

# INFLUENCIA DE ALGUNOS FACTORES EN LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DEL POLEN APÍCOLA

## INFLUENCE OF SOME FACTORS ON THE LACTIC ACID FERMENTATION OF BEE POLLEN



<sup>1</sup>Ruth M. Benavides-Guevara, <sup>2</sup>Marta C. Quicazan,  
<sup>3</sup>Cristina Ramírez Toro.

<sup>1,2</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup>Escuela Ingeniería de Alimentos, Universidad del Valle. Cali, Colombia

Recibido: 21/09/20 Aprobado 9/10/20

### RESUMEN

El polen es un recurso fundamental para la nutrición de las abejas por su alto valor nutricional, tanto en proteína y grasa; estos insectos lo recolectan de las flores y aportan a la colmena (polen apícola), donde desarrollan un bioproceso natural, al inducir una fermentación del polen dentro de la colmena, generando el pan de abejas, alternativa que se considera sustentable para la alimentación del ser humano. En el presente estudio se evaluó a escala de laboratorio la influencia de algunos factores en la fermentación ácido láctica de esta matriz vegetal. Primero se caracterizó la matriz vegetal, segundo se evaluaron las diferentes relaciones como polen: agua (1:1 y 1:2), adecuación de pH con NaOH 5N (neutralizado y sin neutralizar) hasta llegar a un pH cercano a 6.0, adicional se fermentó con tres cultivos iniciadores *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205, posterior, se efectuó un seguimiento de la acidificación, pH y recuento de células viables para analizar las diferentes cinéticas a través del tiempo. Se encontró que el polen es rico en proteína  $25.362 \pm 0,38\%$  y en grasa  $7.27 \pm 0,02\%$ , respecto a la fermentación se encontró un cambio significativo para la relación polen: agua 1:2 neutralizado, al ser un comportamiento típico de fermentación al disminuir el pH e incrementar la acidez para cada uno de los tres cultivos starter. Posteriormente se realiza un recuento de células viables al punto final de la fermentación, encontrando que el cultivo *Bifidobacterium lactis*, presentó mayor concentración de microorganismos a las 47 horas de  $2.26 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia/g, en comparación a otros cultivos.

**Palabras clave:** cultivos, fermentación, polen.

Citación: Benavides Guevara, R. M., Quicazan, M. C., & Ramírez Toro, C. (2021). Influencia de algunos factores en la fermentación ácido láctica del polen apícola. *Publicaciones E Investigación*, 14(3). <https://doi.org/10.22490/25394088.4484>

<sup>1</sup>rmbenavidesg@unal.edu.co, <https://orcid.org/0000-0001-8084-8332>,

<sup>2</sup>mcquicazand@unal.edu.co, <https://Orcid:0000-0002-0266-6661>

<sup>3</sup>cristina.ramirez@correounivalle.edu.co, <https://orcid.org/0000-0001-9762-5100>

<https://doi.org/10.22490/25394088.4484>

## ABSTRACT

*Pollen is a fundamental resource for the nutrition of bees due to its high nutritional value, both in protein and fat; these insects collect it from the flowers and contribute to the hive (bee pollen), where these develop a natural bioprocess, by inducing a fermentation of the pollen within the hive, generating bee bread, an alternative that is considered sustainable for feeding the being human. In the present study, the influence of some factors on the lactic acid fermentation of this plant matrix was evaluated on a laboratory scale. First, the plant matrix was characterized, secondly, the different relationships such as pollen: water (1: 1 and 1: 2), pH adequacy with 5N NaOH (neutralized and not neutralized) were evaluated until reaching a pH close to 6.0, additionally used for the fermentation three starter cultures *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* and *Yomix @ 205*, later, acidification and pH were monitored to analyze the different kinetics over time. It was found that the pollen is rich in protein  $25.362 \pm$  % and in fat  $7.27 \pm 0.02$  %, with respect to fermentation, a significant change was found for the pollen: water ratio 1: 2 neutralized, being a typical behavior fermentation by decreasing the pH and increasing the acidity for each of the three starter cultures. Subsequently, the viable cells are counted at the end point of the fermentation, finding that the *Bifidobacterium lactis* culture presented a higher concentration of microorganisms at 47 hours of  $2.26 \times 10^9$  colony-forming units/g, compared to other cultures.*

