Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

OPTIMIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN ÁCIDO LÁCTICA DEL POLEN APÍCOLA A ESCALA DE LABORATORIO

OPTIMIZATION OF THE ACID LACTIC FERMENTATION OF THE BEE POLLEN TO LABORATORY SCALE

Autores: Carlos Alberto del Risco Ríos[1], Yamila Puig Peña[2], Giselle Rodríguez Castro[1], Virginia Leiva Castillo [2], Rosalina García Neninger[1], Zaily Mabel Artiles Cervera[1]

1. Centro Investigaciones Apícolas, Carretera Cano-Wajay, Km 0, El Cano, Arroyo Arenas, La Lisa, Ciudad Habana, Teléfono 202 0890.
2. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Calzada de Infanta, No 1158, entre Clavel y Llinas, Centro Habana, Ciudad Habana, Teléfono 870 0911.

carlos@eeapi.cu

Recibido: 22-4-2014
Aprobado: 3-5-2014

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

RESUMEN:

El polen apícola es un producto con propiedades nutracéuticas demostradas pero su elevado contenido microbiano no ha permitido la comercialización de este importante renglón de la apicultura cubana. Investigaciones previas han demostrado que la fermentación ácido láctica a través del ensilaje, es un método eficaz para disminuir la microbiota del polen. El objetivo de este trabajo es optimizar la fermentación ácido láctica del polen apícola a escala de laboratorio. Se empleó un diseño Factorial de dos factores, humedad inicial de los silos y tipo de inóculo, con tres niveles cada uno. Como variables respuestas se evaluaron la acidez, el pH y el recuento de los microorganismos indicadores de la calidad sanitaria y de bacterias patógenas. Los resultados se procesaron a través del Software Design Expert® Versión 6.0.1, con un grado de confianza del 95 %. Con el aumento de la humedad en los silos del 30 al 36 %, aumentó la acidez y disminuyeron el pH y el recuento de hongos filamentosos de forma significativa pero solo en los silos a 36 % de humedad disminuyeron los hongos filamentosos por debajo de los límites de aceptación tomados como referencia. Sin embargo, el factor inóculo no tuvo efecto significativo sobre la variabilidad de la acidez y el pH, pero sí sobre los recuentos de hongos filamentosos, donde fue más efectivo para disminuir esta variable el inóculo 42. Los modelos ajustados para la acidez y la concentración de hongos filamentosos fueron los más adecuados porque explican el 99 y 88 % de la variabilidad respectivamente, con pérdida de ajuste no significativa. Los niveles óptimos de los factores para obtener un producto fermentado con calidad microbiológica aceptable fueron 36 % de humedad y el empleo del aislado 42 como inóculo.

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

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

Abstract: The bee pollen is a product with proven nutraceutical properties but their high microbial content has not allowed the commercialization of this important line of Cuban beekeeping. Previous investigations have shown that lactic acid fermentation through the silage, is an effective method to reduce the pollen microbiota. The aim of this work is to optimize the lactic acid fermentation of bee pollen to laboratory scale. Factorial design was used with two factors, initial moisture of the silos and inoculum type with three levels each. As response variables were evaluated acidity, pH and enumeration of microorganisms healthcare quality indicators and pathogenic bacterias. The results were processed through Design Expert ® Software Version 6.0.1, with a confidence level of 95%. With increasing moisture in the silos of the 30 to 36 %, increased the acidity and decreased pH and enumeration of the filamentous fungi significantly but only in the silos to 36 % moisture filamentous fungi fell below the limits acceptance taken as reference. However, the factor inoculum had no significant effect on the variability of the acidity and pH and have a significant effect on the counts of filamentous fungi. The inoculum most effective to decrease the filamentous fungi was 42. The Models adjusted for acidity and concentration of filamentous fungi were the best because explain the 99 and 88 % of the variance respectively, with no significant loss of adjustment. Optimal levels of the factors to obtain a fermented product with acceptable microbiological quality were 36 % humidity and the use of isolated 42 as inoculum.

