  $p < 0.001$  entre los tratamientos, los tiempos y las humedades.

Aplicando el test Rangos Múltiples de Duncan para la variable tiempo (ver tabla 4) resultó que 7 y 15 días no difieren significativamente y si del resto, fueron los de menor valor de conteo correspondiéndose con el análisis de los resultados antes mencionados (una fase de latencia) de la existencia de un detrimento del conteo a los 7 días y 15 excepto para la miel de mayor humedad. Para el caso de la humedad (ver tabla 5) todas difieren entre ellas correspondiéndose con que a medida que aumenta el valor de humedad hay un mayor conteo del

microorganismo

Tabla 4. Resultados del test de Duncan de los valores del conteo de *Saccharomyces bisporus var mellis* con la variable tiempo para una n de 25

Tiempo(días)	Valor Medio (ufc/g)
0	2,9x10 <sup>5</sup> a
40	1.8x10 <sup>5</sup> ab
70	1.1x10 <sup>5</sup> bc
90	1.0x10 <sup>5</sup> bc
30	8x10 <sup>4</sup> c
15	4.3x10 <sup>4</sup> d
7	2x10 <sup>4</sup> d

Leyenda: letras diferentes difieren significativamente

Tabla 5. Resultados del test de Duncan de los valores del conteo de *Saccharomyces bisporus var mellis* con la variable humedad para una n de 42

Humedad (%)	Valor Medio (ufc/g)
21.3	7x10 <sup>5</sup> a
20.5	1x10 <sup>5</sup> b
19.8	5x10 <sup>4</sup> c
18.2	2x10 <sup>4</sup> d

Leyenda: letras diferentes difieren significativamente

Entre los medios de cultivo empleados Agar Miel a 50° Brix y Agar Extracto de Malta a 50° Brix con sirope de glucosa-sacarosa por los resultados de los valores del conteo del microorganismo se encontró que no difieren significativamente entre ellos, luego pueden ser utilizados indistintamente para realizar esta determinación

en miel de abejas de *Saccharomyces bisporus var mellis*, microorganismo que durante su aislamiento e identificación fue demostrada su capacidad de crecer en una concentración de glucosa del 60% p/p, por lo que se puede afirmar el empleo de estos medios en la determinación de levaduras osmotolerantes. El único inconveniente fue que el medio Agar Miel a 50° Brix presentó una solidificación deficiente y una turbidez o opalescencia que dificultó la observación y conteo de colonias pequeñas.

Con respecto a los medios utilizados se obtuvieron resultados comparables al probar sobre el mismo producto como recomienda Pitt y Hocking, Stecchini y Beuchat, Piunick y Gabis citados por Baros y Lenovich, 1992 donde su recomendación fue la utilización de Agar de malta.

#### **Conclusiones.**

1. El Agar Miel a 50° Brix y Agar Extracto de Malta a 50° Brix con sirope de glucosa-sacarosa presentaron iguales resultados del conteo de *Saccharomyces bisporus var*
2. El Agar Extracto de Malta a 50° Brix con sirope de glucosa-sacarosa presentó mejores condiciones de solidificación y transparencia
3. La miel de abejas de 18.2% de humedad y aw de 0.635 fue la menos propicia para el crecimiento de la especie *Saccharomyces bisporus va*.
4. Durante 90 días no ocurrió deterioro de las mieles con los valores de humedad de 18.2 y 19.8%.
5. El deterioro de la miel fue evidente al valor de 21.3% de humedad y con aw de 0.696
6. Existió diferencias significativas entre las humedades, los tiempos y la interacción entre ellos

## Bibliografía.

- Aguilera. G, Gil. F, González. A.C, Nieves. B, Rojas. Y, Rodríguez. A, Vit. P. 2009. Evaluación de actividad antibacteriana de mieles de *Apis mellifera*, contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. ISSN 0798-0477. INHRR, V° 40, N°.1Caracas.
- Baros, J.A y Lenovich, L.M. 1992. Halophilic and Osmophilic microorganisms. En: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3ra Edición. APHA. P 199-212.
- Esteban Quilez. M.A y Marcos Barrado. A. 1976. Actividad de agua de la miel y crecimiento de levaduras osmotolerantes. Anal. Bromatol. XXVIII-1, pág. 33-44.
- Leitner. L. 1994. Further the development and utilization of hurdle technology for food preservation. Journal of Food Engineering. No. 22-c, pag. 421.
- Molan, C.P. The antibacterial activity of honey. The nature of antibacterial activity. Bee World. Vol 73 No.1, 1992.
- NC: 371:04. Miel de abejas. Especificaciones.
- Periz. A.B. 1974. La miel en la alimentación de los lactantes. Apimondia Vo. 12.
- Pinvick. H. 1980. Azúcar, cacao, chocolate y confitura. Ecología microbiana de los alimentos. Vol 2. Editorial Acribia.
- Poncini, L y Wimmer, F.L. 1985. Caracterización de las levaduras (*Blastomycetes*) en algunas mieles de Fiji. Apiacta 4. P 118-126
- Tysser. C, Rousseau. M y Durand. C. 1980. Microbis and wholesomeness of commercial honey. Apiacta. No. 2, pág. 51-60
- Troller, J.A. 1979. Food Spoilage by microorganisms tolerating Low-Aw environments. Food Technology. January. P 72-75.
- Valdés G.G; Ruiz M.R; Giral, T.R. .Características antibacterianas de la miel de abejas de las principales floraciones melíferas.. Revista cubana de Agricultura. Vol. 1 No. 1. ISSN 1607-5080. 39-43. 2000.
- Walker, H.W and Ayres, J.C. 1970. Yeast as spoilage organisms. Chapter 9. En The Yeast. Vol 3 Academic Press, New York.p 474-519.