**Key words:** cultures, fermentation, pollen.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fermentación es la transformación de una sustancia orgánica (generalmente un carbohidrato) en otra utilizable, producida mediante un proceso metabólico por microorganismos o por enzimas que provocan reacciones de oxidación-reducción, de las cuales el organismo productor deriva la energía suficiente para su metabolismo, las fermentaciones pueden ser anaeróbicas, si se producen fuera del contacto con el aire, o aeróbicas, que sólo tienen lugar en presencia de oxígeno (Vásquez & Olofsson, 2009; Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

Este bioproceso se identifica por ser económico y sencillo, que causa cambios químicos y modifica la funcionalidad de los alimentos debida a la acción de los microorganismos y/o enzimas que genera cambios en dicho proceso y como consecuencia mejora el valor nutricional, aumenta la vida útil de algunos alimentos y se modifican las propiedades sensoriales. Sin embargo, los cambios que se producen en los alimentos fermentados dependen de las condiciones de la fermentación en cada alimento (Buitrago, 2007; Bourdichon *et al.*, 2012).

Existe una tendencia y demanda de nuevos alimentos probióticos a nivel mundial, creando la necesidad de desarrollar productos no lácteos y explorar diferentes matrices vegetales. Se espera que a través del tiempo se logre innovar con los cultivos iniciadores y transformar la industria de alimentos (Bourdichon *et al.*, 2012; Hansen 2002).

Con el propósito de evaluar nuevas alternativas tendientes a aprovechar el potencial nutricional y la alta producción de polen apícola en el altiplano cundiboyacense, se consideró el modelo natural de fermentación que realizan las abejas en la colmena para su sustento (Esteban *et al.*, 2016).

Este estudio parte de un polen apícola seco, al ser considerado como sustrato de fermentación, se emplearon cultivos starter, y se evaluó la influencia de diferentes relaciones polen: agua, y neutralización. Buscando ampliar las posibilidades de transformación del polen apícola para la alimentación humana, con criterios de sustentabilidad, beneficios económicos y sociales.

## 2. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 2.1 Caracterización del Polen apícola

El polen seco, se recolectó en el municipio de Viracachá (Boyacá), ubicado en el altiplano cundiboyacense colombiano.

El polen fue caracterizado fisicoquímicamente, de acuerdo con los métodos que se presentan en la Tabla 1, respectivamente.

TABLA 1.

Metodología empleada para la evaluación de propiedades fisicoquímicas del polen

Propiedad	Método	Referencia
Humedad (%)	AOAC 925.10	(AOAC, 2019a)
Actividad de agua (aw)	AOAC 978.18	(Ward <i>et al.</i> , 1989)
pH	AOAC 981.12	(AOAC, 2019b)
Acidez (meq/kg)	AOAC 950.15	(AOAC, 2019c)
Grasa (%)	AOAC 942.05	(AOAC, 2019d)
Proteína (%)	AOAC 960.52	(AOAC, 2019e)

### 2.2 Cultivos starter

- Howaru<sup>TM</sup> Bifido (*Bifidobacterium lactis*).
- Howaru<sup>TM</sup> Dophilus (*Lactobacillus acidophilus*).
- YO-MIX <sup>TM</sup>® 205 (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*)

### 2.3 Fermentación del polen

Para los ensayos de fermentación, se consideraron diferentes relaciones polen: agua (1:1 y 1:2), adecuación de pH con NaOH 5N (neutralizado y sin neutralizar) hasta un pH cercano a 6.0, dicho, sustrato fue esterilizado. Posteriormente, se inocula de forma directa en el sustrato, teniendo en cuenta las especificaciones de la ficha técnica. Se agitó durante 2 minutos al buscar homogenización, para ser distribuidos en frascos de vidrio.

Se incubaron a 37°C en condiciones aeróbicas (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro), durante 45 horas de fermentación (Shurkhno *et al.*, 2006). Al inicio de la fermentación se realizaron mediciones cada 3 horas durante el primer día (Fuenmayor, 2009; Salazar, 2014).

### 2.4 Determinación pH y acidez

La acidez y el pH, se realizó según el método y 950.15 propuestos por la AOAC (2019b; 2019c), donde se emplea un titulador automático Mettler Toledo ° T70, al considerar como agente de titulación el NaOH 0,05 M hasta llegar a un pH 8,3, las unidades se expresan en meq/kg, o se transforma a porcentaje de ácido láctico.