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

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

INTRODUCCIÓN

El polen colectado por las abejas (polen apícola) es considerado una excelente fuente natural de proteínas, aminoácidos esenciales y compuestos fenólicos con actividad antioxidante (Carpes *et al.,* 2007; Yeverino *et al.,*2010), pero con un elevado contenido microbiano (Shaoyong, 1989;

Anselmo *et a l.,* 1996; Serra y Escolar, 1997; Fleche *et al*., 1998; Khismatullin *et al*., 2002; Lyapunov *et al*., 2005; Guerra et al., 2007; Kacániová *et al*., 2009). El polen que se colecta en Cuba no está exento de esta regularidad por lo que no es posible su comercialización (Valdés *et al.,* 1992 a y b; Rodríguez *et a l.,* 1995; Puig *et al*., 2012).

Las bacterias ácido lácticas se aplican en la fermentación de sustratos, como método de bioconservación. Estas causan la acidificación de la materia prima por la producción ácido láctico o ácidos láctico y acético como principales compuestos inhibidores de los microorganismos. También pueden producir otras sustancias inhibidoras tales como: diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina (b- hidroxipropionaldehido) y bacteriocinas (Jack *et al*., 1995).

Basados en la presencia demostrada de las bacterias ácido lácticas en los sustratos vegetales (Trias, 2008), y con la finalidad de reducir la carga microbiana del polen, Pérez *et al* (1991). llevaron a cabo la fermentación espontánea (sin inoculación microbiana) de este alimento a través del ensilaje, De este modo obtuvieron un producto final más ácido e inocuo denominado “Pan de Abejas Industrial”. Debido a la disminución de la calidad del polen como materia prima, dado a las carencias del periodo especial en Cuba, y a la no inoculación de los silos con bacterias ácido lácticas, varias producciones de “Pan de Abejas Industrial” tomaron rutas fermentativas no deseadas y fueron rechazadas.

En la actualidad se emplean los llamados “cultivos iniciadores” liofilizados para garantizar la presencia dominante de las bacterias ácido lácticas en los silos, con especies de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus thermophilus* fundamentalmente. El empleo de estos inóculos comerciales ha permitido obtener mayor homogeneidad en las características fisico-químicas,

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

organolépticas y microbiológicas del producto final (Beganovic y Pavunc, 2011). Hay que destacar que el uso para este fin, de las bacterias ácido lácticas propias del sustrato a ensilar, puede ser una alternativa más eficaz, puesto que están adaptadas previamente a las características del sustrato. Por estas razones del Risco *et al* (2012) aislaron, identificaron y seleccionaron tres cepas de *Lactobacillus* propias del polen, las cuales fueron más eficaces que las bacterias ácido lácticas industriales en la fermentación y reducción de la microbiota del polen ensilado a escala de laboratorio. Además, estos investigadores concluyeron que la humedad del polen entre el 30 – 36 % era la más apropiada para su ensilaje.

Es importante continuar las investigaciones con el propósito de seleccionar la humedad y el inóculo más adecuado en la fermentación del polen a escala de laboratorio, puesto que estos resultados serán la base para el escalado a un nivel superior y productivo. Este trabajo tiene como objetivo: Optimizar la fermentación ácido láctica del polen apícola a escala de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Apícolas, durante el período de enero del 2010 a junio del 2010.

Optimización de los factores humedad inicial e inóculo en el ensilaje a escala de laboratorio de polen apícola

Se empleó un diseño Factorial de dos factores con tres niveles cada uno (3^2). Se realizaron 9 tratamientos, con cinco réplicas para el punto central y tres para el resto.

En el diseño experimental se empleó el polen apícola de producción, secado a 42 ºC hasta alcanzar una humedad entre el 5 – 8 %. La humedad del polen seco se ajustó según el tratamiento entre 30 y 36 % (Del Risco *et al*., 2012), con la adición de solución salina estéril, que a la vez fue el vehículo para añadir la bacteria ácido láctica correspondiente. La masa preparada se distribuyó a razón de 80 g en pomos de cristal y compactada. Los silos se cubrieron con 20 g de miel de abejas con 17,4 % de humedad e incubados a 35 ºC durante 15 días. La incubación de los silos se realizó según lo establecido por Pérez *et al* (1991) y Valdés *et al* (1993)

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

Para preparar los inóculos se utilizaron tres cepas de lactobacilos provenientes del pan de abejas, seleccionadas por ser las más eficaces para fermentar polen apícola y codificadas como cepa 1, 32, y 42 (Del Risco *et al*., 2012). Los inóculos bacterianos se prepararon a partir de la suspensión en solución salina de la biomasa de cada bacteria, obtenida en Agar MRS (Merck, Alemania). Las suspensiones se ajustaron a la escala 1 de Mc Farland (3×10^8 UFC $\cdot$ mL^{-1}) y a partir de las cuales se aseguró una población aproximada en cada silo de 10^6 UFC $\cdot$ g^{-1}.

