



## Enzimas del buche de *Melipona beecheii* en el proceso de conversión de néctar a miel

Julietta Grajales-Conesa, Albert Antonio Díaz-Barrios, Víctor Jesús Albores-Flores, José Alfonso López-García\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

El buche o saco de miel es reconocido por almacenar el néctar que las abejas colectan de las flores y donde ocurren muchas transformaciones enzimáticas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue determinar las enzimas del buche de *Melipona beecheii* y *Apis mellifera* involucradas en el proceso de conversión de néctar a miel. Adicionalmente se analizaron muestras de cera, néctar y miel. Se capturaron 20 abejas de cada una de las especies de estudio, dividiendo cada una en dos partes para realizar disecciones y obtener el buche, para preparar dos extractos diferentes; Extracto de Buche Sin Néctar (EBSN) y Extracto de Buche Con Néctar (EBCN). Así mismo, a cada muestra se les determinó el contenido de diastasa (D), invertasa (I), glucosa oxidasa (GO), catalasa (CAT), fosfatasa ácida (FA) y proteasa (P) además de parámetros fisicoquímicos como pH, humedad y azúcares reductores. De acuerdo con los resultados, entre muestras y entre especies de abeja, se encontraron diferencias significativas para cada evaluación fisicoquímica. Al comparar los valores enzimáticos, éstos mostraron diferencias significativas, aunque los mayores valores correspondieron a las muestras de EBCN.

## *Melipona beecheii* gut enzymes; from nectar to honey

### Abstract

The honey gut is recognized for storing the nectar that bees collect from flowers to subsequently move to the hive. Therefore, the objective of this work was to determine the enzymes of *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* involved in the process of converting nectar to honey. The samples were: wax, nectar and honey. Twenty bees were captured, dividing each one into two parts to dissect and obtain the crop, to prepare two different extracts Bee Gut Extracts Without Nectar (BGEWN) and Bee Gut Extracts Full of Nectar (BGEFN). We determined the diastase content (D), invertase (I), glucose oxidase (GO), catalase (CAT), acid phosphatase (FA) and protease (P) in addition to physicochemical parameters such as pH, moisture and reducing sugars. According to the results, between samples and between bee species, significant differences were found for each physicochemical evaluation. When comparing the enzymatic values, they showed significant differences although the highest values corresponded to the BGEFN samples.

### Palabras clave:

$\beta$ -D-glucopiranosido  
Cera  
Diastasa  
Espectrofotometría  
Invertasa

### Keywords:

$\beta$ -D-glucopyranoside  
Wax  
Diastase  
Spectrophotometry  
Invertase

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número, Colonia  
Solidaridad 2000, CP.  
30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9621104366.  
Correo-electrónico:  
jose.lopez@unach.mx

## 1. Introducción

El néctar es la fuente principal de carbohidratos (sacarosa, fructosa, glucosa, manosa, arabinosa, xilosa) en la dieta natural de las abejas (Tan et al., 2007). Es succionado o regurgitado por ciertos órganos o estructuras que intervienen en el complejo del sistema digestivo de la abeja como la probóscide (estructuras que se unen para ingerir o regurgitar miel, néctar o agua), bomba de succión el cual es un saco muscular, relativamente grande que empieza en la boca y se ensancha en la parte media, luego reduce de tamaño y se convierte en el esófago, mismo que se conecta a través del cuello membranoso al tórax. El saco de miel es donde se almacena el néctar o miel y el proventrículo donde se añaden enzimas como invertasas y glucosa oxidasas (Crailsheim y Hrassnigg, 2005).

Las invertasas convierten la sacarosa en glucosa y fructosa. Una cantidad pequeña de glucosa es transformada por la glucosa oxidasa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Olaitan et al., 2007). El ácido glucónico hace la miel ácida y el peróxido de hidrógeno tiene propiedades contra bacterias, hongos y levaduras (Mostafa et al., 2014; Zidan, 2009). Otras enzimas que se encuentran relacionadas con el aparato digestivo de las abejas son amilasas, proteasas y lipasas, estas enzimas ayudan a convertir carbohidratos, aminoácidos y lípidos que puedan digerir o absorber las abejas (Wang et al., 2015).