### 2.5 Recuento de células viables

Mediante el conteo, se busca obtener un promedio de colonias desarrolladas en las cajas de Petri. Adicionalmente, se considera las cajas que presenten un número de colonias entre 30-300; multiplicar por el factor de dilución y se reporta como el número de Unidades Formadoras de Colonias sobre gramos polen (UFC/g polen) (Ramírez, 2008).

### 2.6 Diseño experimental

En la Tabla 2, se presentan las condiciones experimentales para un diseño factorial completamente al azar. Se usó polen seco, diferentes relaciones polen: agua, adecuación de pH y se empleó para la fermentación tres cultivos iniciadores *L.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* y Yomix@205.

TABLA 2.

Condiciones experimentales empleadas para los ensayos preliminares de fermentación del polen

Factor	Nivel
Relación (m/m) Polen:Agua	1:1
	1:2
	Neutralizado
pH inicial	Sin neutralizar
Cultivos	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Bifidobacterium lactis</i>
	Yomix@205

### 2.7 Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tuckey con un nivel de confianza  $\alpha = 0.05$ . Los datos se procesaron mediante Statgraphics.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización del polen apícola

En la Tabla 3, se evidencia la caracterización fisicoquímica del polen seco. Dichos, valores se encuentran dentro del rango que establecen otros estudios para el polen en Colombia (Mesa Valencia, 2015). Sin embargo, presentó un mayor contenido de grasa  $7.27 \pm 0.02$  (%) al ser comparado con otras variedades de polen de otros países, Serbia oscila valores entre 1.31%- 6.78% y Brasil 2.02%, estos valores pueden ser altamente variables, y esto depende de su cantidad de ácidos grasos, carotenos que puedan estar presentes (Gasparotto, 2013; Kostić *et al.*, 2015). Respecto a la proteína se evidencia un alto valor  $25.362 \pm 0.38$  (%), respecto al polen proveniente de distintos países como Hungría 16.3%, España 15.8%, China 17.6% y Bulgaria 19.2%. Se considera que los cambios fisicoquímicos son causados por su origen botánico (Fuenmayor, 2014).

Respeto a la humedad, se evidencia  $4.87 \pm 0.02$  %, valor que cumple con algunas normas internacionales como Argentina Max 8, Brasil Max 4 y México Min 4.5 y Max 8, por otro lado, este valor fue coherente con algunos estudios reportados para el polen colombiano (Kostić *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013).

TABLA 3.  
Propiedades fisicoquímicas del polen

Características	Polen seco
Humedad (%)	$4.87 \pm 0.02$
aw	$0.27 \pm 0.02$
pH	$4.16 \pm 0.18$
Acidez (meq/kg)	$326 \pm 8.81$
Grasa (%)	$7.27 \pm 0.02$
Proteína (%)	$25.362 \pm 0.38$

Aunque en Colombia no existe una normatividad vigente sobre los parámetros fisicoquímicos del polen para consumo humano, al comparar los valores expuestos en la Tabla 3, cumple con los requisitos establecidos con la legislación internacional como Argentina y Brasil (Coronel *et al.*, 2004; Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2008).

### 3.2 Cinéticas de fermentación

Se observó en las figuras de 1 a la 6, que el pH y la acidez no presentaron cambios significativos en las cinéticas de fermentación, al evaluar las siguientes condiciones:

- Polen:agua 1:1 sin neutralizar
- Polen:agua 1:1 neutralizado
- Polen:agua 1:2 sin neutralizar