Se evaluaron las variables acidez producida (acidez final menos la inicial de los silos) expresada como porciento de ácido láctico al multiplicar por el factor 0,09 (NC-ISO 750: 2001), el pH (NC-ISO 1842: 2001), recuento de los coliformes totales (NC-ISO 4832: 2002), coliformes termotolerantes (NC 38-02-14: 1989), *Escherichia coli* (ISO 7251: 2005), levaduras (NC-ISO 7954: 2002), hongos filamentosos (NC-ISO 7954: 2002), *Staphylococcus* coagulasa positiva (NC-ISO 6888-1: 2003), *Salmonella* spp (ISO 6579:1993) y *Clostridium perfringens* (ISO 7937: 2004). Los resultados se procesaron a través del Software Design Expert® Versión 6.0.1, con un grado de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la Tabla 1 la acidez producida por los tres aislados al 30 % de humedad fue inferior al 1 % de ácido láctico y aumentó de forma similar para los tres tipos de inóculo una vez que la humedad se incrementó al 33 y 36 %. Solo en los silos a 36 % de humedad disminuyeron la concentración de hongos filamentosos por debajo de los límites de aceptación tomados como referencia (2) (NRAG 88: 09).

Los datos estadísticos calculados que se muestran en la Tabla 2 permitieron validar el ajuste del modelo cuadrático escogido para cada variable respuesta, ellos son el coeficiente de determinación (R^2), el p-valor del modelo, la suma cuadrada de los residuos predichos (PRESS) y el p-valor de la pérdida de ajuste (LOF). La Tabla 3 muestra el p-valor de los efectos que tuvieron los factores sobre cada variable respuesta y las posibles interacciones. En las Figuras 1, 2 y 3 se presentan

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

gráficos de superficie de respuesta, que permitieron evaluar visualmente la magnitud de los cambios que se producen en las variables respuestas por el efecto de los factores.

Tabla 1. Acidez, pH y recuentos de hongos filamentosos obtenidos en los silos de polen apícola de producción diseñados para optimizar los factores humedad e inóculo.

Factores		Variables respuesta		
Humedad (%)	Inóculo (cepa)	Acidez producida en ácido láctico (%)	pH	Hongos Filamentosos (Log UFC · g^{-1})
30	42	0,40 (0,19)	4,22 (0,04)	2,30 (0,17)
30	32	0,41 (0,06)	4,24 (0,01)	2,56 (0,15)
30	1	0,34 (0,05)	4,23 (0,01)	2,45 (0,27)
33	42	1,40 (0,06)	4,01 (0,05)	2,32 (0,06)
33	32	1,41 (0,04)	3,96 (0,01)	2,26 (0,17)
33	1	1,31 (0,03)	3,94 (0,01)	2,40 (0,18)
36	42	1,97 (0,06)	3,90 (0,02)	1,08 (0,10)
36	32	2,00 (0,07)	3,93 (0,02)	1,58 (0,11)
36	1	1,93 (0,09)	3,89 (0,01)	1,30 (0,24)

Leyenda: Acidez producida, acidez resultante de la diferencia entre la acidez final y la inicial; UFC, número de unidades formadoras de colonia.

Los valores indican la media de n=3 (desviación estándar), excepto el punto central del diseño (33 ; 32) con n=5 (desviación estándar).

Tabla 2. Resumen estadístico de los modelos de mejor ajuste a las variables respuesta.

Expresión del modelo de las variables respuestas	R^2	p-valor (modelo)	PRESS	p-valor (LOF)
$A = -31,26556 + 1,71286 \cdot H – 0,022027 \cdot H^2$	0,9887	< 0,0001	0,23	0,9433

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

$pH = 18,08222 – 0,80718 \cdot H + 0,011486 \cdot H^2$	0,9657	< 0,0001	0,031	0,0153
$HF = -49,67889 + 3,30687 \cdot H – 0,053123 \cdot H^2 – 0,18477 \cdot I^2$	0,8782	< 0,0001	1,64	0,1965

Leyenda: A, acidez; H, Humedad; HF, hongos filamentosos; I, Inóculo; R^2, coeficiente de determinación; PRESS, suma cuadrada de los residuos predichos; LOF, pérdida de ajuste.