También se ha encontrado la enzima beta-glucosidasa, encargada de la descomposición de diversos oligosacáridos que se encuentran en la biomasa celulósica. Las enzimas de esta clase tienen inusualmente amplias especificidades de sustrato, siendo capaz de unirse a oligosacáridos con diversos tamaños y por lo tanto contribuir significativamente al desgaste del polen (Lee et al., 2015). Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar las enzimas del buche de *M. beecheii* y *A. mellifera* involucradas en el proceso de conversión de néctar a miel.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Sitio de estudio y muestreo

El estudio se realizó en la Finca Agroecológica "Ayol" (14°49'45"N, 92°17'47"W) ubicada en Tapachula, Chiapas, México. En este sitio se encuentran las especies que se utilizaron en este trabajo; *A. mellifera* y *M. beecheii*, rodeada de especies vegetales como frutales de banano (*Musa* spp.), plátano macho (*Musa balbisiana*), piña (*Ananas comosus*), papaya (*Carica papaya*), mango (*Mangifera indica*), rambután (*Nephelium lappaceum*) y otras especies vegetales.

Se realizaron tres muestreos correspondientes a los meses de agosto, octubre de 2017 y enero de 2018, que coinciden con las temporadas de lluvias, fin de lluvias y seca, respectivamente. Las muestras recolectadas, para ambas especies, fueron cera, néctar, miel y abejas de acuerdo con los métodos de muestreo establecidos por la AOAC (1996), directamente de la colmena y se envasaron en frascos de plástico y de vidrio estériles. Posteriormente, se trasladaron

a los laboratorios del Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas (IBC-UNACH) para su almacenamiento en cuarto frío a una temperatura de 8 °C.

Además, se capturaron 20 abejas de cada especie por cada muestreo para realizar su respectiva disección y extracción del buche para elaborar el extracto acuoso. Se dividieron en dos grupos: 10 abejas para su rápida disección, obteniendo así el Extracto de Buche Con Néctar (EBCN) y las otras 10 abejas se mantuvieron con vida por 24 horas para que consumieran el néctar que se encontraba en el buche y así realizar su respectiva disección-extracción para realizar el Extracto de Buche Sin Néctar (EBSN). Previamente a la disección, las abejas se sumergieron en 20 mL de etanol al 75% durante 1 min para esterilizar su superficie y se enjuagaron 3 veces en agua destilada. Se diseccionaron con bisturí estéril, el buche se colocó en un vaso de precipitado conteniendo 50 mL de solución salina fisiológica estéril (40 mL de NaCl, 5 mL de Tween 80 y 5 mL de agua destilada) y se almacenó a -20 °C. Después se agitaron por 90 s y se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min, se recuperó el sobrenadante para el análisis enzimático.

### 2.2 Propiedades fisicoquímicas y actividad enzimática de las muestras

Se determinó el pH y la humedad de las muestras utilizando un potenciómetro y refractómetro, respectivamente, de acuerdo con los métodos establecidos por el CODEX-STAN 12-1981 (Codex, 1987). Además, se realizó la determinación de azúcares reductores por espectrofotometría empleando el reactivo 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) utilizando el método descrito por Saxena et al. (2010). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La actividad diastásica se evaluó por el método de Zandamela-Mungó (2008), la actividad invertasa y glucosa oxidasa fueron cuantificados por el método de Bachmann (2007). Se determinó la actividad catalasa empleando la técnica de García et al. (1994). La actividad fosfatasa ácida y proteasa se determinaron siguiendo el método de Toro-Zúñiga (2004). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### 2.3 Análisis de datos

Todos los resultados obtenidos se sometieron a análisis de la varianza y posterior contraste de medias utilizando la prueba de Hotelling ( $p < 0.05$ ). Para determinar la formación de grupos, se utilizó el Análisis Discriminante y para determinar las variables influyentes se realizó un Análisis de Componentes Principales. Se empleó el programa estadístico Infostat 2015®.

## 3. Resultados

Los valores de cada evaluación fisicoquímica realizada al buche de abejas de cada especie, miel, néctar y cera se presentan en el Cuadro 1. Se encontró entre muestras y entre especies de abeja, diferencias en los valores obtenidos de cada evaluación fisicoquímica realizada. La comparación de

**Cuadro 1.** Medias  $\pm$ DE de las propiedades fisicoquímicas y de las enzimas de las muestras colectadas. Mb; *Melipona beecheii*, Am; *Apis mellifera*, EBCN; extracto de buche con néctar, EBSN; Extracto de buche sin néctar.