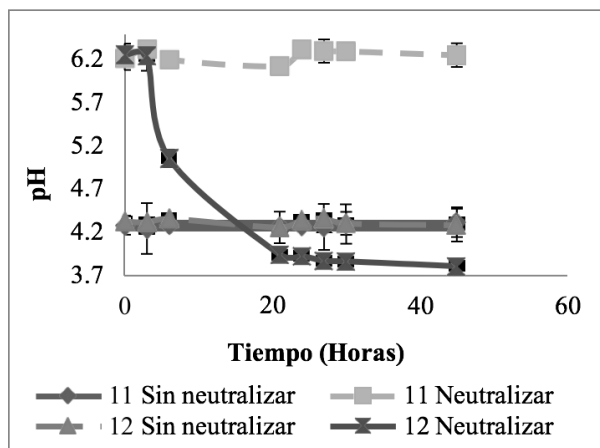
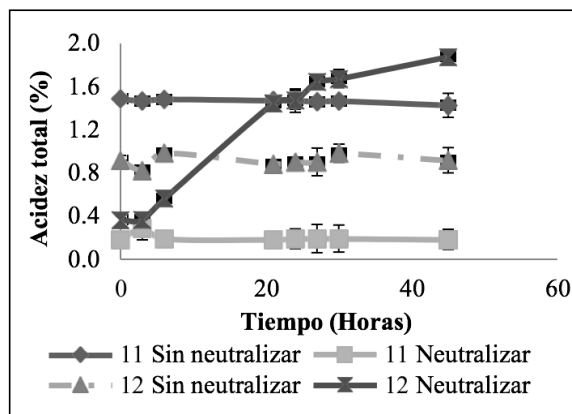


Figura 1. Comportamiento del pH en la fermentación con cultivo *Bifidobacterium lactis*.



\*Acidez total expresada en ácido láctico.

Figura 2. Comportamiento de la acidez en la fermentación con el cultivo *Bifidobacterium lactis*.

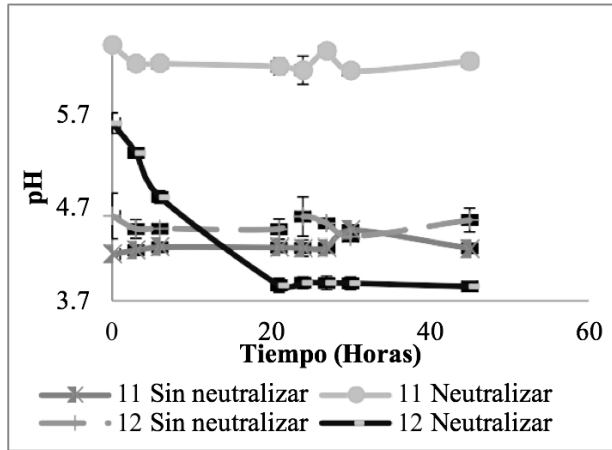
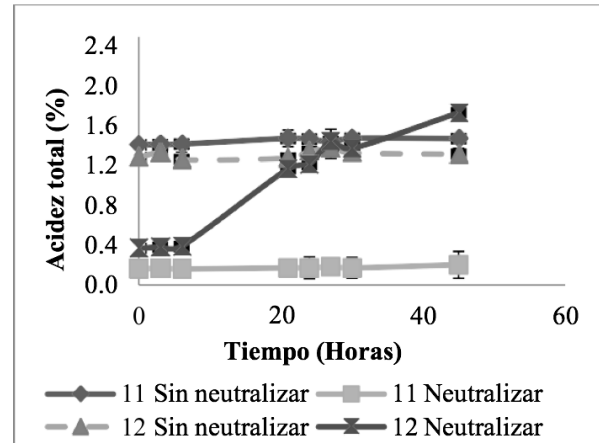
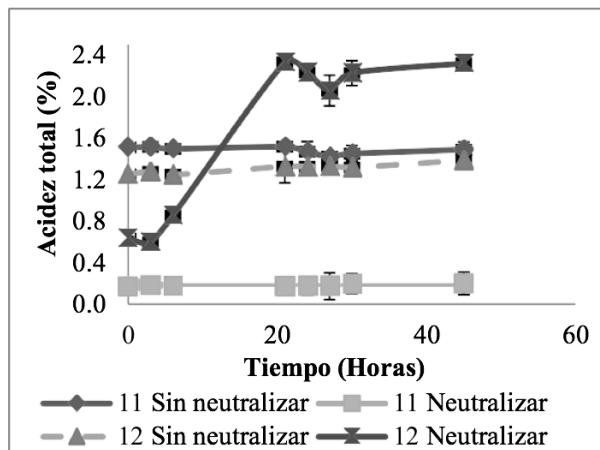


Figura 3. Comportamiento del pH en la fermentación con el cultivo *L.acidophilus*.