Tabla 3. Significación de los efectos de los factores en las variables respuestas.

Factores	Variables respuesta		
	Acidez producida	pH	Hongos Filamentosos
Humedad	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Inóculo	0,1129*	0,1338*	0,2534*
Humedad ^{2}	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Inóculo ^{2}	0,1124*	0,3796*	0,0345
Interacción	0,7633*	0,4311*	0,7281*

Leyenda: Inóculo ^{2}, variable inóculo de segundo grado; Humedad ^{2}, variable humedad de segundo grado; Acidez producida, acidez resultante de la diferencia entre la acidez final y la inicial; *, no significativo, p>0,05.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

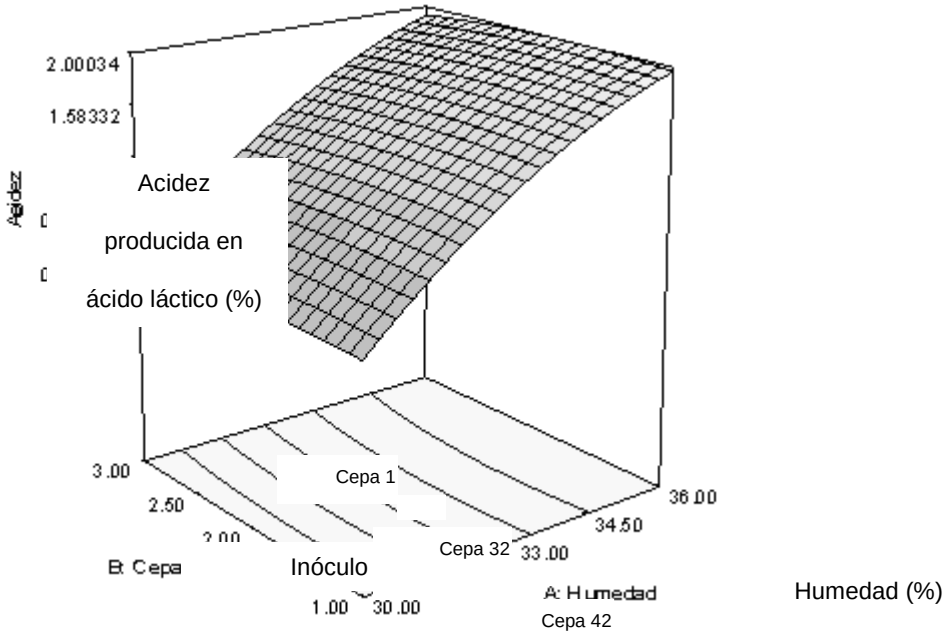


Fig. 1. Descriptivo de superficie de respuesta en relación a la acidez producida.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