Especie	Muestra	Diastasa	Invertasa	Glucosa oxidasa (meq de GO kg <sup>-1</sup> )	Catalasa (mmoles de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) consumidos g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Fosfatasa	Proteasa	pH	Humedad (g 100 g <sup>-1</sup> )	Azúcares reductores (g 100 g <sup>-1</sup> )	
Mb	EBCN	14.66 $\pm$ 1.76	42.32 $\pm$ 2.3	16.11 $\pm$ 5.46	0.68 $\pm$ 0.46	7.94 $\pm$ 0.39	8.6 $\pm$ 0.13	6.89 $\pm$ 0.11	76.27 $\pm$ 2.96	0.54 $\pm$ 0.02	A
Mb	EBSN	11.67 $\pm$ 0.75	16.56 $\pm$ 0.16	8.89 $\pm$ 3.33	0.51 $\pm$ 0.25	5.91 $\pm$ 0.19	5.55 $\pm$ 0.1	7.09 $\pm$ 0.14	91.01 $\pm$ 1.61	0.25 $\pm$ 0.01	B
Mb	MIEL	13.13 $\pm$ 0.8	111.05 $\pm$ 2.34	76.67 $\pm$ 26.34	0.36 $\pm$ 0.19	9.62 $\pm$ 0.07	24.46 $\pm$ 0.12	3.54 $\pm$ 0.15	27.26 $\pm$ 2.07	72.38 $\pm$ 0.6	C
Mb	NÉCTAR	8.61 $\pm$ 0.68	16.19 $\pm$ 4.79	46.11 $\pm$ 19.97	0.58 $\pm$ 0.96	3.74 $\pm$ 0.16	14.07 $\pm$ 0.06	3.45 $\pm$ 0.16	62.51 $\pm$ 3.44	39.25 $\pm$ 0.14	D
Am	NÉCTAR	11.6 $\pm$ 3.52	412.36 $\pm$ 79.57	46.11 $\pm$ 10.54	0.57 $\pm$ 0.96	2.19 $\pm$ 0.24	15.72 $\pm$ 2.45	3.6 $\pm$ 0.12	46.06 $\pm$ 2.86	35.36 $\pm$ 1.89	E
Am	EBCN	15.34 $\pm$ 1.96	32.66 $\pm$ 1.99	28.67 $\pm$ 55	1.12 $\pm$ 0.25	10.64 $\pm$ 0.44	11.21 $\pm$ 1.51	6.00 $\pm$ 1.38	77.25 $\pm$ 4.58	0.48 $\pm$ 3.20E-03	F
Am	EBSN	13.58 $\pm$ 3.17	22.05 $\pm$ 3.07	13.89 $\pm$ 13.87	0.28 $\pm$ 0.12	4.86 $\pm$ 0.42	6.13 $\pm$ 1.24	6.25 $\pm$ 1.09	89.32 $\pm$ 3.26	0.16 $\pm$ 0.01	G
Am	MIEL	19.64 $\pm$ 6.38	245.77 $\pm$ 37.92	70.56 $\pm$ 23.38	0.3 $\pm$ 0.16	11.77 $\pm$ 0.59	19.5 $\pm$ 3.05	4.29 $\pm$ 1.18	26.54 $\pm$ 3.02	61.01 $\pm$ 0.77	H
Am	CERA	4.24 $\pm$ 1.49	4.54 $\pm$ 1.29	20.56 $\pm$ 8.08	0.02 $\pm$ 9.4E-04	0.53 $\pm$ 0.07	1.15 $\pm$ 0.34	7.21 $\pm$ 0.129	2.73 $\pm$ 0.45	0.23 $\pm$ 0.01	I*
Mb	CERA	6.51 $\pm$ 1.55	3.77 $\pm$ 0.08	17.78 $\pm$ 5.07	0.03 $\pm$ 2.00E-03	0.87 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.11	7.07 $\pm$ 0.04	2.73 $\pm$ 0.45	0.32 $\pm$ 0.01	I

medias multivariada (prueba de Hotelling,  $p < 0.05$ ) define a las muestras de cera de ambas especies de abeja como similares y diferenciándose de los valores obtenidos en miel, néctar y extracto de buche con y sin néctar, por contener los valores menores en la mayoría de las evaluaciones fisicoquímicas.

Las mieles de ambas especies de abeja únicamente son similares en la prueba de glucosa oxidasa, con los valores más altos en esta evaluación comparada con las demás muestras. En las determinaciones fisicoquímicas de diastasa y fosfatasa ácida, la miel de *A. mellifera* presentó valores altos en las pruebas de proteasa y azúcares reductores, comparado con las demás muestras.