\*Acidez total expresada en ácido láctico

Figura 6. Comportamiento de la acidez en la fermentación del cultivo mixto Yomix@205.



\*Acidez total expresada en ácido láctico.

Figura 4. Comportamiento de la acidez en la fermentación con el cultivo *L.acidophilus*.

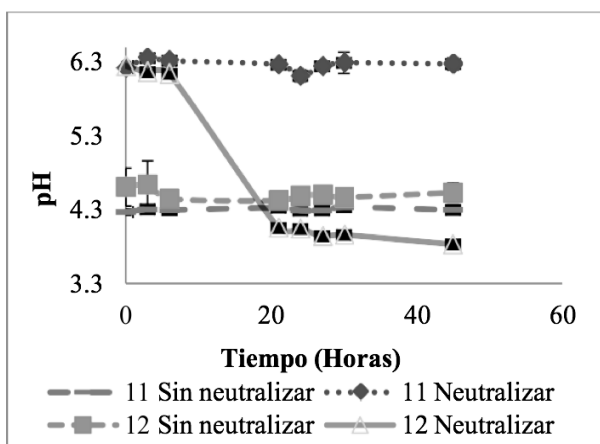


Figura 5. Comportamiento del pH en la fermentación del cultivo mixto Yomix@205.

Por otro lado, se evidencia en las figuras de 1 a la 6, un comportamiento típico de fermentación para el sustrato con una relación polen: agua 1:2 neutralizado, al disminuir el pH e incrementar la acidez para cada uno de los tres cultivos starter. Estos cambios se pronuncian significativamente hasta las 21 horas, evidenciando valores no significativos de pH entre 3.9 y 3.8 hasta las 45 horas, tanto para *Bifidobacterium lactis*, *L.acidophilus* y Yomix@205. Estos resultados son coherentes con otros estudios donde reportan una reducción del pH de 6.1 a 4.8 después de 24 horas de fermentación de un jugo de albaricoque, este mismo comportamiento se evidencia para una leche fermentada con adición de quinua a las 3 horas aproximadamente (Bujna , 2018; Arenas *et al.*, 2012).

Se reporta que un cultivo mixto, puede disminuir el pH de forma lenta al inicio de la fermentación, debido al crecimiento de *S.thermophilus* es más lento que *L. acidophilus* (Arenas *et al.*, 2012), hecho que se evidencia con el cultivo mixto Yomix@205 en la figura 5, al observar que las primeras tres horas los valores de pH están entre 6.2 y 6.1. Mientras en *L.acidophilus* llega a un pH de 4.8 a las 3 horas, igual ocurre para *Bifidobacterium lactis* al llegar a un pH de 5.1.

Se reporta que el pH pertinente para el crecimiento de bifidobacteria está entre 6.0 – 7.0, destacando que valores de 4.5 no crecen, hecho que se evidencia en la

figura 1 para el sustrato polen: agua 1:1 y 1:2 con un pH 4.3 (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010).

Diferentes estudios afirman que el polen presenta aminoácidos y ácidos grasos esenciales, al ser compuestos nutricionales de gran importancia para algunos microorganismos con características probióticas, ya que favorece a su crecimiento en diferentes matrices vegetales ((Arenas *et al.*, 2012; Zuluaga, 2015), esto indica que los microorganismos dependen de las condiciones de adecuación del sustrato y la riqueza nutricional de la matriz vegetal, para que puedan crecer apropiadamente, al demostrar que variables como el pH y la relación polen:agua están relacionadas de forma directa con su metabolismo, al destacar que bajos niveles de estas variables dificultan su crecimiento (Reid, 2015).

Por otro lado, se considera que la fermentación de esta matriz vegetal es una nueva alternativa al no ser láctea. De hecho, puede existir una gran población que requiera este tipo de alimentos vegetales fermentados, por sus afectaciones de salud. Algunos estudios mencionan que tanto frutas como verduras pueden ser sustratos apropiados para una fermentación, por su alto potencial nutritivo y a su vez saludable (Do Espirito Santo *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2013).

### 3.3 Recuento de células viables

La normatividad nacional como la Norma Técnica Colombiana 805 y algunos reportes (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010; Heller, 2008), establecen que la concentración mínima de microorganismos para un alimento con características probióticas debe cumplir 10<sup>6</sup> UFC/g (número mínimo de microorganismos viables).