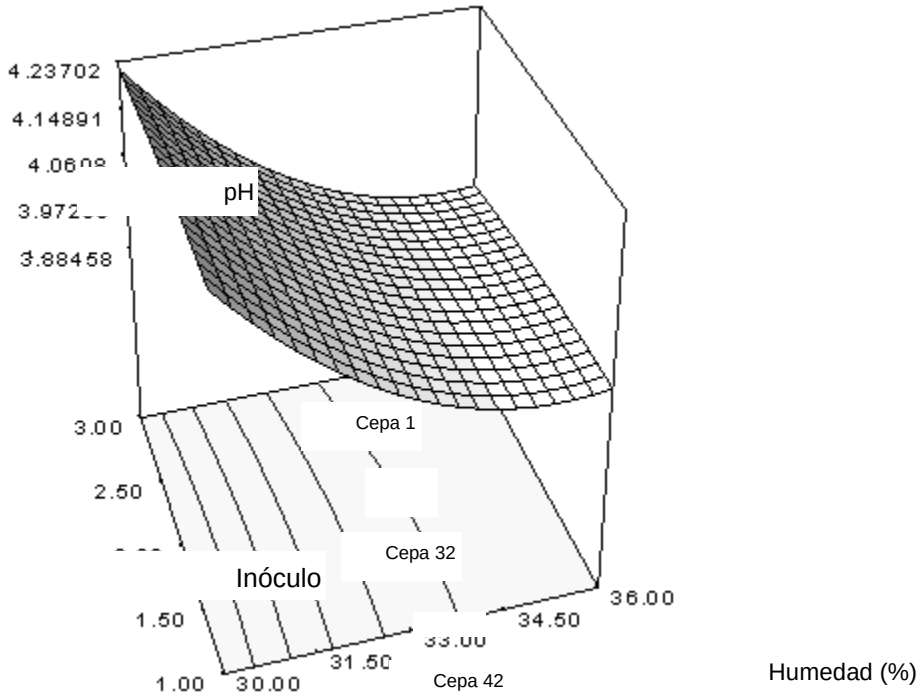


Fig. 2. Descriptivo de superficie de respuesta en relación a los valores pH.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

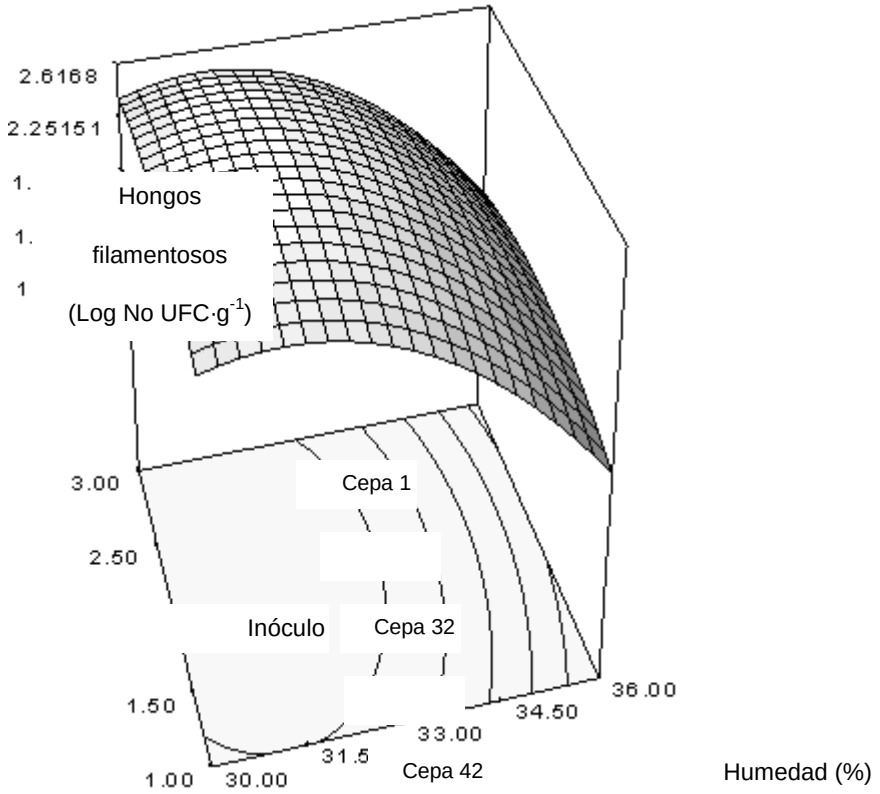


Fig. 3. Descriptivo de superficie de respuesta en relación al conteo de hongos filamentosos.

El aumento de la humedad en los silos afectó los valores de las tres variables respuestas (Figuras 1, 2 y 3), para las cuales el p-valor del análisis de varianza fue significativo. La variable inóculo, tanto lineal como de segundo grado (I, I^2), no tuvo efecto significativo sobre la variabilidad de la acidez y el pH, pero sí I^2 sobre los recuentos de hongos filamentosos. La interacción de los factores fue no significativa para las tres variables respuestas (Tabla 3).

Se observó que al aumentar el valor porcentual de humedad en los silos aumenta la acidez y disminuye el pH, elementos relacionados con la producción de ácido. Esto puede estar dado por que la gran mayoría de los microorganismos, especialmente las bacterias, se desarrollan de manera óptima a una actividad de agua cercana a 1 (0,993 - 0,998), a medida que disminuye la actividad de agua, la velocidad de crecimiento y la masa celular final disminuyen y la fase de latencia aumenta (Thomas y kart, 2009).