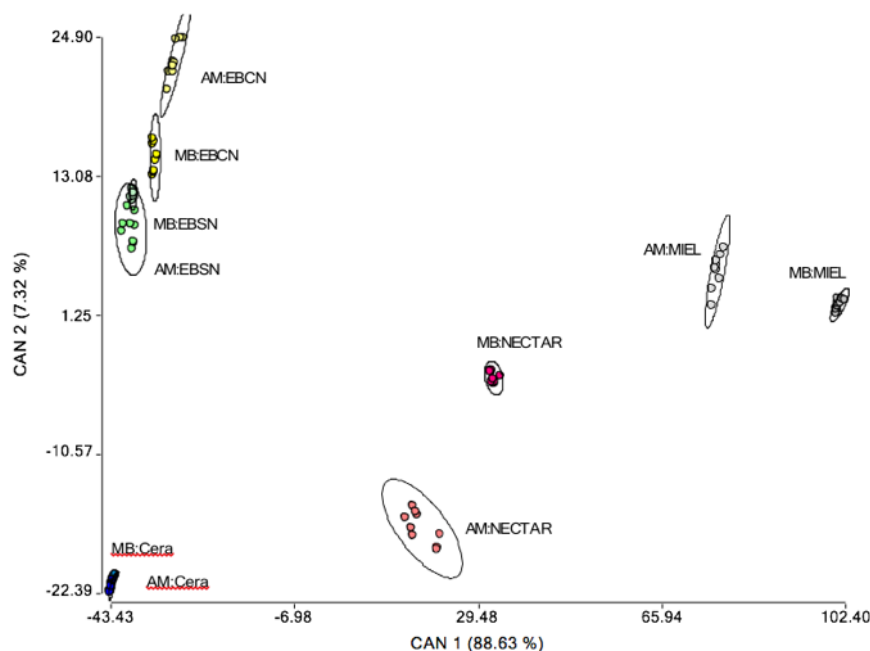
En las muestras de néctar, entre las especies de abeja, se obtuvieron resultados similares en las evaluaciones de glucosa oxidasa, catalasa, fosfatasa ácida, proteasa y azúcares reductores; a diferencia de la prueba de invertasa, donde se encontró que el valor más alto correspondió a la especie de *A. mellifera*. La diferencia entre estas muestras se observó en valores de diastasa, pH y humedad.

En las muestras de extracto de buche, al comparar EBSN y EBCN, se observa que los valores de las propiedades

fisicoquímicas evaluadas en la mayoría de estas variables son menores en EBSN y mayores en EBCN, en ambas especies de abeja. En el EBSN de *M. beecheii*, se presentaron valores neutros de pH y el más alto valor de humedad. En el extracto de buche con néctar de *A. mellifera* se presentó el valor más alto de catalasa y fosfatasa ácida.

En general, las muestras de cera y de extracto de buche (sin y con néctar) presentaron los valores menores en las variables glucosa oxidasa y azúcares reductores, caso contrario en valores de pH.

El análisis discriminante de las variables estudiadas explica el 95.95 % de la varianza. Las variables azúcares reductores, proteasa e invertasa, que corresponde al 88.63 % de la varianza, son las de mayor peso. El porcentaje restante, 7.32 %, corresponde a las variables fosfatasa ácida y humedad. El resto de la varianza, 4.03 %, corresponde a las variables restantes en la clasificación de las muestras estudiadas. Lo anterior, permite observar la diferencia entre muestras de cera y de extracto de buche (sin y con néctar), para ambas especies de abeja de las muestras de miel y néctar (Figura 1).



**Figura 1.** Análisis discriminante canónico de las muestras de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii*.

En el análisis de componentes principales, entre las especies y las muestras, los primeros dos componentes explican el 81.0 % de la varianza mostrando que la actividad de invertasa, glucosa oxidasa, proteasa, contenido de azúcares reductores están fuertemente presentes en las muestras de miel y néctar de ambas especies (Figura 2). La actividad de diastasa, catalasa, fosfatasa ácida y humedad tienen relación con las muestras de extracto de buche con néctar mientras que las muestras restantes se relacionan con el pH; a excepción de las

muestras de cera que no tienen relación con ninguna variable estudiada. En el CP1, la mayoría de las variables presentan un valor de coeficiente positivo (en el eje X), a diferencia de la variable pH que es negativo (Figura 2). Debido a lo anterior, mientras el pH tiende hacia la acidez menor actividad enzimática y azúcares reductores estarán presentes en las muestras.