**TABLA 4.**  
Recuento de células viables en la fermentación

Tiempo (Horas)	Cultivos starter	UFC/g
47	<i>Bifidobacterium lactis</i>	2.26 x10 <sup>9</sup>
47	<i>L.acidophilus</i>	2.15x10 <sup>7</sup>
47	<i>Yomix@205</i>	3.53x10 <sup>6</sup>

Se observó que a las 45 horas la mayor concentración de microorganismos fue para el cultivo *Bifidobacterium lactis* 2.6 x10<sup>9</sup> UFC/g, continua *L.acidophilus* 2.15x10<sup>7</sup> UFC/g, y finaliza *Yomix@205* 3.53x10<sup>6</sup> UFC/g, evidenciando que cumplen con la carga mínima de microorganismos según la normatividad colombiana.

Respecto a la funcionalidad de los probióticos, se considera que pueden ejercer un beneficio en la salud de las personas, siempre que sean viables y disponibles con una alta concentración de 10<sup>8</sup> y 10<sup>9</sup> por gramos de producto (Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro, 2010), hecho que se evidenció con *Bifidobacterium lactis* al lograr una concentración de 2.26 x10<sup>9</sup> UFC/g.

Algunos estudios reportan que los cultivos mixtos presentan ciertas ventajas sobre los cultivos puros; al poseer una mayor tasa de crecimiento, un rendimiento más elevado, como un mayor contenido de ácido láctico, además son muy resistentes a la contaminación, y pueden intervenir, simultáneamente, en las transformaciones en varias etapas de mezclas de sustratos complejos (Bourdichon, 2012). Sin embargo, no se evidencia a las 45 horas la mayor concentración de microorganismos para *Yomix@205*.

## 4. CONCLUSIONES

Se evidencia que el polen presentó un alto valor nutricional en proteína y grasa al ser comparado con otras variedades de polen de otros países, y cumplen con los requisitos de las normas internacionales.

Se concluye que el crecimiento de los tres cultivos se detiene con un sustrato que presente pH 4.2 – 4.3 y una relación polen: agua 1:1 o 1:2, este mismo comportamiento se evidencio con un pH 6.2 -6.5 y una relación polen: agua 1:1.

Se encontró que todas las fermentaciones fueron favorecidas, al considerar una relación polen: agua 1:2 y neutralización del sustrato.



Al evaluar las cinéticas de fermentación con el cultivo *Bifidobacterium lactis*, *L.acidophilus* y Yomix@205, se concluye que los valores no son significativos desde las 21 a las 45 horas, durante la fermentación del polen apícola.

Al comparar la acidez para las diferentes fermentaciones se evidenció que *L.acidophilus*, presentó un mayor rendimiento 2.31% a las 45 horas en comparación a los otros cultivos starter.

Los cultivos starter evaluados logran fermentar la matriz vegetal, a pesar de que son cultivos para inoculación en leche directa, se evidenció que *Bifidobacterium lactis* a las 45 horas, presentó la mayor concentración de microorganismos 2.26 x10<sup>9</sup> UFC/g en comparación a los demás cultivos, al considerar que el polen fermentado podría ser una buena alternativa para los seres humanos.

## AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen el apoyo brindado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias), a la empresa Apiario los Cerezos y al programa estratégico en alternativas para la generación de valor de productos apícolas en Colombia a través de la innovación y el desarrollo tecnológico.