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

Como se puede observar en la Tabla 2 los modelos ajustados para la acidez y hongos filamentosos explican el 99 y 88 % de la variabilidad (R^2) respectivamente, con pérdida de ajuste no significativa (LOF). El modelo del pH aunque predice el 96 % de la variabilidad, presenta un LOF significativo, por tanto, el modelo de la acidez y el de los hongos filamentosos son los mejores predictores del proceso de ensilaje del polen apícola de producción a escala de laboratorio.

Como se muestra en la Tabla 1, los niveles óptimos de humedad e inóculo para obtener resultados de acidez máximos y mínimos de pH y hongos filamentosos fueron 36 % y el aislado 42 respectivamente.

La comparación de los recuentos microbianos iniciales y finales de los silos indicó (Tabla 4), que hubo una disminución de los coliformes totales, termotolerantes y *E. coli* hasta la no detección en todos los tratamientos y de las levaduras por debajo del límite de aceptación tomado como referencia (10^2 UFC · g^{-1}) (NRAG 88: 09), principalmente, todos los tratamientos a 36 % de humedad y los inoculados con los aislados 32 y 42 a 33 % de humedad, puesto que en estos las levaduras no fueron detectadas. Por otra parte, solo en los silos ajustados a 36 % de humedad hubo una disminución de los hongos filamentosos por debajo del límite máximo (NRAG 88: 09). Esta fue la variable microbiológica tomada en cuenta en el análisis estadístico por ser la única detectada al principio y final en todos los tratamientos, lo cual puede estar dado a que están provistos de esporas que les permiten una fácil y rápida diseminación y resistencia a los cambios medioambientales (Leyva *et al*., 2008). No se detectaron al inicio ni al final de los silos *Staphylococcus* coagulasa positivo, *Salmonella* spp. ni *C. perfringens*. El indicador microorganismos a 30 ºC no se determinó por estar afectado por el inóculo empleado (Leyva *et al*., 2008; ICMSF, 2000).

Para el control de la calidad microbiológica de los alimentos en Cuba, no se determina específicamente la especie *Staphylococcus aureus,* sino un grupo más amplio denominado *Staphylococcus* coagulasa positivo (NC 585:2008). Este parámetro microbiológico agrupa a las especies potencialmente enterotoxigénicas *Staphylococcus aureus, Staphylococcus intermedius* y *Staphylococcus hyicus* (NC-ISO 6888-1: 2003), puesto que la condición indispensable para que ocurra la intoxicación estafilocócica es la producción de enterotoxina (Thomas y kart, 2009). S.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

aureus es la productora de coagulasa que se aísla con mayor frecuencia, por tanto, la más implicada como causa de intoxicación en humanos. *S. intermedius* y *S. hyicus* se informan generalmente como causantes de enfermedades de interés veterinario pero en 1994 se describe el primer brote de enfermedad en humanos producida por *S. intermedius* (Levin, 2010), razón por la cual en la actualidad esta especie debe tenerse en cuenta.

Tabla 4. Recuento microbiológico inicial y final en silos de polen apícola de producción diseñados para optimizar los factores humedad e inóculo**.**

Factores		UFC · g^{-1}								NMP · g^{-1}	
		Coliformes totales		Coliformes termotolerantes		Hongos filamentosos		Levaduras		*Escherichia coli*	
A	H (%)	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
1	30	$5,3 \times 10^2$	< 10	< 10	< 10	$2,7 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$	1,7 x 10	< 0,3	< 0,3
1	33	4,7 x 10	< 10	< 10	< 10	$2,6 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$5,8 \times 10^3$	1,2 x 10	< 0,3	< 0,3
1	36	2,1 x 10	< 10	< 10	< 10	$1,3 \times 10^4$	2 x 10	$4,5 \times 10^3$	< 10	< 0,3	< 0,3
32	30	2,1 x 10	< 10	< 10	< 10	$2,6 \times 10^3$	$3,6 \times 10^2$	$6,3 \times 10^2$	2,5 x 10	< 0,3	< 0,3
32	33	4,6 x 10	< 10	< 10	< 10	$2,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	$2,2 \times 10^3$	< 10	< 0,3	< 0,3
32	36	2,4 x 10	< 10	< 10	< 10	1×10^5	3,8 x 10	$1,4 \times 10^4$	< 10	< 0,3	< 0,3
42	30	$1,4 \times 10^2$	< 10	2 x 10	< 10	8×10^3	2×10^2	$8,9 \times 10^2$	1,3 x 10	0,36	< 0,3
42	33	8 x 10	< 10	< 10	< 10	$2,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^2$	$2,7 \times 10^4$	< 10	< 0,3	< 0,3
42	36	9,5 x 10	< 10	3 x 10	< 10	$2,3 \times 10^3$	1,2 x 10	$5,3 \times 10^3$	< 10	1,5	< 0,3