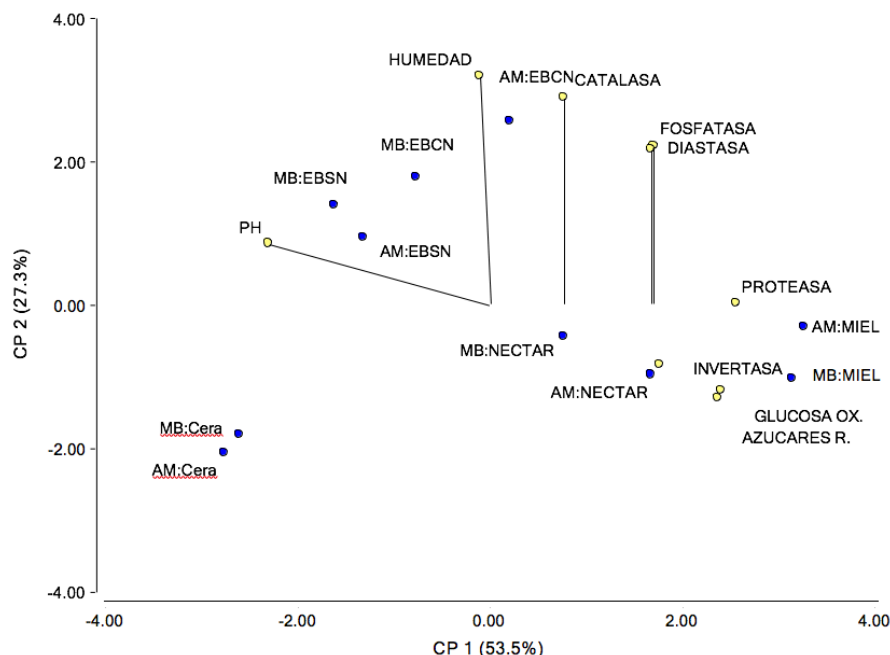


Figura 2. Análisis de Componentes Principales de las muestras de *Apis mellifera* y *Melipona beecheii*.

#### 4. Discusión

La actividad diastásica que es un indicio de la actividad de enzimas amilolíticas fue entre las especies, en las muestras de néctar, miel, EBCN y EBSN iguales entre sí y diferentes significativamente con respecto a las muestras de cera. Siendo estas últimas muestras las que obtuvieron la menor concentración del resto de muestras. Esto es consistente con lo esperado, pues al tratarse de una enzima de origen vegetal no se encuentra en alta proporción en este producto elaborado netamente por las abejas. En cuanto a las muestras de miel, las muestras provenientes de la especie *A. mellifera* tuvieron mayor concentración que las de *M. beecheii* (19.64 ID y 13.13 ID, respectivamente). Las muestras de néctar no fueron significativamente diferentes, sin embargo, el índice de diastasa fue mayor en las muestras de *A. mellifera* con una diferencia de 2.99 ID que las de *M. beecheii* (Wang et al., 2015). La actividad diastásica en las muestras de EBSN fue ligeramente superior en la especie *A. mellifera* al igual que en las muestras de EBCN. Lo anterior puede ser un indicio de que la enzima diastasa se estaría añadiendo desde el buche o saco de miel más que del néctar floral, contrario con lo reportado por Bogdanov (2008), Persano-Oddo et al. (2008) y Wang et al. (2015) o bien que las enzimas se han traslocado de modo eficiente del néctar hacia el buche y la miel.

La enzima invertasa, responsable de la hidrólisis de sacarosa, carbohidrato predominante en la miel (Parvanov et al., 2012; Cauich Kumul et al., 2015), estuvo presente en mayor concentración en las muestras de néctar de *A. mellifera*, caso contrario a las de *M. beecheii*. Las muestras de miel de *A.*

*mellifera* tuvieron concentraciones mayores comparadas con las de *M. beecheii*, similares con lo que reporta Moguel et al. (2005), Bachmann (2007) y Karabournioti y Zervalaki (2010). Las concentraciones menores obtenidas correspondieron a las muestras de cera y en particular a las de *M. beecheii*. En cuanto a las muestras de EBCN, la concentración más alta fue en *M. beecheii* y en las muestras de EBSN fueron las de *A. mellifera*, demostrando que el mayor aporte enzimático no proviene del buche de la abeja sino de la flora o de secreciones de las glándulas salivales o hipofaríngeas de las abejas tal como lo reporta Al-Sherif et al. (2017).

Además de la invertasa, las abejas también adicionan glucosa oxidasa, que oxida la glucosa en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, provocando que la miel sea más ácida y transmitiendo a la miel actividad antimicrobiana (Ohashi y Kubo, 1999, Al-Sherif et al., 2017). Se obtuvo, en las muestras de néctar para ambas especies la misma concentración de actividad enzimática. Mientras que, en las muestras de miel se observó una concentración mayor en las de *M. beecheii* que en las de *A. mellifera* con 6.11 meq de GO kg<sup>-1</sup> de diferencia con valores relativamente similares a los reportados por Acquarone (2004), Bachmann (2007) y Strelec et al (2018). Para esta enzima, las muestras de cera tuvieron concentraciones mayores a las anteriores enzimas, con 20.56 meq de GO kg<sup>-1</sup> en *A. mellifera* y 17.78 meq de GO kg<sup>-1</sup> en *M. beecheii*. Mientras que, para los valores de los extractos, las muestras de *A. mellifera* tuvieron aproximadamente el doble de concentración que las de *M.*

*beecheii* (Takenaka et al., 1990); y en ésta última, el EBCN tuvo la concentración mayor con 16.11 meq de GO kg<sup>-1</sup>.