## REFERENCIAS

- AOAC. (2019a). Association of Analytical Chemists. Official Method 925.10. AOAC International.
- AOAC. 2019b). Association of Analytical Chemists. Official Method 981.12. AOAC International.
- AOAC. 2019c) Association of Analytical Chemists. Official Method 950.15. AOAC International.
- AOAC. 2019d). Association of Analytical Chemists. Official Method 942.05. AOAC International.
- AOAC. 2019e). Association of Analytical Chemists. Official Method 960.52. AOAC International.
- Arenas, C., Zapata, R., Gutiérrez-Cortés, C. (2012). Evaluación de la fermentación láctica de leche con adición de quinua (*Chenopodium quinoa*). *Vitae*, 19(1). <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914084.pdf>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., *et al.* (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol*, 154, 87–97.
- Buitrago J. (2007). *Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de Saccharomyces cerevisiae*. Trabajo de grado (Microbiólogo industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Bujna, E., Farkas, N.A., Tran, A.M., *et al.* (2018). Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. *Food Sci Biotechnol*, 27, 547–554.
- Collado Amores, M.C. (2004). Caracterización de cepas del genero bifidobacterium con carácter probiotico. Tesis de grado. Universitat Politècnica de València, Valencia.
- Coronel, B.B., Grasso, D., Pereira, S.C., *et al.* (2004). Caracterización bromatológica apícola argentino. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 29, 145-181. <https://www.redalyc.org/pdf/145/14502906.pdf>
- Do Espírito Santo, A.P., Perego, P., Converti, A., *et al.* (2011). Influence of food matrices on probiotic viability - A review focusing on the fruity bases. *Trends Food Sci Technol*, 22, 377–385.
- Esteban, A., Alarcón, O., Cecilia, M. (2016). Evaluación del proceso fermentativo de polen utilizando microorganismos aislados de productos apícolas del altiplano cundiboyacense. *Agron Colomb*, 34, 896–899.
- Farnworth, E.R., Mainville, I., Desjardins, M.P., Gardner, N., Fliss, I., Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *Int J Food Microbiol*, 116, 174–181.
- Fuenmayor, C. (2009). *Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Fuenmayor, C., Zuluaga, D. *et al.* (2014). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales del polen apícola colombiano. *Rev MVZ Córdoba*, 19, 4003–4014.
- Gasparotto, J. (2013). *Quantificação das vitaminas antioxidantes E, C (ácido ascórbico), pró-vitamina A e composição química do pólen apícola desidratado produzido em apiários georreferenciados da região Sul do Brasil*. Tesis de grado. Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo.
- Hansen, E.B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int J Food Microbiol*, 78, 119–131.



- Heller, K.J. (2008). Bacterias probióticas en alimentos fermentados. Características de los productos y microorganismos iniciadores. *Mundo lácteo y cárnico*, 23–30. <http://bibliotecavirtual.corpmontana.com/bitstream/123456789/3789/5/M000413.pdf>
- Kostić, A., Barać, M., Stanojević, S., et al. (2015). Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT - Food Sci Technol*, 62, 1–9.
- Martins, E.M.F., Ramos, A.M., Vanzela, E.S.L., et al. (2013). Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Res Int*, 51, 764–770.
- Mesa Valencia, A.F. (2015). *Caracterización fisicoquímica y funcional del polen de abejas (apis mellifera) como estrategia para generar valor agregado y parámetros de calidad al producto apícola*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- Ministerio de Agricultura, Cría y Abastecimiento en Brasil, Instrução (s.f.). Normativa no 3 Anexos V-VI. Regulamento Técnico para Fixação e Qualidade de Pólen Apícola, Própolis: Ministerio de Agricultura, Cría y Abastecimiento en Brasil, Secretário de Defesa Agropecuária.
- Ramírez, C. (2008). *Metodología para el seguimiento de los procesos de fermentación*. Universidad del Valle Cali.
- Reid, G. (2015). The growth potential for dairy probiotics. *Int Dairy J*, 49, 16–22.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiol*, 27, 1–11.
- Salazar C. (2014). *Evaluación de diferentes condiciones del proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola*. Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2008).
- NMX-FF-094-SCFI. Norma mexicana sobre productos alimenticios no industrializados para consumo humano- polen (pollinis). México.
- Shurkhno, R.A., Validov, S.Z., Boronin, A.M., et al. (2006). Modeling of lactic acid fermentation of leguminous plant juices. *Appl Biochem Microbiol*, 42, 204–209.
- Vásquez, A., Olofsson, T.C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J Apic Res*, 48, 189–195.
- Ward, O.P., Calvo, M. (1989). *Biotecnología de la fermentación*. Zaragoza: Acribia.
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J. (2013). Characterization of Chemical Composition of Bee Pollen in China. *J Agr Food Chem*, 61, 708–718.
- Zuluaga, C.M., Serrato, J.C., Quicazan, M.C. (2015). Bee-Pollen Structure Modification by Physical and Biotechnological Processing: Influence on the Availability of Nutrients and Bioactive Compounds. *Chem Eng Trans*, 43, 79–84.