Leyenda: A, aislado; H, humedad; UFC, unidades formadoras de colonia; NMP, número más probable.

Los valores indican la media de n=3, excepto el punto central (33; 32) con n=5.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

Resultados similares se han encontrado en la literatura consultada, respecto a bacterias ácido lácticas aisladas del medio natural para un perspectivo uso en la bioconservación de los alimentos y en la salud humana (Abriouel y Benomar, 2011). Trias (2008), informa que de 496 bacterias ácido lácticas aisladas de frutas frescas, 23 de ellas tienen actividad antagonista frente a microorganismos fitopatógenos y patógenos humanos (*E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus*). Otros investigadores comprueban la actividad antifúngica de *Lactobacillus plantarum* aislada de pastos ensilados y demuestran que se debe a la producción de ácidos orgánicos, metabolitos de bajo peso molecular y péptidos cíclicos (Schnürer y Magnusson, 2005).

La acción antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas se debe fundamentalmente a la producción de ácido láctico y a otras sustancias inhibidoras: diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterina y bacteriocinas (Jack *et al*., 1995). Los ácidos orgánicos de cadena corta difunden a través de la membrana celular y se disocian debido al pH neutro del citoplasma, por tanto, ocurre la liberación de los protones (H^+) y a la vez la acidificación del citoplasma. Las células para mantener el equilibrio, expulsan hacia el medio extracelular los protones empleando la energía necesaria para su crecimiento, el cual es inhibido a medida que aumenta la concentración de ácido en el medio (Thomas y Kart, 2009).

CONCLUSIONES

El ensilaje del polen apícola a escala de laboratorio, a 36 % de humedad e inoculado con la cepa ácido láctica 42 aislada del pan de abejas, permite obtener un producto fermentado con calidad microbiológica aceptable y que permite su empleo para el consumo humano.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carpes ST, Begnini R, Alencar SM, Masson ML. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial. Ciencia e Agrotecnologia. 2007; 31(6): 1818-1825.
2. Yeverino GM, Arteaga MK, García VY. Evaluación fisicoquímica y microbiológica de mieles y polen (Pollinis) de abejas de diferentes marcas. Revista Salud Pública y Nutrición [Internet]. 2010 [Consultada enero 2011]; (1). Disponible en: www.respyn.uanl.mx/especiales/2010/ee-01-2010/documentos/trabajos_libres/TL28.pdf.
3. Shaoyong Y. Research of bacteria effect on the quality of honey bee collected pollen. Journal of Hygiene Research. 1989; 18(2): 30-33.
4. Anselmo DJ, Lausada L, Michanie SC, Albo G, Pérez O. Calidad microbiológica del polen. Información Tecnológica. 1996; 7(2): 75-77.
5. Serra BJ, Escolar JR. Nutrient Composition and microbiological quality of honey bee collected pollen in Spain. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1997; 45(3): 725-732.
6. Fleche C, Clement MC, Zeggane S, Faucon JP. Contamination of Bee Products and Risks for Human Health: the Situation in France. Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties. 1998; 16(2): 609-619.
7. Khismatullin R, Kuzyaev R, Lyapunov Y, Elovikova E. Sanitary microbiology of honey bee collected pollen. Document for Smail Business and Professionals. 2002. [Consultada octubre 2010]. Disponible en: http://www.docstoc.com/search/honeybee.pollen.
8. Lyapunov YE, Khismatullin RG, Kuziaev RZ. Enterobacteria of honey bee pollen. Scientific Programme Apimondia. Ireland. 2005; (336): 130.
9. Guerra PE, Salamanca GG, Henao RC. Estudio microbiológico de cargas de polen colectado y almacenado por *Apis mellifera* [Internet]. Colombia: Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigaciones Mellitopalinológicas. Universidad del Tolima. 2007 [Consultada junio 2007]. Disponible en: http://www.ut.edu.co/investigacion/grupos/m/mpolen.pdf.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