El peróxido de hidrógeno, producto de la actividad enzimática de la glucosa oxidasa, es catalizado por la enzima catalasa, descomponiéndola en oxígeno y agua. En las muestras de cera, esta enzima obtuvo las concentraciones más bajas para ambas especies oscilando entre 0.02-0.03 mmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumidos g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. En cuanto al néctar, las muestras tuvieron concentraciones similares con una diferencia entre ambas del 0.01 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumidos g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, siendo las segundas concentraciones más altas del resto de muestras demostrando que el néctar floral posee una cantidad considerable de enzimas y que a su vez es recolectado por la abeja introduciéndolo al buche y este a su vez añade cierta cantidad, mostrando mayores concentraciones, específicamente, en el EBCN de *A. mellifera* y *M. beecheii* con 1.12 y 0.68 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumidos g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; resultados relativamente similares con lo reportado por Álvarez-Pérez et al. (2012).

La fosfatasa ácida (FA), tiene la función principal en miel de remover fosfatos inorgánicos de fosfatos orgánicos además de ser una enzima que está relacionada con la fermentación de la miel (Alonso-Torre et al., 2006), mientras que la enzima proteasa (P) actúa rompiendo los enlaces peptídicos de las proteínas para liberar los aminoácidos y así ser más asimilables al organismo además de funciones de transporte de proteínas, estructura celular y tisular, coagulación de sangre e inmunológico y degradación-activación de proteínas o enzimas (Avilés et al., 1994; Lima et al., 2000). Las concentraciones más bajas para ambas enzimas fueron en las muestras de cera, particularmente la FA en las muestras de *M. beecheii*. Las muestras de néctar tuvieron concentraciones de 3.74 y 2.19 mg mL<sup>-1</sup> de FA en *M. beecheii* y *A. mellifera* demostrándose cantidades variables dependientes de la especie floral tal como lo reporta Nicholson y Thornburg (2007). Las concentraciones de proteasa fueron las segundas más altas de las demás con 14.07 y 15.72 mg mL<sup>-1</sup> en *M. beecheii* y *A. mellifera*. Las muestras de miel de *A. mellifera* obtuvieron altas concentraciones con un promedio de 11.77 mg mL<sup>-1</sup> de FA, caso contrario a las de *M. beecheii* que fueron de 9.62 mg mL<sup>-1</sup> de FA demostrando que en las muestras de miel de *A. mellifera* existe mayor presencia de FA y que esta a su vez está directamente relacionada con el deterioro y fermentación de la miel tal como lo demuestra Alonso-Torre et al. (2006) indicando que a mayor tiempo de almacenamiento o fermentación menor será la concentración de FA en la miel. Los valores de proteasa en miel fueron más altos en las muestras de *M. beecheii* con un promedio de 24.46 mg mL<sup>-1</sup> de P contra 19.5 mg mL<sup>-1</sup> de P en muestras de *A. mellifera*. Para ambas enzimas, las muestras de EBCN de ambas especies mostraron mayores concentraciones que las muestras de EBSN y en específico, las muestras de EBCN oscilaron en un promedio de 8.6 mg mL<sup>-1</sup> en *M. beecheii* y *A. mellifera* con 11.21 mg mL<sup>-1</sup> para proteasa y para fosfatasa ácida en muestras de *M. beecheii* con 7.94 mg mL<sup>-1</sup> y *A. mellifera* con 10.64 mg mL<sup>-1</sup>, valores nada cercanos a los

reportados por Zakaria (2007) quien reporta que la hemolinfa y membrana peritrófica son otros órganos que adicionan este tipo de enzimas.

En cuanto a las propiedades fisicoquímicas, el pH de las muestras de cera osciló en la neutralidad con 7.21 para las muestras de *A. mellifera* y 7.07 para las de *M. beecheii*. Las muestras de néctar de *M. beecheii* tendieron más a la acidez con un pH de 3.45 caso contrario a las muestras de *A. mellifera* con un pH de 3.6, esto dependiendo en mayor parte por la especie floral donde fue recolectada por las abejas, además de que los resultados son totalmente diferentes a lo reportado por Nicolson y Thornburg (2007), quienes mencionan que el néctar recién colectado tendría un pH ligeramente ácido con un promedio alrededor de 6.5. Concordando con los resultados de Nicolson y Thornburg (2007), las muestras de miel de *M. beecheii* tendieron hacia la acidez con un pH de 3.54 opuesto a las muestras de *A. mellifera* con un pH de 4.29. El pH de las muestras de EBCN y EBSN tendieron hacia la neutralidad y, aunque el pH óptimo de la diastasa es de 5.3 a 5.6 (Babacan y Rand, 2007), ninguna de las muestras entra dentro de ese rango; sin embargo, las muestras de EBCN tuvieron mayor concentración al igual que las muestras de miel. Para el caso de la enzima invertasa, ninguna de las muestras estuvo dentro del pH óptimo promedio de 4.5 (Kulshrestha et al., 2013), no obstante, las muestras de EBCN tuvieron las terceras concentraciones más altas del resto. Lo mismo para la enzima glucosa oxidasa, pH óptimo de 4.5 a 5.0 (Takewaki et al., 2014). Los valores más altos en actividad enzimática para catalasa se presentaron en las muestras de EBCN de ambas especies aun cuando el pH óptimo de dicha enzima esta entre 4.8-5.5 (Kim et al., 2014), no concordando con lo obtenido. Al ser una enzima que muestra baja actividad enzimática y menos resistencia al tratamiento térmico y almacenamiento que diastasa, invertasa y glucosa oxidasa; la enzima fosfatasa ácida tiene un pH óptimo de 4.5-6.5 (Alonso-Torre et al., 2006) y en los resultados obtenidos, el pH de los EBCN y EBSN estuvieron dentro de los rangos óptimos y las concentraciones obtenidas fueron las segundas más altas que las demás.

Para las muestras estudiadas, los extractos obtuvieron el mayor porcentaje de humedad, cuando las muestras de néctar fueron las que obtuvieron el segundo lugar, indicando que la mayor cantidad de humedad es provista por el néctar condicionando la velocidad de eliminación del agua a una serie de factores tales como las condiciones de tiempo y del flujo del néctar, la cantidad y concentración de néctar transportada con una determinada unidad de tiempo, la temperatura y humedad del ambiente. Cuando la humedad del exterior es mayor que la interior, la acción se invierte y la miel absorbe humedad debido a las propiedades higroscópicas de los carbohidratos presentes en la miel (Ball, 2007; Rios-Corripio, 2012). Dichos carbohidratos constituyen el 95-99% de la materia seca de la miel y en consecuencia son responsables en mayor parte de las cualidades de la miel como viscosidad, propiedades térmicas,

higroscopicidad, etc. En las muestras analizadas, la mayor presencia de azúcares reductores fue en la miel y en el néctar por lo que se demuestra que muchos de los azúcares de la miel no se encuentran en el néctar, sino que se forman durante la maduración y almacenamiento por acción de las enzimas (Bachmann, 2007).

## 5. Conclusión

Las muestras de cera y de los extractos tuvieron pH neutros, mientras que las muestras de néctar y miel presentaron valores de pH bajos. Además, ninguna de las anteriores muestras está dentro de los límites permisibles de las normas oficiales. Las enzimas que mayor concentración tuvieron para los extractos de buche con y sin néctar fueron la diastasa, catalasa y fosfatasa ácida mientras que las muestras de néctar y miel tuvieron concentraciones altas en invertasa, glucosa oxidasa y proteasa.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