10. Kacániová M, Pavlicová S, HaÞcík P, Kociubinski G, Kmazovická V, Sudzina M, *et al*. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. Acta Microbiological et Immunologica Hungarica. 2009; 56(3): 285–295.
11. Valdés G, García O, Ruiz M, Martín M, Giral T. Evaluación de las condiciones higiénicas del polen. Zootécnica. 1992; 2(1): 87-93. (a)
12. 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. (b)
13. Rodríguez MJ, Guerra OM, Padrón SE, Fusté MV. Irradiación de tabletas de polen. Estudio de dosis. Revista electrónica Cubana de Farmacia [Internet]. 1995 [Consultada julio 007]; 29(2). Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol29_2_95/far13295.htm.
14. Puig PY, del Risco RCA, Álvarez RVP, Leiva CV, García NR. 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.
15. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. Microbiology Reviews. 1995; 59: 171-200.
16. Trias MR. Lactic acid bacteria as bioprotective agents against foodborne pathogens and spoilage microorganisms in fresh fruits and vegetables [Dissertação per optar al grau de Doctor de Ciências Experimentals i de la Salut]. Universitat de Girona. 2008.
17. Pérez PA, Valdés G, Ruíz M, Martín M. Pan de abejas industrial. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial. Certificado de autor de invención. 1991; No 22327 A1.
18. Beganovic JA, Pavunc L. Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. Journal of Food Science. 2011; 76(2): M124-129.
19. Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science Technology. 2004; 15: 67–78.
20. Del Risco RCA, Puig PY, Álvarez RVP, Pérez PA, Rodríguez CG, Leiva CV, García NR. Bacterias acido lácticas para ensilar polen apícola. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2012; 43(1): 17 – 21.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

21. Valdés G, Valera L, Martín M. Evaluación de la calidad microbiológica del polen apícola y polen acidificado. XXXV Congreso Internacional Apicultura. Apimondia; 1993.
22. NC-ISO 750: 2001. Producto de frutas y vegetales. Determinación de la acidez valorable.
23. NC-ISO 1842: 2001. Producto de frutas y vegetales. Determinación del pH.
24. NC-ISO 4832: 2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de coliformes. Técnica de placa vertida.
25. NC 38-02-14: 1989. Sistema de normas sanitarias de alimentos. Determinaciones cuantitativas de coliformes fecales. Método de ensayos microbiológicos.
26. ISO 7251: 2005. Microbiology-General guidance for enumeration of presumptive *Escherichia coli*- Most Probable Number Technique.
27. NC-ISO 7954: 2002. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25 °C.
28. NC-ISO 6888-1: 2003. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de *Staphylococccus* coagualasa positiva (*Staphylococccus aureus* y otras especies. Parte 1: Técnica utilizando el medio Agar Baird Parker.
29. ISO 6579:1993. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la detección de *Salmonella.*
30. ISO 7937: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* colony count technique.
31. NRAG 88: 09. Apicultura. Polen apícola. Especificaciones.
32. Thomas J M, Karl RM. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, España; 2009.
33. Leyva V, Martino TZ, Puig Y. Control microbiológico de los alimentos. En: Caballero A. Temas de Higiene de los alimentos. Ed. Ciencias Médicas. La Habana; 2008. p. 20 – 28.
34. ICMSF. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Ed. Acribia, Zaragoza; 2000.
35. NC 585:2008. Contaminantes microbiológicos en alimentos-requisitos sanitarios.
36.
37.

Vol. XVI No.4
Año 2014
Pág. 1-18
ISSN 1608 – 1862
RNPS 1920 – 040

38. Levin ER. *Staphylococcus aureus* En: Rapit detection and characterization or foodborne pathogens by molecular techniques. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. London New York; 2010. p. 337-401.
39. Abriouel H, Benomar N. Annotated genome sequence of *Lactobacillus pentosus* MP-10, which has probiotic potential, from naturally fermented Alorena green table olives. Journal of Bacteriology. 2011; 193(17): 4559-4560.
40. Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science and Technology. 2005; 16: 70–78.