## Referencias

- Acquarone CA. 2004. Physicochemical parameters of honeys, relationship between them and their potential application for the determination of the botanical and / or geographical origin of Argentine honeys. Thesis. Belgrano University.
- Al-Sherif A, Mazeed A, Ewis M, Nafea E, Hagag E, Kamel A. 2017. Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*A. mellifera* L.). *Physiological Entomology* 42(4): 397-403.
- Alonso-Torre S, Cavia M, Fernández-Muiño M, Moreno G, Huidobro J, Sancho M. 2006. Evolution of acid phosphatase activity of honeys from different climates. *Food Chemistry* 97(4): 750-755.
- Álvarez-Pérez S, Herrera C, De Vega C. 2012. Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 80(3): 591-602.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. 1996. Official methods of analysis. Ed. Arlington. USA. 2209 p.
- Babacan S, Rand, AG. 2007. Characterization of honey amylase. *Journal of Food Science* 72(1): C050-C055.
- Bachmann H. 2007. Preliminary studies of honey honey characterization: determination of carbohydrates by GC / MS and enzymatic analysis. Thesis. Southern University of Chile.
- Ball DW. 2007. The chemical composition of honey. *Journal of Chemical Education* 84(10): 1643.
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallman P. 2008. Honey for nutrition and health. *American Journal of the College of Nutrition* 27: 677-689.
- Cauich-Kumul R, Ruiz-Ruiz J, Ortíz-Vázquez E, Segura-Campos R. 2015. Antioxidant potential of honey from *Melipona beecheii* and its relationship with health: a review. *Hospital Nutrition* 32(4): 1432-1442.
- Codex. 1987. STAN 12-1981. Codex standard for honey. Codex Alimentarius. FAO/WHO.
- Crailsheim K, Hrassnigg N. 2005. Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 36(2): 255-277.
- Delage DB y Darchen R. (1982). Digestive enzymes of the salivary glands and the midgut of a social Mexican bee *Melipona beecheii*. *Annales- des Sciences – Naturelles – Zoologie*, 4(2): 91-96.
- García C, Hernández T, Costa F. 1994. Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology Biochemistry*. 26: 1185-1191.
- Karabournioti S, Zervalaki P. 2010. Effect of heating on honey HMF and invertase. *Apiacta* 26(4): 177-181.
- Kim PS, Shin NR, Kim JY, Yun JH, Hyun DW, Bae JW. 2014. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Microbiology* 52(8): 639-645.
- Kulshrestha S, Tyagi P, Sindhi V, Yadavilli KS. 2013. Invertase and its applications – A brief review. *Journal of Pharmacy Research* 7(9): 792-797.
- Lee FJ, Rusch DB, Stewart FJ, Mattila HR, Newton IL. 2015. Saccharide breakdown and fermentation by the honey bee gut microbiome. *Environmental Microbiology* 17(3): 796-815.
- Lima P, Brochetto-Braga R, Chaud-Netto J. 2000. Proteolytic activity Africanized honeybee (*A. mellifera*: Hymenoptera, Apidae) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 6(1): 64-76.
- Moguel Y, Echazarreta-González C, Mora-Escobedo R. 2005. Physicochemical quality of honey from honeybees *Apis mellifera* produced in the State of Yucatan during different stages of the production process and blossoms. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 43(3): 323-334.
- Mostafa S, Naby A, Wafeek-Zidan E. 2014. Activity level of lactate dehydrogenase and  $\beta$ - glucosidase enzymes in the honeybee colonies, (*Apis mellifera* L.) with different feeding. *Journal of Agricultural Technology* 10(2): 483-491.
- Nicolson SW, Thornburg RW. 2007. Nectar chemistry. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. (eds) *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht.
- Official Mexican Standard. NOM-145-SCFI-2001. Commercial information- labeling of honey in its different presentations.
- Ohashi K, Kubo T. 1999. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*A. mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* 265: 127-133.
- Olaitan PB, Olufemi E, Ola I. 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and a inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 7(3): 159-165.
- Parvanov X, Dinkov D, Tananaki C. 2012. Invertase activity and carbohydrate spectrum of organic acacia and polyfloral honey After one-year storage. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 15(3): 198-205.
- Persano-Oddo L, Heard T, Rodríguez-Malaver A, Pérez A, Fernández-Muiño M, Sancho M, Sesta G, Lusco L, Vit P. 2008. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. *Journal of Medicinal food*. 11 (4): 789-794.

- Rios-Corripio A. 2012. Bee honey chemometrics for the detection of sugars and detection of adulteration using infrared spectroscopy. Thesis. Universidad Politécnica Nacional.
- Saxena S, Gautam S, Sharma A. 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry* 118(2): 391-397.
- Strelec I, Crevar B, Kovac T, Bilic B, Primorac L, Flanjak I. 2018. Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 10(1): 33-41.
- Takewaki S, Chiba S, Kimura A, Matsui H, Koike Y. 2014. Purification and properties of  $\alpha$ -glucosidases of the honey bee *Apis mellifera* L. *Agricultural and Biological Chemistry* 44(4): 731-740.
- Tan K, Guo, Y, Nicolson S, Radloff S, Song Q, Hepburn H. 2007. Honey bee (*Apis cerana*) foraging responses to the toxic honey of *Tripterygium hypoglaucum* (Celastraceae): changing threshold of nectar acceptability. *Journal of Chemical Ecology* 33: 2209-2217.
- Takenaka T, Ito H, Yatsunami K, Echigo T. 1990. Changes of glucose oxidase activity and amount of gluconic acid formation in the hypopharyngeal glands during the lifespan of honey bee workers (*Apis mellifera* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* 54(8): 2133-2134.
- Toro-Zúñiga VC. 2004. Biochemical profile of rhizospheric fungal strains. Thesis. Southern University of Chile.
- Wang M, Zhao W, Xu H, Wang Z, He Sh. 2015. *Bacillus* in the guts of honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae) mediate changes in amylase values. *European Journal of Entomology*. 112(4): 619-624.
- Zakaria ME. 2007. Factors affecting on the food metabolism in some honey bee races. *Journal of Applied Science Research* 3(4): 311-316.
- Zandamela-Mungói EM. 2008. Physical-chemical characterization and sanitary evaluation of Mozambique honey. Thesis. Autonomous University of Barcelona.
- Zidan EW. 2009. Studies on varroa mite and its effect on productivity of honeybee colonies. ph. D. Thesis, Bahna University, Egypt.